

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Puffer und Lösungen

##### 2 × CTAB-Puffer

100 mM	Tris/HCl (pH 8.0)
1,4 M	NaCl
20 mM	EDTA
2 %	CTAB
0,2 %	β-Mercaptoethanol

##### 10 × Tris-Borat/EDTA-Puffer (TBE-Puffer)

108 g	Tris/HCl (pH 8,0)
55 g	Borsäure
40 ml	0,5 M EDTA (pH 8,0)

auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen

##### Tris-EDTA (TE-Puffer)

1 mM	EDTA
10 mM	Tris/HCl (pH 8,0)

##### 20 × Glycerol-toleranter Gel Puffer (GT-Puffer) 1 l (pH 8,9 - 9,1)

216 g	Tris
72 g	Taurine
4 g	EDTA

auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen

##### Puffer zum Aufschluss der Hefezellen (5 ml)

3,49 µl	β-Mercaptoethanol
100 µl	0,5 M Phenylmethylsulfonyl-Fluorid (PMSF)
500 µl	0,1 M EDTA (pH 7,6)
4400 µl	50 mM Kalium-Phosphat-Puffer (pH 7,6)

##### Y1-Puffer

1 M	Sorbitol
0,1 M	EDTA (ph 7,4)

kurz vor Gebrauch

0,1 %	β-Mercaptoethanol
50 U	Lyticase/ 10 <sup>7</sup> Zellen

### **Stop-Solution**

15 ml	Glycerin
30 mg	Bromphenolblau
6 ml	EDTA (0,5 M, pH 8,0)
0,3 ml	Tris (1 M, pH 8,0)

mit Aqua dest. auf 30 ml auffüllen

### **1 kb-Leiter**

375 µl	Aqua dest.
75 µl	Stop-Solution
50 µl	1 kb Leiter; 1 µg/µl (GibcoBRL)

## **2.1.2 Gel-Lösungen**

### **Agarosegele (1,5 %-ig)**

1,5 g	Agarose NA (Pharmacia Biotech, Freiburg)
10 ml	10 × TBE-Puffer
90 ml	Aqua bidest.

### **Nicht-denaturierendes Sequenzgel (0,8 mm dick) für die SSCP (150 ml)**

37,5 ml	MDE-Hydrolink-Lösung
9,0 ml	10 × TBE-Puffer
112,5 ml	Aqua bidest.

gut mischen und

600 µl	Ammoniumpersulfat (APS, 10 %)
60 µl	TEMED

hinzufügen

### **PAA-GT Gel (100 ml)**

48 g	Harnstoff
20 ml	38 %-iges Acrylamid/Bisacrylamid (Rotiphorese, Roth)
5 ml	20 × GT-Puffer

auf 100 ml mit Aqua bidest. auffüllen, gut mischen

1 ml	Ammoniumpersulfat (APS, 10 %)
20 µl	TEMED

### 2.1.3 Färbelösungen

#### **Färbelösungen für die Silberfärbung:**

Fixierer:

1 % Salpetersäure

10 % Essigsäure

Färbelösung:

0,2 % Silbernitrat

Entwickler:

0,28 M Natriumkarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , wasserfrei)

0,05 % Formaldehyd (37 %)

#### **Ethidiumbromid-Lösung:**

100  $\mu\text{l}$  Ethidiumbromid 10 mg/ml  
auf 2 Liter Aqua dest. auffüllen.

### 2.1.4 Nährlösungen und Nährmedien

#### **KM5-Nährlösung** (ca. pH 5,7)

10 g/l pankreatisches Pepton (Casein)

20 g/l Glukose

#### **YNB-Mangelnährboden**

0,67 % Hefe-Stickstoff (Basis), (Difco, USA)

0,3 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

## 2.2 Untersuchungsmaterial

Es wurden folgende Referenzstämme vom Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn-Delft verwendet:

CBS 562	<i>C. albicans</i> Serotyp A
CBS 5983	<i>C. albicans</i> Serotyp B
CBS 1905	<i>C. stellatoidea</i>

Insgesamt wurden 44 klinische *C. albicans*-Isolate in diese Studie einbezogen, davon wiesen 17 Stämme einen typischen (siehe Abschnitt 1.7) und 27 einen atypischen Biotyp auf.

