

II MATERIAL UND METHODEN

1 FEINCHEMIKALIEN UND REAGENZIEN

- Acrylamidlösung Serva, Heidelberg
- Agarose Sigma, Deisenhofen und Gibco BRL, Eggenstein
- Ampicillin USB, Bad Homburg
- anorganische Salze Sigma, Deisenhofen
- APS Sigma, Deisenhofen
- Bactoagar Difco, Detroit
- Bactotrypton Difco, Detroit
- 7-Benzyloxygrammin Sigma, Deisenhofen
- 7-Benzyloxyindol Sigma, Deisenhofen
- 7-Benzyloxytryptophan Sigma, Deisenhofen
- β -Mercaptoethanol Gibco BRL, Eggenstein
- Borsäure Sigma, Deisenhofen
- BSA Sigma, Deisenhofen
- Coomassie Brilliant Blue R250 Serva, Heidelberg
- DEPC Sigma, Deisenhofen
- o-Dianisidine (Fast Blue BN-Salz) Sigma, Deisenhofen
- DMEM Gibco BRL, Eggenstein
- DTT Sigma, Deisenhofen
- EDTA Sigma, Deisenhofen
- Ethanol (abs.) Merck, Darmstadt
- Ethidiumbromid Sigma, Deisenhofen
- Glutamin Seromed, Berlin
- Glycerin Sigma, Deisenhofen
- G-418 (Neomycin-Analogen) Gibco BRL, Eggenstein
- Harnstoff Stratagene, Heidelberg
- HAT-Medium-Supplement Sigma, Deisenhofen
- Hefeextrakt Difco, Detroit
- HEPES Sigma, Deisenhofen
- 5-Hydroxytryptophan Sigma, Deisenhofen
- 5-Hydroxyindolessigsäure Sigma, Deisenhofen
- Hygromycin B Gibco BRL, Eggenstein
- Immunate STIM plus Immuno Baxter, Heidelberg
- Lachssperma-DNA Sigma, Deisenhofen
- Lambda-DNA Gibco BRL, Eggenstein
- Leupeptin Sigma, Deisenhofen
- MEM Gibco BRL, Eggenstein
- 1-Methyl-tryptophan Sigma (Aldrich), Deisenhofen
- Mineralöl Sigma, Deisenhofen
- MOPS Sigma, Deisenhofen
- Natrium-pyruvat Gibco BRL, Eggenstein
- NSD1015 Sigma, Deisenhofen
- OPTI-MEM Gibco BRL, Eggenstein
- PCR-Wachs Biozym, Heidelberg
- Penicillin/Streptomycin Seromed, Berlin
- Pepstatin A Sigma, Deisenhofen
- Perchlorsäure 70 %ig Fluka, Neu-Ulm
- Phosphorsäure Sigma, Deisenhofen
- PMSF Sigma, Deisenhofen
- Primer BIOTEZ, Berlin-Buch
- Radiochemikalien Amersham, Braunschweig
- RPMI 1640 Gibco BRL, Eggenstein
- Sequagel XR 6 % Biozym, Heidelberg

- Serotonin Sigma, Deisenhofen
- SMBS Sigma, Deisenhofen
- SDS Fluka, Neu-Ulm
- TEMED Sigma, Deisenhofen
- Tris Sigma, Deisenhofen
- TRIZOL Gibco BRL, Eggenstein
- Trypsin/EDTA Gibco BRL, Eggenstein
- Tryptophan Sigma, Deisenhofen
- Tween-20 Sigma, Deisenhofen
- X-Gal Sigma, Deisenhofen und Biomol, Ilvesheim

2 ENZYME UND KITS

- AMV-Reverse-Transkriptase Promega, Heidelberg
- Antikörper Sigma, Deisenhofen und Biotrend, Köln
- CIP Pharmacia, Freiburg
- DNase I Boehringer Mannheim, Mannheim
- Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP Amersham, Braunschweig
- Expand Long Template PCR System Boehringer Mannheim, Mannheim
- Hyaluronidase Sigma, Deisenhofen
- Katalase Sigma, Deisenhofen
- Megaprime Kit Amersham, Braunschweig
- mRNA-Extraktions-Kit Promega, Heidelberg
- MuLV Reverse Transkriptase Gibco BRL, Eggenstein
- Proteinase K Boehringer Mannheim, Mannheim
- Quiagen-Plasmidisolierung Diagen, Hildesheim
- SP6-RNA-Polymerase Promega, Heidelberg
- Restriktionsenzyme Gibco BRL, Eggenstein und NEB, Schwalbach
- Rinderpankreas-Ribonuklease (RNase) Boehringer Mannheim, Mannheim
- Rnasin Promega, Heidelberg
- RPAII Kit (RNase protection assay) Ambion, Austin, TX
- Sequenase Version 2.0 USB, Bad Homburg
- T3-RNA-Polymerase Promega, Heidelberg
- T4-DNA-Ligase Promega, Heidelberg
- T4-DNA-Polymerase NEB, Schwalbach
- T4-Polynukleotid-Kinase NEB, Schwalbach
- T4-RNA-Ligase NEB, Schwalbach
- T7-RNA-Polymerase Promega, Heidelberg
- Taq™-Polymerase Promega, Heidelberg und Gibco BRL, Eggenstein
- Terminale-Transferase (TdT) Boehringer Mannheim, Mannheim

3 GERÄTE

Gerät	Modell	Bezugsquelle
• Acrylamidgelelektrophorese	verschiedene Kammern	Biometra, Göttingen
• Agarosegelelektrophorese	verschiedene Kammern	Biometra, Göttingen
• DNA-Sequenzgelelektrophorese	LI-COR 2000	MWG, Ebersberg

• Dosierpipetten	diverse Modelle	Eppendorf, Hamburg und Gilson, Biometra, Göttingen
• Elektroblotter		
• Elektroporator	Gene Pulser™	BioRad, Hercules, CA
• Hamilton 8-Kanalpipette		MWG, Ebersberg
• HPLC-FD		Shimadzu, Duisburg
• Kühlzentrifugen		Sorvall, Bad Homburg Beckman, Berlin
• Mikrofilter und Mikrodialyse-Membranen		Millipore, Billerica, Mass.,USA
• OP-Besteck	Diverses	Fine Science Tools Inc., Heidelberg
• PAGE	verschiedene Kammern	Biometra, Göttingen
• Phosphoimager	BAS2000	Fuji, Tokyo
• Rotoren	GSA und SS34 JA-14 und JA-20 SW41TI	DuPont (Sorvall), Bad Homburg Beckman, Berlin
• Schüttel-Inkubator	G25	New Brunswick, Edison, NJ
• Spektrophotometer	diverse	Kontron, München und Pharmacia, Freiburg
• Stromquellen	EPS 500/400	Pharmacia, Freiburg
• Thermocycler	diverse	Biozym, Heidelberg
• Thermomixer	5436	Eppendorf, Hamburg
• Tischzentrifugen	5412 5417C Typ 00702	Eppendorf, Hamburg
• Transilluminator	TI 1	Heraeus Christ, Osterode, Harz
• Ultrazentrifugen	L5-65 <i>spinco</i> L2-65B	Biometra, Göttingen Beckman, Berlin
• Vakuumblotter		Biometra, Göttingen
• Vortex-Rüttler	K-550-GE	Scientific Industries, Bohemia, NY

4 ZELLKULTUREN UND MIKROORGANISMEN

4.1 Säugetierzellen

4.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Die Zellen aller Zelllinien wurden im Inkubator bei 37 °C, 100 %iger Luftfeuchte und 5 %iger CO₂-Atmosphäre kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen passagiert, d.h. nach dem Waschen mit PBS wurden sie mit Trypsin/EDTA behandelt, um sie zu vereinzeln und von der Kulturschale zu trennen. Anschließend wurden sie in der erforderlichen Zelldichte wieder ausgesät. Die Zentrifugation der Zellen erfolgte bei ca. 200 × g für 4 min bei Raumtemperatur. Zum Zählen der Zellen wurde eine Neubauerkammer benutzt.

Zur Lagerung von Zellen wurden sie in dem jeweiligen Einfriermedium langsam (ca. 2 °C/min) bis -80 °C gekühlt und dann in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Um eingefrorene

Zellen auszusäen, wurden die Zellen so schnell wie möglich im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und mit 15 bis 20 ml des entsprechenden Kulturmediums verdünnt.

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt, um jegliche Kontaminationen mit Pilzen und Bakterien zu vermeiden.

Einfriermedien: Den jeweiligen fertigen Kulturmedien wurden weitere 10% fötales Kälberserum (FCS) und 10 % DMSO zugegeben.

4.1.2 Neuroblastoma × Glioma NG108-15 (Maus × Ratte)

Diese Hybridoma-Zelllinie mit neuronalen Charakter diente für Versuche, bei der eine endogene Expression der TPH erforderlich ist (Walther *et al.*, 1998). Zur Transfektion der adherenten Zellen wurde die Kalziumphosphat-Methode nach Maniates (Sambrook *et al.*, 1989) verwendet (Abschnitt II 4.1.7.1).

NG108-15-Medium: DMEM (Gibco BRL, Eggenstein)
10 % FCS
4,5 g/l Glucose
1 Ampulle HAT-Medium-Supplement
100 µg/ml Gentamycin
Antibiotica (100 u/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin)

4.1.3 Mastocytoma P815 (Maus)

Die Suspensionszelllinie P815 wurde wegen der hohen endogenen TPH1-Expression überwiegend zur Isolierung von *Tph1*-mRNA und TPH1-Protein verwendet, das vor allem in TPH-Assays eingesetzt wurde. Außerdem wurde diese Zelllinie in den meisten Zellkulturexperimenten mit Ribozymen eingesetzt. Transfiziert wurden diese Zellen durch Elektroporation (Abschnitt II 4.1.7.3).