**Tabelle 2.1:**

Atypische *C. albicans*-Stämme aus Afrika

Stammbezeichnung	Isoliert aus	Stammbezeichnung	Isoliert aus
Aus Angola		aus Madagaskar	
AA 1078/96	Vagina	AM 2	Vagina
AA 1578a	Vagina	AM 11	Vagina
AA 1578b	Vagina	AM 82	Vagina
AA 1598a	Vagina	AM 268(2)	Vagina
AA 1598b	Vagina	AM 335	Vagina
AA 1605	Vagina	AM 1649	Vagina
AA 1618	Vagina	AM 1653	Vagina
AA 1622a	Vagina	AM 1654	Vagina
AA 1622b	Vagina	AM 1655	Vagina
AA 1626	Vagina	AM 1660	Vagina
AA 1634	Vagina	AM 1669	Vagina
AA 579	Vagina	AM 8621	Vagina
AA 795	Vagina	AM 8627	Vagina
		AM 8640	Vagina

**Tabelle 2.2:**

Typische *C. albicans*-Stämme

Stammbezeichnung	Isoliert aus	Stammbezeichnung	Isoliert aus
BP 8	Urin	MU 298	Vagina
BP 17	Urin	MU 299	Vagina
BP 24	Rachen	MU 300	Vagina
BP 41	Urin	MU 301	Vagina
BP 31	Subphrenische Drainage	MU 290	Vagina
TA 90	Vagina	MU 288	Vagina
TA 73	Vagina	MU 299	Vagina
MU 305	Vagina	PO 356	Vagina
BE 114	Vagina		

Alle 44 *Candida albicans*-Stämme wurden aus der Stammsammlung der Klinik für Dermatologie der Charité Berlin zur Verfügung gestellt. Die atypischen Stämme, die GlcN und GlcNAc nicht verwerten konnten, waren durch PCR-Fingerprinting-Analysen als *C. albicans* identifiziert worden [Tietz et al., 1995].

## **2.3 Stammanzucht**

### **2.3.1 Stammhaltung und normale Anzucht**

Die *C. albicans*-Stämme wurden auf Sabouraud-Glucose-Agar-Platten ausgestrichen und bei 37 °C für 2–3 Tage bebrütet. In der Regel wurden die Stämme so ausplattiert, dass Einzelkolonien erhalten wurden.

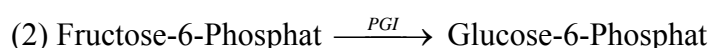
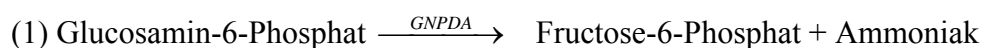
### **2.3.2 Stammanzucht für RNA-Extraktion und Enzymaktivitätsbestimmung**

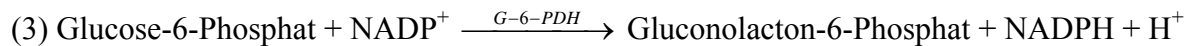
1–2 Kolonien des jeweiligen Isolats bzw. Stammes wurden zum Anlegen einer Vorkultur (5 ml Röhren KM5-Nährlösung) verwendet und über Nacht angezchtet. Anschließend wurden je 0,5 ml in 2 × 20 ml (in 100 ml Erlenmeyer-Kolben) YNB-Mangelnährlösung überimpft und für 24 h bei 37 °C im Schüttler bei 150 U/min bebrütet. Bei einer der beiden Kulturen wurden nach 24 h 0,5 ml einer 20 %-igen GlcNAc-Lösung hinzugefügt, während die andere unverändert gelassen wurde. Beide Kulturen wurden dann weitere drei Stunden inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und für die RNA-Extraktion bei -70 °C und für die Enzymaktivitätsbestimmung bei -20 °C bis zum Gebrauch gelagert.

## **2.4 Bestimmung der Aktivität der Glucosamin-6-Phosphat-Desaminase (GNPDA)**

Etwa  $5-10 \times 10^7$  Zellen ( $OD_{600} = 5$ ) in 200 µl Puffer (siehe Abschnitt 2) wurden zum Aufschluss der Hefezellen in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen mit etwa 0,5 g Glaskügelchen (0,45 mm Durchmesser) gegeben. Die Zellen wurden insgesamt 5 min mit dem Vortexer gemischt; nach jeweils 1 min wurde das Röhrchen für 30 sek auf Eis gekühlt. Anschließend wurde die Probe bei  $10000 \times g$  für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und in ein 0,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt.

Die Aktivität der Glucosamin-6-Phosphat-Desaminase (GNPDA, EC 3.5.99.6) wurde in einem gekoppelten optischen Test mit Hilfs- und Indikatorreaktion in einer modifizierten Methode nach White und Pasternak [White and Pasternak, 1975] gemessen.





Jeder Reaktionsansatz (0,5 ml) enthielt: 10 mM Glucosamin-6-Phosphat, 0,2 M Kalium-Phosphat-Puffer (pH 7,6), 2 mM NADP, 4 U Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-PDH, EC 1.1.1.49), 1,5 U Phosphoglucose-Isomerase (PGI, EC 5.3.1.9). Die Reaktion wurde durch Zugabe des Zellextrakts gestartet und bei Raumtemperatur für 30 sek inkubiert. Die Änderung der Absorption wurde für 15 min jede Minute bei einer Wellenlänge von 340 nm am Spektrophotometer Ultrospec III (Pharmacia/LKB, Freiburg) gemessen. Der limitierende Schritt in diesem Reaktionsansatz war die Aktivität der Desaminase. Die Ansätze erfolgten als Doppelbestimmungen.

#### Enzymansatz:

50 µl	10 mM Glucosamin-6-Phosphat
100 µl	0,2 M Kalium-Phosphat-Puffer (pH 7,6)
50 µl	2 mM NADP
4 µl	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-PDH) (4 IE)
6 µl	Phosphoglucose-Isomerase (PGI) (1,5 IE)
290 µl	Probe (Zellextrakt)

#### Berechnung der Enzymaktivität:

$$\text{Enzymaktivität [U/l]} = \frac{\Delta E \times V \times 1000}{t \times \epsilon_{\mu\text{mol}} \times d \times v} = \text{Faktor} \times \Delta E$$

#### Berechnung des Faktors:

$$\text{Faktor} = \frac{V \times 1000}{t \times \epsilon_{\mu\text{mol}} \times d \times v} = \frac{500 \mu\text{l} \times 1000}{1 \text{ min} \times 6,27 \text{ cm}^2/\mu\text{mol} \times 1 \text{ cm} \times 290 \mu\text{l}} = 274,98 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \times \text{l}}$$

$$\text{Enzymaktivität [U/l]} = 274,98 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \times \text{l}} \times \Delta E$$

$\Delta E/t$	Extinktionsdifferenz während der Meßzeit
V	Volumen der Messlösung (µl)
$\epsilon_{\mu\text{mol}}$	mikromolarer Extinktionskoeffizient für $\text{NADP}_{340\text{nm}} = 6,27 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$
v	Volumen der Probe im Test (µl)
d	Schichtdicke der Küvette

## 2.5 DNA-Präparation-Cetylmethylammoniumbromide (CTAB)-Minipräparation [Gardes and Bruns, 1993]

Jeweils 3–5 Hefekolonien ( $\emptyset$  ca. 3 mm) wurden in 400 µl  $2 \times$  CTAB-Puffer (siehe Abschnitt 2.1.1) in Eppendorf-Röhrchen suspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch dreimaliges Frieren

in flüssigem Stickstoff, Auftauen bei 65 °C im Wasserbad und einer anschließenden Inkubation von 30–60 min im Wasserbad bei 65 °C. Nach Zugabe von 400 µl Chloroform und kurzem Mischen wurde bei 13000 U/min für 15 min bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig abpipettiert, in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt und nach Zugabe von 400 µl Chloroform erneut zentrifugiert. Dies wurde mindestens dreimal wiederholt, bis in der wässrigen Phase keine Interphase mehr sichtbar war. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 300 µl kaltem Isopropanol aus der wässrigen Phase gefällt und für mindestens 1 Stunde bei 4 °C stehengelassen. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 13000 U/min (15 min Raumtemperatur). Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet mit kaltem 70 % Ethanol gewaschen, um die restlichen Puffersalze zu entfernen. Nach 10 min Zentrifugation bei 6000 U/min (Zentrifuge 5415 C; Eppendorf, Hamburg) wurde anschließend das Ethanol vorsichtig abgegossen und das Pellet im offenen Eppendorf-Röhrchen für etwa 10 min in der Speed-Vac getrocknet.