P815-Medium: RPMI 1640 (Gibco BRL, Eggenstein)
10 % fötales Kälberserum
100 µg/ml Gentamycin
Antibiotica (100 u/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin)

4.1.4 Nierenepithelzelllinie COS7 (Grüne Meerkatze)

Als Zelllinie für Kontrollversuche diente die Nierenepithelzelllinie COS7, die der Grünen Meerkatze entstammt, da sie keine TPH exprimiert. Auch diese Zellen wurden mit der Kalziumphosphat-Methode nach Maniates (Sambrook *et al.*, 1989) transfiziert (Abschnitt II 4.1.7.1).

COS7-Medium: **DMEM (Gibco BRL, Eggenstein)**
 10 % FCS
 100 µg/ml Gentamycin
 Antibiotica (100 u/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin)

4.1.5 Verpackungszelllinie ψ CRE (Maus)

Die von der Mausfibroblastenzelllinie NIH3T3 (Abschnitt II.4.1.6) abgeleitete ecotrope Verpackungszelllinie diente zur Generierung von rekombinanten Retroviren. Diese Zelllinie wurde durch die Transfektion mutierter Verpackungsgene mit deletierter ψ -Verpackungssequenz des Moloney-Murinen-Leukämievirus (Mo-MuLV) erzeugt (Danos *et al.*, 1988).

Die Transfektion mit einem retroviralen Plasmid, das neben dem zu transfizierenden Genkonstrukt die beiden 3'- und 5'-LTRs (Long term repeats) und die ψ -Verpackungssequenz enthalten muss, erfolgte durch Lipofektion (Abschnitt II 4.1.7.2).

ψ CRE-Medium: **DMEM (Gibco BRL, Eggenstein)**
 10 % FCS
 100 µg/ml Gentamycin
 Antibiotica (100 u/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin)

4.1.6 Fibroblastenzelllinie NIH3T3 (Maus)

Diese adherente Zelllinie wurde hauptsächlich zur Transduktion mit rekombinanten Retroviren benutzt, weil diese auf Grund ihrer Mausspezifität suszeptibel für die von den ψ CRE-Zellen generierten Viren sind.

Verwendet wurde sie aber auch als Kontrollzelllinie, denn sie exprimiert keine TPH. Außerdem ist diese schnell wachsende Zelllinie gut zu handhaben und zu vermehren.

Transfiziert wurden diese Zellen mit der Kalziumphosphat-Methode nach Maniates (Sambrook *et al.*, 1989; Abschnitt II 4.1.7.1) oder durch Lipofektion (Abschnitt II 4.1.7.2).

NIH3T3-Medium: **DMEM (Gibco BRL, Eggenstein)**
 10 % FCS
 100 µg/ml Gentamycin
 Antibiotica (100 u/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin)

4.1.7 Kleinzellige Lungenkrebszelllinien SHP-77 und NCI-H510A (human)

Die beiden humanen Serotonin produzierenden Zelllinien SHP-77 und NCI-H510A entstammen kleinzelligem Lungenkrebs (SCLC, small cell lung carcinoma) und wurden wegen der hohen TPH-Expression in Versuchen zur Toxifikation von 7-HTP verwendet. Außerdem dienten die SHP-77-Zellen auch als Quelle für die Klonierung des humanen *TPH2*-Gens.

SHP-77-Medium: **RPMI 1640 (Gibco BRL, Eggenstein)**
 10 % FCS
 1 mM Na-Pyruvat
 2 mM L-Glutamin
 100 µg/ml Gentamycin
 Antibiotica (100 u/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin)

NCI-H510A-Medium: **RPMI 1640 (Gibco BRL, Eggenstein)**
 10 % FCS
 100 µg/ml Gentamycin
 Antibiotica (100 u/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin)

4.1.8 Pankreatische Karzinoidzelllinie BON (human)

Diese Karzinoidzelllinie wurde hauptsächlich als Kontrollzelllinie für Versuche zur Bestimmung der Toxizität von 7-HTP eingesetzt.

BON-Medium: **DMEM (Gibco BRL, Eggenstein)**
 10 % FCS
 100 µg/ml Gentamycin
 Antibiotica (100 u/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin)

4.2 Manipulation von Säugerzellen

4.2.1 Kalziumphosphat-Transfektion

Bei der Kalziumsphosphat-Methode nach Maniatis (Sambrook *et al.*, 1989) wurden einen Tag vor der Transfektion die Zellen in einer Dichte ausgesät, so dass sie am folgenden Tag 80 % Konfluenz erreichen. Zum frisch gewechselten Medium wurde eine Suspension von Kalzium-DNA-Präzipitat auf die Zellen gegeben. Dieses erhält man, indem zum HPBS-Puffer 20 µg DNA, Wasser und CaCl₂ zugegeben wurde. Nach vier Stunden wurde das Medium gewechselt. Nach weiteren 24 bis 48 Stunden sind die Zellen transient transfiziert (Sambrook *et al.*, 1998). Um stabil transfizierte Zellen zu erhalten, müssen sie noch weitere zwei Wochen selektiert werden. Da alle Zellen, die mit dieser Methode transfiziert wurden eine Neomycin-Resistenz im Konstrukt enthalten oder mit einer Neomycin-Resistenz cotransfiziert wurden, wurden die Zellen mit dem Neomycin-Analogon G418 (Geneticin) selektiert. Die verwendete Konzentration betrug dabei 500 µg/ml.

DNA-Präzipitat: **in dieser Reihenfolge pipettiert:**
 x µl (20 µg) Plasmid-DNA
 250 µl 2 × HPBS pH 7,1
 225-x µl H₂O (bidest.)
 25 µl CaCl₂-Lsg. (2,5 M)
Inkubation bei 37 °C für 30 min.

2 × HPBS: (für 100 ml)
 1,6 g NaCl
 74 mg KCl
 25 mg Na₂HPO₄ · 2 H₂O
 200 mg Glucose
 1 g HEPES
pH 7,1 mit 1N NaOH einstellen
ad 100 ml H₂O (bidest.)

4.2.2 Transfektion mit Lipofectamin

Als Transfektionsreagenz wurde Lipofectamine2000 (Invitrogen, USA) verwendet. Bei dieser Methode wird zunächst ein DNA-Lipofectamin-Komplex hergestellt. Dazu verdünnt man sowohl das Lipofectamine2000 als auch die Plasmid DNA in serumfreies Minimalmedium (OPTI-MEM), mischt beide Verdünnungen und inkubiert 20 min bei Raumtemperatur. Den entstandenen DNA-Lipofectamin-Komplex gibt man zu den etwa 90 %ig konfluenten Zellen, die am Tag zuvor ausgesät wurden und das Medium kurz vor Zugabe durch OPTI-MEM

ersetzt wurde. Nach vier bis sechs Stunden wurde das Medium gewechselt und nach weiteren 24 bis 48 Stunden konnte mit der Selektion begonnen werden.

4.2.3 Elektroporation

Die besonders schnelle Methode der Elektroporation eignet sich besonders für Suspensionszellen und Zellen die schwer zu transfizieren sind. Hierbei wird eine Zellsuspension von $1-3 \cdot 10^6$ Zellen in 800 μ l Elektroporationspuffer und 20 μ g Plasmid-DNA hergestellt, in eine Elektroporationsküvette mit einem Elektrodenabstand von 2 mm überführt und in einem Elektroporator (BioRad) einem Spannungsimpuls von 240 V und 500 μ F ausgesetzt. Diese Zellsuspension wird mit Medium verdünnt und ausgesät. Nach 24 bis 48 Stunden wurde mit der Selektion begonnen und mit 500 μ g/ml G418 14 Tage lang durchgeführt.

<u>Elektroporationspuffer (Capecchi-Puffer):</u>	20 mM HEPES	pH 7,0
	137 mM NaCl	
	5 mM KCl	
	0,7 mM Na₂HPO₄	
	6 mM Glucose	
	0,1 mM β-Mercaptoethanol	

4.2.4 Transduktion

Der 24 bis 48 Stunden alte Virusüberstand der Verpackungszelllinie ψ CRE wurde zunächst mit einem PVDF-Spritzenfilter der Porengröße 0,45 μ m filtriert, auf die entsprechende Viruskonzentration mit Medium verdünnt und mit Polybren versetzt. Polybren ist ein Polykation und wird verwendet, um durch Abschirmung von Ladungen auf der Zellmembranoberfläche das Eindringen der Viren in die Zelle zu erleichtern. Die Endkonzentration von Polybren betrug zwischen 5 und 10 μ g/ml. Dieses Virus enthaltende Medium wurde nun zu den zu transfizierenden Zellen gegeben und inkubiert. Nach 6 bis 24 Stunden wurde das Medium mit dem entsprechenden Kulturmedium ersetzt. Die Selektion mit 250 μ g/ml Hygromycin B konnte dann nach weiteren 24 Stunden begonnen werden und muss 14 Tage andauern, wenn stabil transfizierte Zellen erhalten werden sollen.

4.2.5 Virustiterbestimmung

Die mit einem PVDF-Spritzenfilter mit 0,45 µm Porengröße gefilterten und mit Polybren versetzten Virusüberstände wurden fünfmal seriell 1 : 10 verdünnt und je 1 ml als Doppelbestimmung auf ca. 50 %ig konfluenten NIH3T3-Zellen in 12er Multiwells gegeben. Nach 24 Stunden wurde mit der Selektion begonnen und 14 Tage lang durchgeführt. Zur Selektion wurde Hygromycin B mit einer Endkonzentration von 200 µg/ml verwendet. Anhand der Anzahl der entstandenen Klone kann auf den Virustiter geschlossen werden. Er berechnet sich aus der Anzahl der Klone auf dem Well mit der höchsten Verdünnung multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor pro Milliliter und wird mit cfu/ml (colony forming units pro Milliliter) angegeben.

4.2.6 Viabilitätsmessung mit Trypanblau

Zur Bestimmung der totalen Zellzahl und der Lebendzellzahl wurden aus frisch suspendierten Zelllösungen 20 µl Aliquots entnommen und mit 80 µl einer 0,4 %igen Trypanblau-Lösung in HBBS-Puffer verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Trypanblau lagert sich an Proteinstrukturen des Cytoplasmas an, kann aber nur in Zellen mit permeabler Zellmembran eindringen und färbt so selektiv tote Zellen blau an.

1× HBSS (Hanks balanced salt solution):

137 mM NaCl
5,4 mM KCl
0,3 mM Na₂HPO₄
4,2 mM NaHCO₃
0,4 mM KH₂PO₄
0,5 mM MgCl₂
1,3 mM CaCl₂
0,6 mM MgSO₄
5,6 mM Glucose
pH 7,4 mit 1N NaOH einstellen

4.2.7 Fixierung und X-Gal-Färbung von Zellkulturen

Zur Bestimmung von Transfektionseffizienzen wurden Zellen mit einem *lacZ* enthaltenen Plasmid als Reportergen transfiziert. Dazu wurden die Zellen 24 Stunden nach der Transfektion nach zweimaligem Waschen mit PBS zunächst fixiert. Das erfolgt durch fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur mit 2 ml Fixierungslösung pro Schale

(Ø 10 cm). Nach wiederholtem zweifachen Waschen mit PBS wurden die Zellen mit X-Gal-Lösung behandelt und 6 bis 48 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die β -Galaktosidase, die das *lacZ*-Gen exprimiert, setzt das gelbe X-Gal zu einem blauen Farbstoff um.

Fixierlösung: 2 % (v/v) Formaldehyd
 0,2 % (v/v) Glutaraldehyd
 in 1 × PBS

X-Gal-Lösung: 5 mM $K_4[Fe(CN)_6]$
 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ 74 mg
 2 mM $MgCl_2$
 1 mg/ml X-Gal (Stammlösung: 2%ig in DMSO)
 in 1 × PBS

4.2.8 Proliferationsassays

Diese Assays wurden mit den Serotonin produzierenden SHP-77-Zellen (kleinzelliger Lungenkrebs) durchgeführt, um die Wirkung von 7-HTP auf die Proliferation dieser Zellen zu untersuchen.

Es wurden zunächst 2500 Zellen je 96er Well in 100 μ l ausgesät und 15 min später mit 2 mM bzw. 4 mM 7-HTP behandelt. Nach 48 Stunden wurde jeweils 1 μ l (1 μ Ci) Methyl- $[^3H]$ -Thymidin zugegeben und nach weiteren sieben Stunden die Zellkulturen für die Messung aufgearbeitet. Dazu wurden die Überstände abgenommen und die Wells einmal mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen mit je 100 μ l Trypsin/EDTA abgelöst und noch zweimal mit PBS gewaschen. Die gesammelte Überstände wurden 5 min lang bei 200 × g zentrifugiert und das Zellpellet nach einmaligem Waschen mit PBS in 200 μ l Wasser aufgenommen und 10 min sonifiziert, um die Zellen zu lysieren. Anschließend wurde durch Zugabe von 550 μ l Ethanol die Nukleinsäuren und Proteine gefällt und 20 min lang bei 4 °C und 20000 × g abzentrifugiert und mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde in 200 μ l TE-Puffer aufgenommen und nach zehnmütigem Denaturieren bei 95 °C über Nacht bei 55 °C mit 1 mg/ml Proteinase K verdaut. Der gesamte Ansatz wurde dann in 5 ml Szintillationsflüssigkeit überführt und im Szintillationsmeßgerät vermessen.

4.3 Bakterien

Bakterien der Stämme *Escherichia coli* K12DH5 α (Hanahan, 1983) und SURE (Stratagene, USA) wurden in LB- und im reichhaltigeren 2 \times YT-Medium bei 37 °C und 220 upm in einem Schüttelinkubator zur Belüftung kultiviert. Beide Medien wurden auch zur Konservierung bei -80°C verwendet, nachdem sie auf 20 % (w/v) Glycerin eingestellt waren. Die *E. coli*-Stämme dienten für die verschiedenen Klonierungsarbeiten und zur Amplifikation von Plasmiden. Für Transformationen, bei denen es nicht auf hohe Transformationsraten ankam, wurden kompetente Zellen nach der CaCl₂-Methode (Mandel und Higa, 1979; Dagert und Ehrlich, 1979; Hanahan *et al.*, 1991) verwendet.

Transformanten wurden immer unter Selektivbedingungen gehalten (100 μ g/ml Ampicillin oder 50 μ g/ml Kanamycin).

Den Medien wurden 15-20 % Bactoagar zugegeben, um die Bakterien auf festen Nährböden zu kultivieren. Die angeimpften Petrischalen mit dem festen Medium wurden bei 37 °C in einem Brutschrank inkubiert.

<u>2 \times YT-Medium:</u>	10 g Hefeextrakt	<u>LB-Medium:</u>	5 g Hefeextrakt
	16 g Bactotrypton		10 g Bactotrypton
	5 g NaCl		10 g NaCl
	ad 1000 ml H ₂ O (bidest.)		ad 1000 ml H ₂ O (bidest.)

5 ALLGEMEINE MOLEKULARBIOLOGISCHE TECHNIKEN

Allgemeine molekularbiologische Grundtechniken der DNA-Manipulation und proteinchemische Methoden wurden nach Maniatis (Sambrook *et al.*, 1989) durchgeführt. Auf die Beschreibung von Vorschriften allgemein bekannter Labor-Handbücher wurde hier zugunsten spezieller Techniken verzichtet, die nur der Primärliteratur entnommen werden konnten.

Bei Nachweismethoden, Konzentrationsbestimmungen und Isolierungsmethoden, sowie bei weiteren Techniken für die es alternative Vorschriften gibt, wird die gewählte Methode angegeben, um die Reproduzierbarkeit der Versuche zu gewährleisten.

6 PROTEINCHEMISCHE METHODEN

6.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford (1976). Verschiedene BSA-Konzentrationen dienten als Standardreihe. Verdünnungsreihen der Testlösungen wurden mit Bradford-Reagenz versetzt. Nach fünf Minuten wurden die OD₅₉₅-Werte im Spektrophotometer vermessen und mit Hilfe der Standardreihe ausgewertet.

Bradford-Reagenz: **100 mg Coomassie Brilliant Blue G 250**
 100 ml 85 % (w/v) Phosphorsäure
 50 ml abs. Ethanol
 ad 1 l Wasser

6.2 Isolierung und Lagerung von Proteinen

6.2.1 Protein-Isolierung mit TRIZOL

Denaturierte Proteinproben lassen sich mit dem phenolhaltigen TRIZOL-Reagenz (Gibco BRL, Eggenstein) isolieren, die sich durch hohe Homogenität und geringe Proteolyse auszeichnen und damit besser für DISK-SDS-PAGE und Immunoblots geeignet sind als Proteinproben, die durch nativen Zellaufschluss erhalten werden. Aufschluss und Verarbeitung von Zellkulturen und von Geweben mit TRIZOL erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Die Proteinproben konnten dann in gefälltem Zustand unter Ethanol für längere Zeit bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt werden. Für DISK-SDS-PAGE in SDS gelöste Proben wurden bei -80 °C gelagert. Wegen der hohen SDS-Konzentration mussten die Proben für die Konzentrationsbestimmung 1 : 10 und 1 : 100 verdünnt werden, bevor sie mit dem Bradford-Reagenz versetzt werden konnten (vgl. Abschnitt II.6.1).

6.2.2 Protein-Isolierung durch nativen Zellaufschluss

Speziell für enzymatische Tests musste das Protein in seiner nativen Form erhalten werden. Aus den Kulturschalen gekratzte Zellkulturen und Gewebeproben wurden dafür zunächst

schnell auf Trockeneis eingefroren, gewogen und bis zu ihrer Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. In einem für die TPH-Assays geeigneten Aufschlusspuffer wurden die Proben bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ schnell homogenisiert und dann unverzüglich in den Enzymassays verwendet.

Aliquots der Proben wurden mit DNase I und RNase A versetzt und für 15 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Dann wurden Verdünnungsreihen für die Konzentrationsbestimmung angefertigt und vermessen (vgl. Abschnitt II.6.1).

Aufschlusspuffer: **50 mM Tris-Acetat-Puffer** **pH 7,5**
 4 mM Natriummetabisulfit
 2 mM DTT
 1 mM PMSF

6.3 TPH-Assay

6.3.1 Reaktionsbedingungen

Aus den zahlreichen unterschiedlichen Vorschriften für TPH-Assays (Gal und Patterson, 1973; Meek und Neckers, 1975; Yamaguchi *et al.*, 1981; Suzuki *et al.*, 1983; Fujisawa und Nakata, 1987; Hasegawa und Ichiyama, 1987) wurden die Assays auf unsere experimentellen Möglichkeiten adaptiert.

Bei der Homogenisierung der Proben nach Abschnitt II.6.2.2 wurde darauf geachtet, dass ca. 0,1 bis 10 mg Protein für jeden Einzeltest verfügbar waren, abhängig von den erwarteten Spezifitäten. Dabei wurde die Faustregel angewandt, dass ca. ein Zehntel des Feuchtgewichts von Geweben und Zellkulturen Protein sind. Die genauen Gesamtproteinmengen wurden dann nach den Assays anhand von Aliquots der homogenisierten Proben, wie oben beschrieben, bestimmt.

Für den Assay wurden die homogenisierten Proben zunächst 20 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 13000 upm zentrifugiert, um Zellebris zu entfernen. Die zytosolischen Überstände wurden dann in einem Endvolumen von 100 μl 80 mM Tris-Acetat (pH 7,5), 2 mg/ml Katalase, 25 mM DTT und 100 μM $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ für 10 min bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Dunklen präinkubiert. Die präinkubierten Proben wurden dann in einem Endvolumen von 500 μl 15 - 16 mM Tris-Acetat (pH 7,5), 400 μM L-Trp, 300 μM 6MPH₄ und 2 mM NSD1015 (einem Inhibitor der AAADs) für 30 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ lichtgeschützt inkubiert, wonach die Reaktionen durch Zugabe von 40 μl 70 %iger Perchlorsäure beendet wurden. Danach wurden die Reaktionsansätze 30 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 13000 upm zentrifugiert und die Überstände bis zur Untersuchung bei

-80 °C aufbewahrt. Für die kinetischen Untersuchungen wurden die Konzentrationen entweder von Trp oder der drei Kofaktoren 6MPH₄, DMPH₄ oder BH₄ von 0 - 2 mM variiert, um jeweils 12 Messpunkte zu erhalten.