Je nach der geschätzten Menge an isolierter DNA wurde das Pellet in 50–300 µl TE-Puffer (pH = 8.0) resuspendiert. Nach vollständiger Lösung der DNA wurde die DNA-Konzentration durch Messung der Extinktion bei 260 nm am Spektrophotometer Ultrospec III (Pharmacia/LKB, Freiburg) ermittelt. Die Extinktion von 1 entspricht bei doppelsträngiger DNA ungefähr einer Konzentration von 50 µg/ml [Sambrook et al., 1989]. Anschließend wurde eine Arbeitslösung mit einer DNA-Konzentration von 10 ng/µl hergestellt.

Um den Reinheitsgrad der DNA-Lösung zu ermitteln, wurde der Quotient der Extinktion bei OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> bestimmt. Der errechnete Wert sollte für eine reine DNA-Präparation bei 1,8–2,0 liegen. Liegt der Wert darunter, so weist dies auf eine Kontamination der Probe durch Proteine oder Phenol hin, während ein Quotient > 2 für eine Verunreinigung durch RNA spricht.

Die originalen DNA-Proben wurden bei -20 °C und die jeweiligen Arbeitslösungen bei 4 °C gelagert.

## **2.6 Polymerase-Kettenreaktion**

Für die Amplifikation der verschiedenen Gene bzw. Genabschnitte wurden die in Tabelle 2.3 angegebenen Primer verwendet, die unter Verwendung von publizierten Sequenzen ausgewählt [Natarajan and Datta, 1993, Okeke et al., 2000] bzw. von B. Hube [Schaller et al., 1999] und J. Ernst zur Verfügung gestellt wurden. Alle Primer wurden von der Firma TIB Molbiol (Berlin) synthetisiert und jeweils auf eine Konzentration von 10 pmol mit Aqua dest. eingestellt.

**Tabelle 2.3:**

Primer für verschiedene PCRs

Primer	Sequenz
Nag1	5' TGA GAC AAG CTA TAT TTT CCA A 3'
Nag2	5' TGA CTT TAA TCC AGC GGC <sup>3'</sup>
Nag3	5' CTT CCG TAT TGC TTG ATT TT <sup>3'</sup>
Nag4	5' CAA AAT CAA GCA ATA CGG AAG <sup>3'</sup>
EF1-5 <sup>1</sup>	5' ATT GAA CGA ATT CTT GGC TGA C <sup>3'</sup>
EF1-3 <sup>1</sup>	5' CAT TCT TCA ACA GCA GCT TG <sup>3'</sup>
ACT1-F <sup>2</sup>	5' CTT TCT ACG TTT CCA TTC AAG CTG <sup>3'</sup>
ACT1-R <sup>2</sup>	5' GCA GAA GAT TGA GAA GAA GTT TGC <sup>3'</sup>
EFG1/RT-1 <sup>3</sup>	5' ACA ACT GCA GCC AAT CAA CAG <sup>3'</sup>
EFG1/RT-2 <sup>3</sup>	5' GTT CAA CGT ATC CGT AAC AGG <sup>3'</sup>
LEIRT2	5' TGC CGA AGC TTT TTT TTT TTC <sup>3'</sup>

**Tabelle 2.4:**

Gene und deren Amplifikations-Primer

Name des Gens	Primer	Position im Gen	Primerpaar	Fragmentgröße in bp	Annealing-Temp. in °C
Glucosamine-6-Phosphate Desaminase (NAG1)	Nag1	3–24	Nag1/2	736	56
	Nag2	722–739	Nag1/3	375	54
	Nag3	359–378	Nag2/4	381	56
	Nag4	358–378			
Elongationsfaktor (EFT1b)	EF1-5 <sup>1</sup>	70–91	EF1-3/5	918	50
	EF1-3 <sup>1</sup>	967–988			
Aktin (ACT1)	ACT1-F <sup>2</sup>	2076–2099	ACT1-F/R	312	65
	ACT1-R <sup>2</sup>	2365–2388			
Transkriptionsfaktor (EFG1)	EFG1/RT-1 <sup>3</sup>	4518–4538	EFG1/RT-1/2	488	54
	EFG1/RT-2 <sup>3</sup>	4986–5006			

### 2.6.1 Primer-Optimierung

Die Optimierung der spezifischen Primer für NAG1 wurde in Hinsicht auf Primer- und DNA-Templatekonzentration, Annealingtemperatur sowie des Thermozyklerprogramms mit Hilfe einer Primeroptimierungsmethode nach Cobb und Clarkson [Cobb and Clarkson, 1994] durchgeführt. Es zeigte sich, dass das Optimum der Annealingtemperatur für die Primerpaare Nag 1/2 und Nag 2/4 bei 56 °C und für das Primerpaar Nag 1/3 bei 54 °C lag. Die Ansätze der einzelnen

<sup>1</sup> Die Primer EF1-3/5 wurden uns dankenswerterweise von B. Hube überlassen [Schaller et al., 1999].