6.3.2 Detektion von 5-HT-Metaboliten mittels HPLC-FD

Für die Analytik von Gewebs- und Körperflüssigkeitsgehalten der Metaboliten, wurden die Proben gewogen und bei 4 °C in 50 mM Tris-Acetat-Puffer pH 7,5 und 5 mM Natriummetabisulfit und 10 mM Ascorbinsäure als Antioxidantien homogenisiert. Das Protein wurde dann durch Zugabe von 100 mM Perchlorsäure ausgefällt und durch Zentrifugation bei 4 °C und mit 12000 × g abgetrennt.

Die deproteinisierten Überstände der Gewebeproben und der TPH-Assays wurden direkt in das HPLC-FD-System injiziert. Zur Trennung wurde, methodisch an Yamaguchi *et al.* (1981) angelehnt, eine C18-Reversed-Phase-Säule (Vydac, type 218TP104) verwendet, auf der Trp, 5-HTP, 5-HT und 5-HIAA aufgetrennt werden konnten. Es wurde außerdem ein spektrofluorometrischer Detektor von Shimadzu (RF-10AXL, Shimadzu, Duisburg) zur kontinuierlichen Fluoreszenz-Messung des Säulen-Eluats mit der Anregungswellenlänge bei 295 nm und Detektion bei 345 nm verwendet. Der Elutionspuffer, 10 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 5,0) mit 5 % Methanol, wurde mit 2 ml/min durch die Säule gepumpt. Peakhöhen und -flächen wurden gemessen und mit Hilfe von Eichkurven in pg bis ng umgerechnet.

6.4 DISK-SDS-PAGE

Die DISK-SDS-PAGE von Proteinen wurde nach Laemmli (1970) durchgeführt. Es wurden 10 - 15 %ige Gele eingesetzt (davon 0,4 % (v/v) BIS). Die Sammelgele enthielten 3 % Acrylamid (davon 0,4 % (v/v) BIS). Die SDS-Konzentrationen im Gel und in den Proben waren mit 1 % gleich. Standardmäßig wurden als Sammel- und Trennpuffer 62 mM Tris-HCl pH 6,8 bzw. 0,5 mM Tris-HCl pH 8,8 verwendet. Der Elektrophoresepuffer bestand aus 25 mM Tris, 192 mM Glycin und 7 mM SDS. Die Proteinproben wurden mit Probenpuffer im Verhältnis 5:1 gemischt und kurz aufgeköcht.

Die Proteinproben ließ man immer bei 12 mA im Sammelgel bündeln, wonach ihre Bestandteile bei 25 - 50 mA im Trenngel nach ihrer Molekularmasse aufgetrennt wurden. Als

Referenz wurden geeignete Molekulargewichtsmarker (Sigma, Deisenhofen) eingesetzt. Die Gele wurden dann entweder mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt (Färbelösung: 50 % Methanol, 10 % Essigsäure und 1 g/l Coomassie Brilliant BlueR-250; Entwickler: 20 % Methanol und 10 % Essigsäure), oder sie wurden für Westernblot-Analysen (Immunoblots) verwendet.

Probenpuffer: 15 % β -Mercaptoethanol
 5 % SDS
 1.5 % Bromphenolblau
 50 % Glycerin

6.5 Westernblot

Proteine aus SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAG) wurden bei 5 mA/cm² Gel für 15 - 20 min elektrophoretisch auf Nitrocellulose-Membranen (NCM) übertragen. Dafür wurden von der Anode zur Kathode ein Sandwich eingespannt, bestehend aus drei mit Blotting-Puffer getränkten Filterpapieren (Whatman 3MM), der NCM (in H₂O bidest. getränkt), dem Gel und wieder drei Lagen getränktes Filterpapier.

Die NCM wurde anschließend 5 min mit PBS-Tween gewaschen. Dann wurde die Oberfläche für eine Stunde mit 3 % BSA in PBS-Tween bei Raumtemperatur abgesättigt und danach dreimal für 10 min mit PBS-Tween gewaschen. Nach dem Waschen wurde die NCM in PBS-Tween und dem ersten Antikörper im Verhältnis 1 : 1000 bis 1 : 10000 für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Filter dreimal 10 min mit PBS-Tween gewaschen und für eine Stunde mit dem markiertem zweiten Antikörper behandelt (1 : 15000 verdünnt in PBS-Tween). Danach wurde dreimal 10 min mit PBS-Tween gewaschen.

Für den Nachweis gebundener Alkalischer Phosphatase wurde die NCM mit 10 ml Substratpuffer (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) mit 66 μ l NBT (Nitro-Blue-Tetrazolium, 50 mg/ml in 70 %igem DMF) und 33 μ l BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat, 50 mg/ml in 100 %igem DMF) gelegt, wonach immunreaktive Banden nach 10 bis 20 min durch violetten Farbniederschlag auf der Membran sichtbar wurden (Harlow und Lane, 1988).

7 NUKLEINSÄURE-MANIPULATIONEN

7.1 Konzentrationsbestimmung

OD₂₆₀ und OD₂₈₀ der DNA-Lösungen wurden am Spektrophotometer bestimmt. Bei einem Absorptionsverhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ > 1,7 wurde die Proteinkonzentration vernachlässigt und nach OD₂₆₀ = 1 \cong 50 μ g/ml doppelsträngige DNA berechnet. Bei kleineren Verhältnissen wurden die Proben durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Fällung gereinigt und erneut vermessen. Zweifelhafte Messungen wurden durch gelelektrophoretischen Vergleich mit DNA-Proben bekannter Konzentrationen überprüft. RNA-Konzentrationen wurden nach OD₂₆₀ = 1 \cong 40 μ g/ml berechnet.

7.2 Isolierung von Nukleinsäuren

7.2.1 Genomische DNA

Für die Isolierung genomischer DNA wurde die Methode von Hogan *et al.* (1986) stark vereinfacht: ca. 1 cm lange Schwanzbiopsien (s. Abschnitt II.8.2.5) wurden über Nacht bei 55 °C in 700 μ l Tail-Puffer mit 0,5 mg/ml Proteinase K verdaut. Am nächsten Morgen wurden 300 μ l gesättigte NaCl-Lösung hinzugegeben und 5 - 10 min auf Eis gestellt, um das Protein auszufällen. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 4 °C und 13000 upm wurde der klare Überstand abgenommen und mit 20 μ g/ml RNase A für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die DNA fällte man dann mit 1 ml Isopropanol und pelletierte bei 13000 upm und 4 °C. Mit 70 %igem Ethanol wurde das Pellet gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend luftgetrocknet und in 200 μ l TE-Puffer gelöst, wonach die Konzentration bestimmt wurde. Für PCR-Untersuchungen wurden Aliquots der DNA-Lösungen standardmäßig auf 25 ng/ μ l verdünnt und vor Gebrauch 10 min bei 95 °C denaturiert.

Ausgestanzte Ohrbiopsien wurden vier Stunden bei 55 °C in 100 μ l Ohren-Puffer mit 1 mg/ml Proteinase K verdaut, wonach die Proteinase K für 10 min bei 95 °C inaktiviert wurde. Anschließend wurden 750 μ l TE-Puffer mit 20 μ g/ml RNase A zugegeben und 15 min bei 37 °C inkubiert. Für PCR-Untersuchungen konnten dann direkt 4 μ l der Proben verwendet werden.

<u>TE-Puffer:</u>	10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA
<u>Tail-Puffer:</u>	50 mM Tris-HCl pH 8,0 100 mM EDTA 100 mM NaCl 1 % SDS
<u>Ohren-Puffer:</u>	100 mM Tris-HCL pH 8,0 5 mM EDTA 200 mM NaCl 0,2 % SDS

7.2.2 Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde entweder durch alkalische Lyse (Birnboim und Doly, 1979) im Minimaßstab oder über QIAquick-Säulen (Qiagen) entsprechend den Angaben des Herstellers isoliert.

7.2.3 DNA-Fragmente aus Agarosegelen

Das Fragmentgemisch wurde in einem 0,7 – 3 %igem Agarosegel aufgetrennt. Unter langwelligem UV-Licht (300 nm) wurde die gewünschte DNA-Bande ausgeschnitten, in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit Phenol, pH 7,5, überschichtet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurde 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert, um die organische Phase mit der Agarose von der wässrigen Phase zu trennen. Die wässrige Phase wurde abpipettiert, mit Chloroform extrahiert, eine Ethanolpräzipitation der DNA durchgeführt und das Pellet in TE-Puffer aufgenommen. Die Ausbeute wurde dann gelelektrophoretisch untersucht.

7.2.4 Konstrukte für die Transfektion von Säugerzellen

Plasmid-DNAs mit den zu transfizierenden Konstrukten wurden mit Hilfe von QIAquick-Säulen (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers gereinigt und dabei mit 10 mM Tris-Puffer, pH 8,5, eluiert. Alternativ wurden auch Plasmid-DNAs verwendet, die während der Plasmidpräparation über eine Säule gereinigt, gefällt und in TE-Puffer aufgenommen wurden, verwendet.

7.2.5 Konstrukte für die Mikroinjektion

Die Konstrukte für die Mikroinjektion müssen frei von Sequenzen des Konstruktionsvektors sein, weshalb sie von Beginn an so konzipiert wurden, dass eine vollständige enzymatische Abspaltung erfolgen kann. 20 µg der Plasmid-DNAs mit den Konstrukten wurden daher zunächst mit den geeigneten Restriktionsendonukleasen verdaut (s. Abschnitt II.7.4.3) und auf einem 0,8 %igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Konstrukt-DNAs wurden dann, wie oben beschrieben, aus den Agarosegelen eluiert.

Das isolierte Konstrukt wurde dann erneut einer Elektrophorese mit 0,8 %igem Agarosegel unterzogen und dann mit Hilfe einer QIAquick-Säule nach den Angaben des Herstellers aus dem Gel extrahiert. Die DNA wurde dann mit Mikroinjektionspuffer von der Säule eluiert, wonach die Konzentration spektrophotometrisch und mit Hilfe komparativer Agarosegelelektrophorese ermittelt wurde. Die erhaltene Konstrukt-DNA wurde dann auf 2 ng/µl in Mikroinjektionspuffer verdünnt und in dieser Konzentration in die Vorkerne von Oozyten injiziert (s. Abschnitt II.8.2.3).

Mikroinjektionspuffer: 8 mM Tris-HCl pH 7,4
 0,15 mM EDTA
 Puffer über Sterilfilter (0,25 µm) von
 Schwebeteilchen befreien.

7.2.6 Kurze doppelsträngige DNA aus synthetischen Oligonukleotiden

Synthetische DNA-Oligonukleotide wurden entsprechend der Konzentration von 100 µM in TE-Puffer aufgelöst (Tabelle II.1). Zum Annealen der Oligonukleotide wurden gleiche Volumina der sense- und antisense-DNAs gemischt und 50 mM NaCl zugegeben. Anschließend wurden die Lösungen 5 min bei 95 °C denaturiert und im Heizblock langsam auf Raumtemperatur abkühlen gelassen.

Annealing-Puffer: 10 mM Tris-HCl pH 8,0
 1 mM EDTA
 50 mM NaCl

Die Sequenzen der DNA-Oligonukleotide, die für die Klonierung der Ribosomkonstrukte gegen TPH1 und TPH2 verwendet wurden sind in Tabelle II.1 angegeben.

Tabelle II.1: Synthetische DNA-Oligonukleotide, die den drei Ribozymen Rz186, Rz793 und Rz1218 gegen TPH1 und den vier Ribozymen nRz916, nRz1275, nRz1440 und nmRz1275 gegen TPH2 entsprechen. Die je zwei bindenden Sequenzen sind fett hervorgehoben.

Name	Orientierung	Sequenz
antiTPH1		
Rz186	sense	5'-GATCCATGAAGTTTCGTTTTCTCATCAGGGAGGACG-3'
Rz186	antisense	5'-AATTCGTCCTCCCTGATGAGAAAACGAACTTCATG-3'
Rz793	sense	5'-GATCCCATCCGTTTCGTTTTCTCATCAGCTGTGGCG-3'
Rz793	antisense	5'-AATTCGCCACAGCTGATGAGAAAACGAAACGGATGG-3'
Rz1218	sense	5'-GATCCAGGATGTTTCGTTTTCTCATCAGTACTTTGG-3'
Rz1218	antisense	5'-AATCCAAAGTACTGATGAGAAAACGAAACATCCTG-3'
antiTPH2		
nRz916	sense	5'-GATCCAAGACGTTTCGGCCTCACGGCCTCATCAGTCCATGTG-3'
nRz916	antisense	5'-AATTCACATGGACTGATGAGGCCGTGAGGCCGAAACGTCTTG-3'
nRz1275	sense	5'-GATCCCTTTCGTTTCGGCCTCACGGCCTCATCAGCATCGGAG-3'
nRz1275	antisense	5'-AATTCTCCGATGCTGATGAGGCCGTGAGGCCGAAACGAAAGG-3'
nRz1440	sense	5'-GATCCGCAAAGTTTCGGCCTCACGGCCTCATCAGAATTACCG-3'
nRz1440	antisense	5'-AATTCGGTAATTCTGATGAGGCCGTGAGGCCGAAACTTTGCG-3'
nmRz1275	sense	5'-GATCCCTTTCGTTTCGTCACCTCATCAGCATCGGAG-3'
nmRz1275	antisense	5'-AATTCTCCGATGCTGATGAGGTGACGAAACGAAAGG-3'

7.2.7 RNA und mRNA aus Zellkulturen und Geweben

Total-RNA aus Zellkulturen und Geweben wurde mit TRIZOL-Reagenz (Gibco BRL, Eggenstein) nach den genauen Angaben des Herstellers isoliert. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass intakte RNA mit nur sehr geringer DNA-Kontamination erhalten werden kann, und dass gleichzeitig auch DNA und Proteine isoliert werden können (s. Abschnitt II.6.2.1).

Bei sehr niedrigen Konzentration an *Tph*-Transkripten wurde die mRNA dann mit Biotinyl-(dT)₁₈ und Streptavidin beschichteten magnetischen Kügelchen (Promega) angereichert.

7.2.8 RNA-Fragmente aus denaturierenden Gelen

Die gewünschten RNA-Fragmente wurden nach der Trennung unter langwelligem UV-Licht (300 nm) aus denaturierenden Agarosegelen ausgeschnitten und nach dem Überschichten mit Phenol (pH 5,5) in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die weitere Behandlung erfolgte wie für die Isolierung von DNA (s. Abschnitt II.7.2.3). Das Pellet wurde aber nach der Fällung in DEPC-Wasser aufgenommen. Die Isolierung von radioaktiv markierten RNA-Fragmenten aus denaturierenden Polyacrylamidgelen erfolgte durch Elution über Nacht bei 37 °C mit einem Elutionspuffer (aus dem RPAII-Kit, Abschnitt II. 7.8). Zum Identifizieren der Banden wurde das Gel zuerst etwa 30 s auf einer Phosphoimagerplatte exponiert und dann ein 1 : 1-Ausdruck unter das Gel gelegt.

Elutionspuffer: **0,5 M NH₄-Acetat**
 1 mM EDTA
 0,2 % SDS

7.3 Lagerung von DNA und RNA

DNA wurde bei -20 °C oder für langfristige Lagerung bei -80 °C in TE-Puffer aufbewahrt. Unbegrenzt haltbar wurde sie nach Ethanolfällung trocken bei Raumtemperatur gelagert. RNA wurden stets in DEPC-Wasser bei -80 °C gelagert und bei Bedarf auf Eis aufgetaut.

TE-Puffer: **10 mM Tris-HCl pH 8,0**
 1 mM EDTA

DEPC-Wasser: **0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC)**
 Über Nacht bei 37 °C, dann autoklaviert

7.4 Enzymatische Manipulationen der DNA

7.4.1 Klonierung der Ribozymkonstrukte

Die Klonierungen der Ribozymkonstrukte wurde in pBluescript II SK (+) (Stratagene, USA) durchgeführt. Für die *in vitro* Transkription, also die Herstellung der Ribozyme, sollte der T7 RNA-Promotor benutzt werden und deshalb wurden zunächst alle Restriktions-

schnittstellen zwischen dem Promotor und der *Eco* RI-Schnittstelle deletiert. Das erfolgte durch Verdau des Vektors mit *Kpn* I, abstumpfen der kohesieven Enden durch eine T4 DNA Polymerase-Reaktion, ein weiterer Verdau mit *Eco* RV, der stumpfe Enden generiert und anschließender Religation. Dieser deletierte Bluescript-Vektor wurde nun mit *Eco* RI und *Bam* HI doppelverdaut. Hier konnten die doppelsträngigen Ribozym-DNAs Rz186, Rz793 und Rz1218, die über *Eco* RI- und *Bam* HI-kompatible Enden verfügen durch Ligation eingefügt werden. Vorbereitend für die *in vitro* Transkription, wurde der Vektor mit *Spe* I linearisiert (Abbildung II.1).

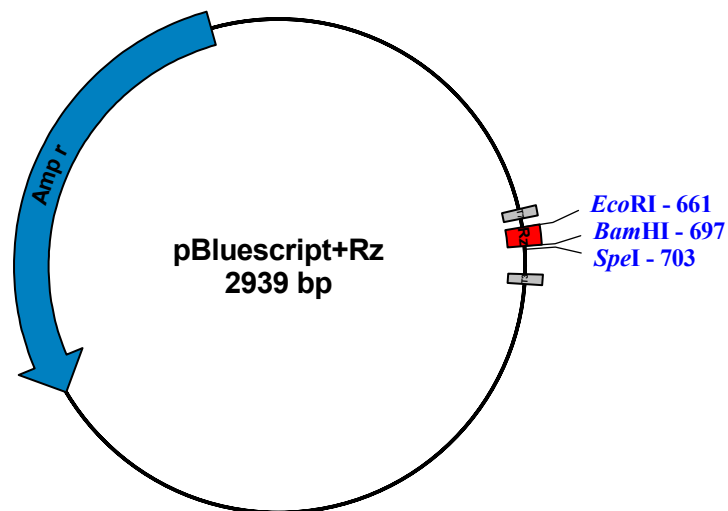


Abbildung II.1: Plasmidkarte der Ribozym-Konstrukte in pBluescript II SK(+). Die Plasmide enthalten den T3- und den T7-RNA-Polymerase-Promotor (grau) und jeweils eines der drei Ribozyme: Rz186, Rz793 und Rz1218 (rot).

7.4.2 Klonierung der in tRNA^{Met} integrierten Ribozym-Konstrukte

Das von der Firma ATUGEN zur Verfügung gestellte tRNA^{Met}-Konstrukt wurde mit Hilfe einer PCR und den Primern TRZfor und TRZrev amplifiziert und nach Isolierung aus einem Agarosegel in den pGEM[®]-T-Vektor (Promega, USA) ligiert (Abbildung II.2).



Abbildung II.2: Mit PCR amplifiziertes tRNA^{Met}-Konstrukt. Die Primer-Bindungssequenzen sind unterstrichen, die Restriktionsschnittstellen kursiv dargestellt. Der interne RNA-Polymerase III-Promotor, bestehend aus A- und B-Box, ist eingerahmt.