<sup>2</sup> Die Primer ACT1-F/R wurden aus der Veröffentlichung von C.N. Okeke [Okeke et al., 2000] übernommen.

<sup>3</sup> Die unveröffentlichten Sequenzdaten für die Primer EFG1/RT-1/EFG1/RT-2 wurden uns dankenswerterweise von J.F. Ernst überlassen.



Primerpaare unterschieden sich in den Konzentrationen der Primer, der dNTPs und des Magnesiumacetats.

Die weiteren Primer wurden mittels eines Standard-PCR-Ansatzes (siehe Tabelle 2.5, Spalten 5–7) unter Verwendung eines Temperaturgradienten im Thermozykler (Robocycler Gradient 40, Stratagene) optimiert. Die Amplifizierung erfolgte bei allen Primern über 34 Zyklen.

## 2.6.2 PCR-Bedingungen und Analyse der PCR-Produkte

Für die Durchführung der Polymerasen-Kettenreaktion wurden Ansätze von je 50 µl verwendet, die unterschiedlichen Ansätze für die jeweiligen Primer (siehe Tabelle 2.3) sind in der Tabelle 2.5 aufgeführt.

**Tabelle 2.5:**

PCR-Ansatz

	<b>Nag1/2</b>	<b>Nag2/4</b>	<b>Nag1/3</b>	<b>EF1-3/5</b>	<b>ACT1-F/R</b>	<b>EFG1/RT-1/2</b>
Aqua dest.	34,8 µl	34,8 µl	29,8 µl	33,3 µl	33,3 µl	33,3 µl
10 × PCR-Puffer <sup>1</sup>	5,0 µl	5,0 µl	5,0 µl	5,0 µl	5,0 µl	5,0 µl
dNTPs(1,25 mM) <sup>2</sup>	2,0 µl	2,0 µl	4,0 µl	4,0 µl	4,0 µl	4,0 µl
MgAc (25 mM)	-	3,0 µl	3,0 µl	-	-	-
Primer 1 (10 ng/l)	3,0 µl	1,5 µl	3,0 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
Primer 2 (10 ng/l)	3,0 µl	1,5 µl	3,0 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
Taq-Polymerase <sup>3</sup> 5 U/µl	0,2 µl	0,2 µl	0,2 µl	0,2 µl	0,2 µl	0,2 µl
DNA/ cDNA (10 ng/µl)	2,0 µl	2,0 µl	2,0 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl

PCR-Protokolle für die Amplifizierung unter Verwendung verschiedener Primer sind in den Tabelle 2.6 und Tabelle 2.7 dargestellt.

**Tabelle 2.6:**

PCR-Programme für die Primerpaare Nag1/Nag2, Nag 2/4, Nag1/3, EF1-3/5, EFG1/RT-1/RT-2

Primer		<b>Nag1/2 Nag2/4</b>	<b>EF1-3/5</b>	<b>EFG1/RT-1/2 Nag1/3</b>
Initiale Denaturierung	3 min	95 °C	95 °C	95 °C
Denaturierung	1 min	95 °C	95 °C	95 °C
Annealing	30 sek	56 °C	50 °C	54 °C
Extension	1 min	72 °C	72 °C	72 °C
Die Amplifizierung erfolgte über 34 Zyklen.				
End-Extension	5 min	72 °C	72 °C	72 °C
Abkühlung	∞	4 °C	4 °C	4 °C

<sup>1</sup>Zusammensetzung des 10 × PCR-Puffer (Applied Biosystems/Roche) 100 mM Tris-HCL, pH 8,3; 500 mM KCL; 15 mM MgCl<sub>2</sub>

<sup>2</sup>Ultrapure dNTPs, Amersham

<sup>3</sup>AmpliTaq DNA Polymerase, Applied Biosystems/Roche

**Tabelle 2.7:**

PCR-Programm für das Primerpaar ACT1-F/ACT1-R.