Anschließend wurde der Vektor mit *Eco RI* und *Bam HI* doppelverdaut und die doppelsträngigen Ribozym-DNAs Rz186, Rz793 und 1218 mit den *Eco RI*- und *Bam HI*-kompatiblen Enden durch Ligation eingefügt. Die Kontrolle der Orientierung der tRNA-Ribozym-Kassette im Plasmid und der korrekten Sequenz erfolgte durch Sequenzierung. Um eine *in vitro* Transkription, also der Herstellung der katalytischen tRNA-Ribozyme (im weiteren als tRz bezeichnet) durchführen zu können, mussten die Plasmide zuvor linearisiert werden. Das erfolgte entsprechend der Orientierung im Vektor mit *Sac II*, was dann die Verwendung der SP6-RNA-Polymerase in der Transkriptionsreaktion erforderlich machte (Abbildung II.3).

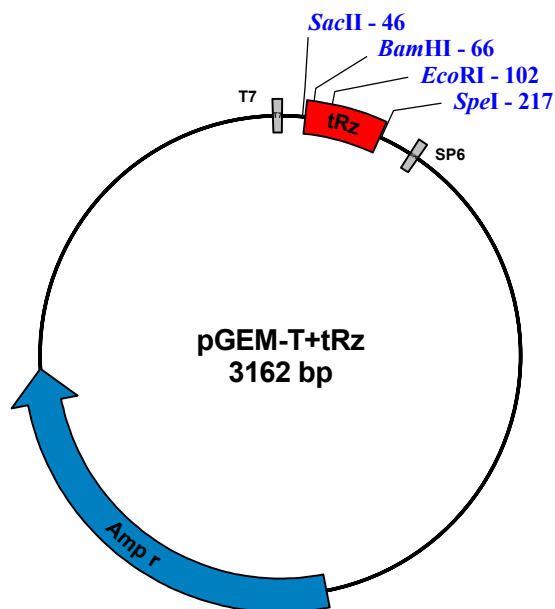


Abbildung II.3: Plasmidkarte der tRNA-Ribozym-Konstrukte (tRz) in pGEM[®]-T. Die Plasmide enthalten den SP6- und den T7-RNA-Polymerase-Promotor (grau) und jeweils eines der drei Ribozyme: Rz186, Rz793 und Rz1218 eingefügt im tRNA^{Met}-Konstrukt (rot).

Für die Transduktion von Zellen und die Erzeugung transgener Tiere mit Retroviren wurden die tRz-Konstrukte in den retroviralen Vektor pMSCVhyg (BD Biosciences, USA) kloniert. Dafür wurden zunächst die tRz-Konstrukte aus den pGEM[®]-T-Vektor (Promega, USA) wie folgt herausgeschnitten: nach Restriktion mit *Nco* I wurden die kohesiven Enden mit Hilfe von T4-DNA-Polymerase in stumpfe Enden umgeformt. Nun konnte das tRz-Fragment mit *Sal* I herausgeschnitten und in den mit *Xho* I (*Sal* I-kompatibel) und *Hpa* I (stumpfe Enden) geschnittenen pMSCVhyg-Vektor ligiert werden (Abbildung II.4).

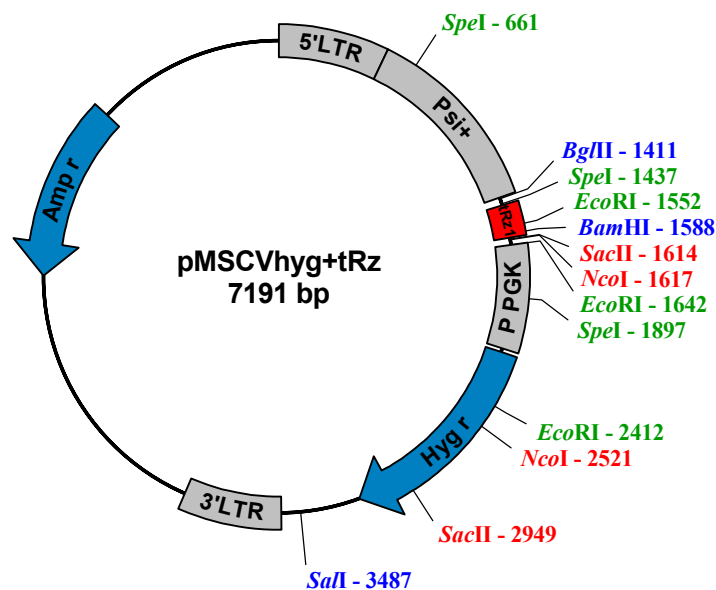


Abbildung II.4: Plasmidkarte der tRNA-Ribozym-Konstrukte (tRz) in pMSCVhyg. Die Plasmide enthalten ein Hyromycin-Resistenzgen (blau) mit dem PKG-Promotor (grau), die 5'- und 3'-LTRs (long terminal repeats) als Promotor für die Vierenexpression (grau), die ψ^+ -Verpackungssequenz (grau) und jeweils eines der drei tRNA^{Met}-Ribozym-Konstrukte (rot): tRz186, tRz793 und tRz1218.

7.4.3 Klonierung der Substrat-Vektoren

Um Substrat-RNAs für *in vitro* Spaltversuche zu erhalten, wurden drei TPH1-Fragmente der Maus-cDNA mit den entsprechenden Ribozymschnittstellen in den pBluescript II SK (+)- (Stratagene, USA) oder pGEM[®]-T-Vektor (Promega, USA) kloniert, die dann nach Linearisierung des Vektors unter Verwendung des T3- oder T7-RNA-Promotors für die *in vitro* Transkription eingesetzt wurden.

Tabelle II.2: Vektoren mit den TPH1-Fragmenten S186, S793 und S1218. Dargestellt sind die Position der Fragmente im TPH1-Gen, in welchen Vektor sie kloniert wurden und die einzelnen Klonierungsschritte.

Fragment	Position	Vektor	Klonierung
S186	87-297	pBluescript II SK	1. PCR: TPHEX2b/ TPHEX3b 2. Restriktion: <i>Hinc</i> II
S793	534-888	pGEM-T	PCR: TPHEX5/ TPHEX7
S1218	979-1354	pBluescript II SK	Restriktion: <i>Bst</i> XI/ <i>Spe</i> I

7.4.4 Klonierung der TPH2-Expressions-Konstrukte

Für die Klonierungen wurde von cDNAs ausgegangen, die durch RT-PCR mit dTAnchor-Primern (Maus und Ratte) oder Random Hexamer-Primern (Mensch) erzeugt wurden. Mit Hilfe von touch down long range PCR (s. Abschnitte II.7.4.7.2 und II.7.4.7.3) wurden mit den Primern NTPHEX1b/NTPHEX11a ein 1,7 kb langer Abschnitt des TPH2-Gens amplifiziert (s. Tabelle II.1 für genaue Primer-Daten). Das 1,7 kb lange Amplikon wurde zunächst in den pGEM[®]-T-Vektor (Promega, USA) kloniert. Auf diese Weise sind auch für Sequenzierungen mit anderen Primerpaaren Abschnitte des Gens kloniert worden.

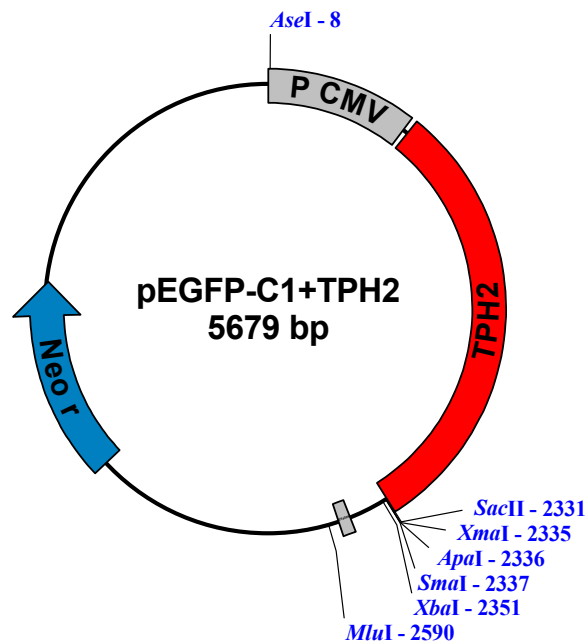


Abbildung II.5: Plasmidkarte der TPH2-Konstrukte in pEGFP-C1. Die Konstrukte enthalten den CMV-Promotor (grau) und die SV40pA-Polyadenylierungssequenz (grau). Das Expressionskonstrukt enthält die vollständige cDNA der Ratten-, Maus- bzw. humanen TPH2 (rot). Die Plasmide enthalten weiterhin ein Neomycin-Resistenzgen (blau).

Die Klonierungen der Expressions-Konstrukte erfolgte dann in pEGFP-C1 (Clontech, USA). Dieser besitzt neben den für die Expression notwendigen Promotor (CMV-Promotor) und SV40polyA-Sequenz auch eine Neomycin-Resistenzkassette. Vorbereitend wurde dafür zuerst die EGFP-Kassette mit *Nhe I/Sac II* herausgeschnitten und die mit einem *Spe I/Sac II*-Verdau aus dem pGEM[®]-T-Vektor isolierte TPH2-Kassette in den pEGFP-C1-Vektor ligiert, womit der fertige TPH2-Expressions-Vektor pEGFP-C1+TPH2 erhalten wurde (Abbildung II.5).

7.4.5 Restriktionsschnitte von DNA

Die Restriktionsenzyme wurden von den Herstellern zusammen mit den für sie optimierten Puffern geliefert. Ein analytischer Restriktionsansatz enthielt ca. 200 ng bis 1 µg DNA in 9µl TE-Puffer, 1 µl des entsprechenden 10fach-Puffers und 0,5 bis 1 u des Restriktionsenzym. Der Ansatz wurde 1 bis 2 Stunden bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert. Für eine präparative Verdauung wurden bis zu 50 µg DNA in einem entsprechend vergrößertem Volumen mit 5 bis 50 u Restriktionsenzym eingesetzt. Bei Doppelverdauungen wurde ein Restriktionspuffer gewählt, in dem beide Restriktionsenzyme über ausreichende Aktivität verfügten.

Fragmente, die aus den Restriktionsansätzen isoliert werden sollten, wurden durch Auftrennung des Fragmentgemisches mit Hilfe von Agarosegelelektrophorese und Extraktion aus dem Agarosegel gereinigt.