Primer		<b>ACT1-F/R</b>
Initiale Denaturierung	3 min	94 °C
Denaturierung	1 min	94 °C
Annealing	1 min	65 °C
Extention	1 min	72 °C
Die Amplifizierung erfolgte über 30 Zyklen.		
End-Extension	5 min	72 °C
Abkühlung	∞	4 °C

Die PCR-Produkte wurden in einem 1,5 %-igem Agarose-Gel ( $1 \times$  TBE) bei einer konstanten Spannung von 100 Volt für 3 h in  $0,5 \times$  TBE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Agarosegel mit  $1/8$  Volumen Stoplösung (siehe Abschnitt 2.1.1) versetzt. Anschließend wurde das Gel für 15 min in Ethidiumbromid (10 mg/l) gefärbt und zur Dokumentation im UV-Licht fotografiert (Eagle Eye II, Stratagene, Heidelberg).

## 2.7 RNA-Extraktion

Es wurden ca.  $1-2 \times 10^7$  Zellen verwendet, deren Aufschluss enzymatisch mit Lyticase erfolgte. Dafür wurden  $100 \mu\text{l}$  Y1-Puffer/ $10^7$  Zellen (siehe Abschnitt 2.1.1) auf die abzentrifugierten Zellen gegeben und für 30 min bei leichtem Schütteln bei 30 °C inkubiert, um Spheroplasten herzustellen. Die Isolierung der RNA aus den Spheroplasten erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (QIAGEN, USA), Protocol Yeast II, nach den Angaben des Herstellers.

Die RNA-Konzentration wurde durch Messung der Extinktion bei 260 nm am Spektrophotometer Ultrospec III (Pharmacia/LKB, Freiburg) ermittelt. Die Extinktion von 1 entspricht bei RNA ungefähr einer Konzentration von 40  $\mu\text{g/ml}$ . Alle Proben wurden bei -80 °C gelagert.

## 2.8 Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Die Reverse-Transkriptase-Reaktion wurde nach [Liang and Pardee, 1997] durchgeführt. Zunächst wurde die extrahierte RNA mit DNase behandelt, um kontaminierende DNA aus den Präparaten zu entfernen (siehe Tabelle 2.8).

**Tabelle 2.8:**

DNase-Behandlung (Vorbereitung für die RT)

RNA (1 µg)	x µl
H <sub>2</sub> O	(10 - x) µl
10 × DNase-Puffer	1,2 µl
DNase I 1 U/µl	1 µl
15 min bei Raumtemperatur	
25 mM EDTA	1,2 µl
10 min bei 65 °C	
RNA nach DNase-Behandlung	13,4 µl

**Tabelle 2.9:**

Durchführung RT-PCR

5 µl	RNA
18 µl	H <sub>2</sub> O
5 µl	10 × Puffer (0,5 M Tris-HCl pH 8,3; 0,75 M KCl; 0,03 M MgCl <sub>2</sub> )
4 µl	dNTPs
5 µl	DDT
10 µl	Oligo(dT)Primer (1 µg) (LEIRT2) (siehe Tabelle 2.3)
2 µl	RNase Block Ribonuclease Inhibitor 40 U/µl (Stratagene)
2 µl	MMLV Reverse Transkriptase 50,000 U/ml (Stratagene)
Thermozykler Programm: 65 °C - 5 min; 37 °C - 65 min; 75 °C - 5 min; 4 °C - ∞	

## 2.9 Durchführung der RT-PCR zur Amplifizierung der mRNA

Die initiale Inkubation bei 65 °C (5 min) wurde benutzt, um die Sekundärstruktur der RNA aufzulösen. Der Start der RT-Reaktion erfolgte nach 10 min bei 3 °C durch Zugabe von je 2 µl reverser Transkriptase. Das Gemisch wurde für weitere 55 min bei 37 °C inkubiert. Die abschließende Inkubation bei 75 °C für 5 min inaktivierte die reverse Transkriptase. Anschließend wurde das Produkt auf 4 °C abgekühlt und bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

Die cDNA wurde mit den Primerpaaren Nag 1/2; ACT1-F/R; EF1-3/5; EFG1/RT-1/2 (siehe Tabelle 2.3) amplifiziert. Das Primerpaar EF1-3/5, welches von der Arbeitsgruppe B. Hube entwickelt wurde [Schaller et al., 1999], diente zur Amplifizierung einer internen mRNA Kontrolle und zur Erkennung von genomischer DNA. Die RT-PCR-Produkte wurden (wie in Abschnitt 2.6.2 beschrieben) auf einem Agarose-Gel aufgetrennt.

## **2.10 Single-Strand-Conformation-Polymorphisms-Analyse (SSCP)**

Je 10–15 µl des Nag1-PCR-Produkts wurden mit 2 µl eines Gemisches aus 1 %-igem Natriumdodecylsulfat (SDS); 10 mM EDTA, pH 8,0 und 2 µl Stop-Lösung (des Cycle Sequencing Kit, GIBCO BRL) gemischt, 15 min bei 98 °C im Heizblock denaturiert und sofort für 10 min auf Eis abgekühlt.

Die Proben wurden auf ein nicht-denaturierendes MDE-Gel (MDE Hydrolink-Gelsolution, FMC, USA) (siehe Abschnitt 2.1.2) aufgetragen und in  $0,5 \times$  TBE-Puffer in Abhängigkeit von der Fragmentgröße nach folgenden Laufparametern bei 4 °C aufgetrennt.

Fragmente  $\leq$  500 bp: 12–16 h bei 10 Watt

Fragmente  $\geq$  500 bp: 14–17 h bei 30 Watt

Nach Beendigung des Laufs wurden die aufgetrennten DNA-Einzelstränge durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Dafür wurde das SSCP-Gel zuerst für 15 min in 1 %-iger Salpetersäure fixiert und kurz gut mit Aqua bidest. abgespült. Anschließend wurde das Gel für 25 min in einer 0,2 %-igen Silbernitratlösung gefärbt und danach für 5–10 min in Aqua bidest. gewässert. Die Entwicklung erfolgte in einer 0,28 M Natriumkarbonat-Lösung, der kurz vor Verwendung Formaldehyd (37 %-ig) bis zu einer Konzentration von 0,05 % zugesetzt wurde, und dauerte je nach Hintergrund und Bandenfärbung zwischen 3–10 min. Danach wurde nochmals kurz mit Aqua bidest. gespült. Schließlich wurde das Gel mit 5 %-iger Essigsäure für 5 min fixiert, kurz in Aqua bidest. gespült, auf ein Filterpapier (3 MM, Whatman) aufgebracht und bei 80 °C für 1–2 h auf dem Geltrockner (Savant, USA) getrocknet.

## **2.11 Radioaktive Sequenzierung des NAG1**

Die Sequenzierung erfolgte mit dem Thermo Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing Kit (USB, USA) nach der Vorschrift des Herstellers.

## **2.12 Vorbereitung der PCR-Produkte für die Sequenzierung**

Für die Amplifikation der gewünschten Genabschnitte (Sequenzen zwischen den Primern Nag1 und 2) wurden die PCR-Ansätze verdoppelt (siehe Tabelle 2.5). Die PCR-Ansätze wurden auf ein 1 %-iges Agarose-Gel ( $1 \times$  TBE) in  $0,5 \times$  TBE aufgetragen und über 3 Stunden bei 100 V aufgetrennt, anschließend wurden die Produkte aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem Geextraktionskit (QiaQuick Gel Extraction Kit, Qiagen, USA) gereinigt. Die Konzentration der gereinigten PCR-Produkte wurde in einem Kontroll-Agarosegel (3 %-ig,  $1 \times$  TBE) durch den Vergleich mit einem Molekulargewichtsmarker (HaeIII geschnittene  $\Phi$ X174RF-DNA,

GibcoBRL) abgeschätzt. Für das Cycle Sequencing (siehe Tabelle 2.12) wurde eine DNA-Konzentration von ca. 20 ng und die Primer Nag1, Nag2, Nag3 oder Nag4 eingesetzt.

**Tabelle 2.10:**

Reaktionsmaster-Mix für die Sequenzierung

2 µl	Reaktionspuffer
x µl	DNA
1 µl	Primer (10 ng/l)
(15 - x) µl	Aqua dest.
2 µl	Thermo Sequenase DNA Polymerase
20 µl	Gesamtvolumen

Es wurde für jede Sequenzierung in einem Eppendorf-Röhrchen ein auf Eis gekühlter Master-Mix angesetzt, welcher auf 4 Eppendorf-Röhrchen zu je 4,5 µl aufgeteilt wurde. 2,5 µl Terminations-Mix, entweder Mix-A, -C, -G oder -T, wurden in die einzelnen Ansätze pipettiert und zum Schluss mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. Anschließend wurde das Cycle Sequencing (siehe Tabelle 2.12) im Trioblock Thermocycler (Biometra) durchgeführt.

**Tabelle 2.11:**

Terminations-Mix für die Sequenzierung (n = Anzahl der Proben)

Mix-A	n × 0,5 µl	ddATP [ $\gamma$ - <sup>33</sup> P]
	n × 2,0 µl	dGTP
Mix-C	n × 0,5 µl	ddCTP [ $\gamma$ - <sup>33</sup> P]
	n × 2,0 µl	dGTP
Mix-G	n × 0,5 µl	ddGTP [ $\gamma$ - <sup>33</sup> P]
	n × 2,0 µl	dGTP
Mix-T	n × 0,5 µl	ddTTP [ $\gamma$ - <sup>33</sup> P]
	n × 2,0 µl	dGTP

Nach Beendigung der Cycle-Sequencing-PCR wurde jede Probe mit 4 µl Stop-Lösung versetzt und bis zur elektrophoretischen Trennung bei -20 °C aufbewahrt.

**Tabelle 2.12:**

Cycle Sequencing

Initiale Denaturierung	94 °C	3 min
Denaturierung	95 °C	30 sek.
Annealing	56 °C	30 sek.
Extention	72 °C	1 min 20 sek.
Das Cycle Sequencing erfolgte über 30 Zyklen.		
Abkühlung	4 °C	∞

### 2.12.1 Analyse der Sequenzieransätze im PAA-GT-Gel

Für die Sequenzierläufe wurden 8 %-ige Polyacrylamidgele (PAA-GT-Gel siehe Abschnitt 2.1.2) verwendet. Für den Kurzlauf wurde das Gel vor dem Auftragen der Proben für 15 min bei 1,4 kV vorgeheizt. Die Proben wurden vor dem Auftragen für 2–10 min auf 70 °C erwärmt und je 4 µl in eine Geltasche aufgetragen. Pro Probe wurden ein Kurz- (3 Stunden) und ein Langlauf (9 Stunden) bei 1,4 kV durchgeführt. Anschließend wurden die Gele zum Trocknen auf Filterpapier (3MM, Whatman) aufgebracht und auf dem Geltrockner (Savant, USA) bei 80 °C für 1–2 Stunden getrocknet. Zum Schluss wurden die Gele auf Röntgenfilm in einer Filmkassette aufgelegt und 1–4 Wochen exponiert. Die Röntgenfilme wurden mit einem Entwicklungsautomaten (Hyperprocessor, Amersham) entwickelt und visuell ausgewertet.

Die Eingabe der DNA-Sequenz und die Umwandlung in die Aminosäure-Sequenz wurde mit Hilfe des Programms ESEE (Version 1.09e) durchgeführt [Cabot and Beckenbach, 1989].

### 2.12.2 Analyse der NAG-Sequenzen

Alignments wurden mit Hilfe des Programms ESEE (Version 1.09e) aus der sequenzierten DNA erstellt und anschließend auf Mutationen und deren Auswirkungen auf die Proteinsequenz untersucht.

Basierend auf dem erhaltenen Alignment wurden phylogenetische Bäume nach der Parsimony-Methode und einer Distanzmethode (Neighbour Joining) mit dem Programm PAUP (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony and other methods*, Version 4.0b10 für Macintosh) berechnet [Swofford, 2000]. Bei den Datensätzen der DNA- und Proteinsequenzen wurde bei der Parsimony-Methode die *heuristic-search*-Option verwendet. Zur statistischen Evaluierung erfolgte die Bootstrap-Analyse für beide Methoden (Parsimony und Neighbour Joining) mit je 100 Wiederholungen. Die Gesamt-Konsensus-Bäume wurden mit der Option *50 % majority consensus tree* erstellt. Für jeden Knoten im Baum wurde ein Wert ermittelt, der die statistische Wahrscheinlichkeit der Verzweigung nach dem Knoten angibt. Bei der Parsimony-Analyse werden Werte über 70 % und bei der Neighbour-Joining Werte über 90 % als signifikant erachtet. Alle Bäume sind als *unrooted* Konsensus-Bäume dargestellt.