7.4.6 Dephosphorylierung von linearisierten Vektoren

Alkalische Phosphatase wurde zur hydrolytischen Entfernung der 5'-terminalen Phosphatgruppen von linearisierten Vektoren mit intramolekularen kompatiblen Enden verwendet, wodurch die Rezirkularisierung des Vektors in den Ligationsansätzen verhindert wurde. Die Dephosphorylierungs-Reaktion wurde nach Maniatis (Sambrook *et al.*, 1989) durchgeführt.

7.4.7 Generierung stumpfer Enden

Stumpfe Enden wurden, anders als sonst üblich, ausschließlich mit T4-DNA-Polymerase (New England Biolabs, Schwalbach) nach den Angaben des Herstellers generiert. Der Vorteil dieses Enzyms, gegenüber beispielsweise dem Kleenow-Fragment der DNA-Polymerase I, ist seine 3' → 5'-Exonukleaseaktivität, die auf überhängende Enden etwa 100 Mal stärker wirkt, als auf doppelsträngige DNA. Daher können mit diesem Enzym gleichzeitig 5'-, als auch 3'-überhängende Enden nach Restriktionsverdau in stumpfe Enden umgeformt werden.

Die Reaktionen wurden in einem Thermocycler mit einem Programm durchgeführt, das automatisch nach dem Polymerisationsschritt das Enzym für 10 min bei 75 °C inaktivierte. Die Ansätze wurden auf eine Mikrodialysemembran pipettiert, die flach auf destilliertem Wasser schwamm. Nach 20 min wurde die dialysierte DNA-Lösung von der Membran pipettiert und war damit gleich für weitere enzymatische Manipulationen gebrauchsfertig.

7.4.8 Ligation von DNA

Für die Ligation von doppelsträngigen DNA-Fragmenten in Vektoren wurde folgender Reaktionsansatz gewählt: 200 ng Vektor-DNA und den 2 bis 5fachen molaren Überschuss an Fragment-DNA, 2 µl 5 × Ligasepuffer, 1 µl T4-DNA-Ligase (1 u/µl) und ad 15 µl H₂O (bidest.). Der Ansatz wurde 14 Stunden bei 12 bis 16 °C inkubiert. Danach konnten *E. coli*-Bakterien mit den Ligationsansätzen transformiert werden (s. Abschnitt II.4.2).

Im Rahmen von LA-5'-RACE (ligation-anchored 5' rapid amplification of cDNA ends)-Experimenten wurden einzelsträngige Oligonukleotide mit T4-RNA-Ligase an einzelsträngige cDNAs ligiert (vgl. Abschnitt 7.4.9). Es wurden dabei die Angaben des Herstellers befolgt.

7.4.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

7.4.9.1 Allgemeine Bedingungen

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Template-DNA (0,1 pg bis 10 ng Plasmid-DNA; 50 bis 200 ng chromosomale DNA), Primer (je 0,5 bis 2 ng/µl), dNTPs (200 µM), KCl (50 mM), MgCl₂ (0,5 - 2,5 mM), Tris-HCl pH 9,0 (10 mM), Triton X-100

(0,1 %), Gelatine (0,01%), Taq- (Gibco BRL, Eggenstein) oder Expand Long Template-Polymerase (Boehringer Mannheim, Mannheim) (0,5 - 1 u) und Wasser ad 50 oder 100 µl wurden zusammengegeben und mit 50 µl Mineralöl überschichtet. Optimale Bedingungen wurden teilweise durch Zugabe von 5 µl DMSO erreicht. Der Expand Long Template-Polymerase-Mix wurde zur Amplifikation sehr langer DNA-Abschnitte (> 1,5 kb) verwendet oder wenn eine geringe Fehlerrate erwünscht war, da im Mix die Pwo-Polymerase enthalten ist, die durch ihre 3'→5'-Exonukleaseaktivität eine wesentlich höhere Einbaugenauigkeit besitzt.

Programme des Thermocyclers: vor Beginn der Zyklen wurde 5 min bei 95 °C denaturiert. Dann folgten 30 bis 39 Zyklen mit 10 s bis 1 min bei 95 °C zur Denaturierung, 10 s bis 1 min bei 58 bis 68 °C als Annealing-Schritt und ca. 10 s bei 72 °C je 150 zu amplifizierende Basenpaare als Polymerisations-Schritt. Nach Beendigung der Zyklen wurde noch 5 min bei 72 °C auspolymerisieren gelassen. Die Untersuchung der PCR-Produkte erfolgte dann elektrophoretisch im Agarosegel und für präparative Zwecke wurden die Banden aus den Gelen eluiert.

Tabelle II.3: Verzeichnis der PCR-Primer, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Bezeichnung	Länge [nt]	T _m [°C]	Orientierung	Position	Sequenz (5'→3')
<u>Ribozyme:</u>					
TRZfor	21mer	66	sense	TRNA vor A-Box	GAG TAC TGT GAG ACC GTG TGC
TRZrev	53mer	152	antisense	tRNA vor Rz - foldback	AAA AAC AGA ACA GTG GAT CCA AGC TTG AAT TCT TTT GAG TGG CGC AGG TTT CG
Rz1p	36mer	106	antisense	Rz186	GAT CCA TGA AGT TTC GTT TTC TCA TCA GGG AGG ACG
<u>TPHI:</u> (alle Primer in Exons sind für Maus und Ratte geeignet, teilweise auch für humane DNA, ansonsten mit dem Vorsatz hum gekennzeichnet, Primer in Introns sind spezifisch für die Maus)					
TPHEX1	22mer	68	sense	Ex1c Maus	GAC ATC GGA TCA GAA GAC TCC C
TPTPH	22mer	70	sense	5' von KA (In1c2)	CAA ACA CCT CAC CGT GCT TCC C
THPT1	21mer	66	sense	5'-Ende KA (In1c2)	CAG TGA GAT CTC AGT TCG GGG
TPHIn12a	23mer	70	sense	In1c2	TCC CAC TTC CAT CTG GAA AAG CC
TPHIn12b	24mer	74	antisense	In1c2	CAG GCT TTT CCA GAT GGA AGT GGG
TPHIn12c	21mer	64	sense	123 bp vor Ex2	GAG GTT CTC TTG CCA TTC TGG
TPHEX2a	21mer	64	antisense	5'-Ende Ex2	CTC CCT CTT TCG GAG GAA TGG
TPHEX2b	23mer	66	sense	3'-Ende Ex2	CAC CAT GAT TGA AGA CAA CAA GG
TPHEX2c	21mer	62	antisense	120 bp von Ex2	CAG CAC TTT TAT GAG TCC TCC
TPHIn23a	23mer	74	antisense	520 bp 5' von Ex3	GGC GTC GGA AGA AGC AAT ACG GG
TPHIn23b	21mer	62	sense	1050 bp 5' von Ex3	CAT TGA ATG TGG ACA CCA TCC

TPHIn23c	21mer	64	sense	530 bp 5' von Ex3	CGA AGT ATG CAC CCG TAT TGC
TPHEX3	22mer	74	antisense	Ex3	CCG GGA CTC GAT GTG TAA GAG G
humEX3	21mer	64	antisense	Ex3	CCT GTT ACA TAT GCA GTC CCG
TPHEX3b	20mer	64	antisense	Ex3	CCT TCG CAG TGA GCT GAT CG
TPHEX3(5->3)	22mer	70	sense	Ex3 Pos. TPHEX3	CCT GTT ACA CAT CGA GTC CCG G
TPHIn34	28mer	96	antisense	5'-Ende In3	GCG GGG TGG GGC TTT GCC GTC TCA CAC G
TPHEX4	23mer	70	antisense	3'-Ende Ex4	CAT ACA ACA GCA CTC TGT TGG CG
humEX4	21mer	66	sense	3'-Ende Ex4	CTG TTG GCA CAA TGG TCC AGG
TPHEX4b	20mer	66	antisense	Ex4	GTG GTC GGC GTC AAG TTC GG
TPHEX5	23mer	66	sense	5'-Ende Ex5	CGA AAG TAT TTT GCA GAG TTG GC
TPHEX5b	25mer	70	antisense	Ex5	CTA CGA TAG ACA TTG TCT TTG AAG C
TPHEX6	23mer	66	antisense	5'-Ende Ex6	CGT GAA TTC AAT CTT GGG AAT GG
TPHEX6b	21mer	66	antisense	Mitte von Ex6	GGT CCC CCA GGT CTT AAT CTC
Ex62biot	28mer	86	antisense	wie TPHEX6b, biotinyliert	Biotin-GGA AGA TGG TCC CCC AGG TCT TAA TCT C
TPH6T7	38mer	110	antisense	wie TPHEX6 + T7- RNA--Polymerase- Promotor	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CGA AAT CTT GGG AAT GG
TPHEX6s	20mer	58	sense	3'-Ende Ex6	CAA AAT ACT GTG GCT ATC GG
TPHEX7	21mer	64	antisense	3'-Ende Ex7	GGG ATC TGA ACT GTG TCT CAC
TPHEX8	20mer	62	sense	5'-Ende Ex8	GTT CCT CTC TTG GCT GAA CC
TPHEX9	20mer	62	antisense	5'-Ende Ex9	CCA AAG ACT CTC AGC TGT CC
TPHEXF	22mer	70	antisense	3'-Ende ORF	GGA AAC CAT CAC ACA CTG GGC C

TPH2:

NTPHEX1A	27mer	86	sense		ATG GGA GGA AGC GCA CTG CTC TTC AGC
NTPHEX1B	26mer	82	sense		TGC TCT TCA GCA CCA GGG TTC TGG AC
NTPHEX2A	26mer	74	sense		TTC TCC TTG AAG AAT GAA GTT GGT GG
NTPHEX2B	26mer	78			GCC CAC CAA CTT CAT TCT TCA AGG AG
NTPHEX3A	25mer	72	sense		GAA TTC AAT GAG CTC ATC CAG TTG C
NTPHEX4	30mer	90	sense		GGT TCC CTC GGA AGA TCT CTG AGT TAG ACA
NTPHEX4B	30mer	90	antisense		TGT CTA ACT CAG AGA TCT TCC GAG GGA ACC
NTPHEX6A	26mer	88	antisense		AGA GCT CCC GGA ACA CAA CAC CCC AAG T
RatNTPHEX6A	28mer	86	antisense		AGA GCT CCC GAA ACA CAA CAC CCC AAG T
NTPHEX6B	28mer	88	sense		ACT TGG GGT GTT GTG TTC CGG GAG CTC T
RatNTPHEX6B	28mer	86	sense		ACT TGG GGT GTT GTG TTT CGG GAG CTC T
NTPHEX6C	25mer	70	antisense		TTT AGT CTC TTC TTC TGT GTA CTC G
NTPHEX7 hum	28mer	86	antisense		AGA GCT CCC GGA ATA CAA CAC CCC AAG T
NTPHEX7A	29mer	88	antisense		GTA CTG GGT GCA GTG GAA TAC TCT GTA GG
NTPHEX7B	29mer	88	sense		CCT ACA GAG TAT TCC ACT GCA CCC AGT AC
NTPHEX8A	29mer	88	antisense		AGT TTC TGA ACG TCC TCA TCT GAG GCT CC
NTPHEX9A	30mer	92	sense		CGT ATG GAG CAG GGT TAC TTT CGT CCA TCG
NTPHEX9B	25mer	78	antisense		CGA TGG ACG AAA HTA ACC CTG CTC C
NTPHEX11A	25mer	72	antisense		AGA ATT GCA TGC TTA CTA GCC AAC C
ratNTPHEX11	26mer	76	antisense		AAA ATG CTG AAT GGT CAT CTG CCT GG
NTPHIn23A	25mer	80			CAG TGT GCG TGT ACG GAG TGG AGT G
NTPHIn23B	25mer	80			CTC TGT GTA GCC CTG GCT GTC TTG G
NTPHIn23C	26mer	78			GGC ACA ATG TAC ATG GAG TCT CTT GG
NTPHIn45	27mer	80			GCG AAC GGA AAT TGA TCA CAC CTT TCC
NTPHIn56	27mer	80			TAC GTC CTC ATC CGT GAT AAT TCT GCC

5'-RACE-Polynukleotide:

Anchor	22mer	70	sense	für nested PCR	GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA C
dT-Anchor	39mer	104	sense/antise se	für 5'- und 3'-RACE geeignet	GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA CTT TTT TTT TTT TTT TTT
dC-Anchor	33mer	114	sense	5'-RACE-Primer	GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA CCC CCC CCC CCC
uniT7AnAn	71mer			LA-5'-RACE-Anchor	ACT GGC CGT CGT TTT ACA GAA TTC GCC CTA TAG TGA GTC GTA TGG ATC CGT CGA CAT CGA TAC GCG TGG TC GTA AAA CGA CGG CCA GT
uniM13	17mer	52	sense	für nested PCR	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C
T7	22mer	64	sense	für nested PCR	ATG TCG ACG GAT CCA TAC GAC
AnT7	21mer	64	sense	für nested PCR	TCA CTA TAG GGC GAA TTC
TE7	18mer	52	sense	für nested PCR	

Polymerase δ

Pol-d for	18mer	58			CCA AGG ACG TCA TCT CGG
Pol-d rev	21mer	64			GGT AGT ACT GAG TGT CGA TGG

Hygromycin

HYGfor	20mer	62	sense		GAT GTA GGA GGG CGT GGA TA
HYGrev	20mer	60	antisense		GAT GTT GGC GAC CTC GTA TT

7.4.9.2 Long-range-PCR

Zur Amplifikation besonders langer DNA-Abschnitte (> 1,5 kb) wurde das Expand Long Template-System (Boehringer Mannheim, Mannheim) verwendet, das sich durch hohe Progressivität der DNA-Polymerasen auszeichnet. Im Wesentlichen wurden die PCR-Bedingungen nach den Angaben des Herstellers eingehalten, optimale Ergebnisse wurden aber mit Elongationszeiten von ca. 10 min je 150 bp Amplikon erzielt, also wesentlich länger als die angegebenen Elongationszeiten.

7.4.9.3 Touch-down-PCR

Sofern Schwierigkeiten bei der Amplifikation bestanden, nachdem alle Optimierungsversuche unternommen worden waren, wurde auf diese Methode zurückgegriffen. Sie besteht darin, dass, ausgehend von der Schmelztemperatur der Primer, mehrere Vorzyklen mit fallenden Annealing-Temperaturen laufen gelassen werden, in Stufen von 2 bis 3 °C.

Mit anderen Worten wurden, bei einer Schmelztemperatur von beispielsweise 64 °C, drei Zyklen bei einer Annealing-Temperatur von 62 °C, drei Zyklen bei 59 °C, usw. durchgeführt,

bevor mit den eigentlichen 30 bis 39 Zyklen der PCR begonnen wurde. Diese Präamplifikation führte dann meistens zu klonierbaren Ausbeuten der amplifizierten Zielsequenz.

7.4.9.4 Sequenzreaktion

Sequenzreaktionen wurden mit dem Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP nach den Angaben des Herstellers durchgeführt, mit der Veränderung, dass 850 ng je 1 kb für die Einzelreaktionen (A, C, G und T) eingesetzt wurden. Die Reaktionen wurden in dünnwandigen PCR-96-Well-Mikrotiterplatten in je 4- μ l-Ansätzen für jede Einzelreaktion durchgeführt, die mit PCR-Wachs überschichtet waren. IRD-800 markierte Standard-Oligonukleotide (M13universal, M13reverse, SP6, T7, und T3) von MWG (Ebersberg) wurden als Sequenzierungs-Primer verwendet. Nach der Sequenzierungs-PCR und Denaturierung der Proben, wurde jeweils 1 μ l der Reaktionsansätze mit einer Hamilton-8-Kanalpipette (MWG, Ebersberg) auf ein denaturierendes Sequenzgel in einem LI-COR 2000-System aufgetragen. Die Detektion der Produkte erfolgte automatisch durch kontinuierliche Fluoreszenz-Messung. Die Sequenzen wurden schließlich mit Hilfe der LI-COR-Software ausgewertet.

7.4.10 Reverse Transkription

Mit Hilfe der reversen Transkription (RT) wurden alle in dieser Arbeit synthetisierten cDNAs erhalten. Dafür wurden je 2 μ g total-RNA mit 400 u der MuLV-Reversen-Transkriptase (Gibco BRL, Eggenstein) oder 20 u der AMV-Reversen-Transkriptase (Promega, Heidelberg) im Puffer des Herstellers in Gegenwart von 30 u RNasin (Promega, Heidelberg), 3,3 μ M Random Hexamer-Primer (Boehringer Mannheim, Mannheim) oder strangspezifischen Primern, 10 mM DTT und 500 μ M eines jeden der vier dNTPs eine Stunde bei 42 °C inkubiert. Anschließend wurden die Enzyme immer hitzeinaktiviert. Maximal 3 bis 4 μ l der so erhaltenen einzelsträngigen cDNA-Lösungen wurden dann in 100- μ l-PCR-Ansätzen, wie oben beschrieben, amplifiziert.

7.4.11 5'-RACE

Zur Amplifikation unbekannter 5'-Enden kamen zwei Methoden zum Einsatz. Die erste Methode beinhaltet die Synthese eines homopolymeren Poly(dA)- oder Poly(dG)-Schwanzes am 3'-Ende frisch erhaltener einzelsträngiger cDNA. Dafür wurde die Terminale-Transferase (TdT; Boehringer Mannheim, Mannheim) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Anschließend wurden via PCR mit einem Anchor-poly(dT)- bzw. -poly(dC)-Primer und *tph*-spezifischen Primern die 5'-Enden amplifiziert.

Die zweite Methode beinhaltet die Ligation eines synthetischen Polynukleotids (71mer, uniT7AnAn) an das 3'-Ende frisch erhaltener einzelsträngiger cDNA, was mit Hilfe der T4-RNA-Polymerase geschah. Vorbereitend wurde vor der Ligation das 5'-Ende des Polynukleotids mit T4-Polynukleotid-Kinase phosphoryliert und das 3'-Ende mit ddATP und Terminaler-Transferase blockiert. Anschließend wurden mit zu dem Polynukleotid komplementären Primern und *tph*-spezifischen Primern die 5'-Enden via PCR amplifiziert.

Meistens wurden beide Methoden parallel durchgeführt, da die langen *in vitro* Reaktions-Sequenzen von der RNA bis zum entsprechenden Amplikon störungsempfindlich sind. Außerdem wurde die Sensitivität der beiden Methoden im Verlauf der vorliegenden Arbeit schrittweise dadurch gesteigert, dass zuerst mit Total-RNA, dann mit mRNA (PolyA-RNA) und schließlich mit spezifisch angereicherter *tph*-mRNA (vgl. Abschnitt 7.2.6) gearbeitet wurde.

7.5 Gelelektrophorese

7.5.1 Agarosegele

DNA-Moleküle von 0,1 bis 20 kb Größe wurden in 0,6 bis 3,5 %igen (w/v) Agarosegelen mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) aufgetrennt und unter UV-Licht (300 nm) visualisiert. Durch Vergleich mit geeigneten Molekulargewichtsmarkern bekannter Zusammensetzung wurden Fragmentgrößen und Probenkonzentrationen abgeschätzt.

Die Proben wurden mit 0,2 Volumen Probenpuffer I oder II, je nach Größe der erwarteten Banden, versetzt und aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in TBE-Puffer oder TAE-Puffer bei 1 bis 8 V/cm durchgeführt.

<u>DNA-Probenpuffer I:</u>	0,025 % Bromphenolblau 0,025 % Xylencyanol-FF 50 % Glycerin	<u>TBE-Puffer:</u>	90 mM Tris-HCl 90 mM Borsäure 2 mM EDTA
<u>DNA-Probenpuffer II:</u>	0,025 % Bromphenolblau 50 % Glycerin	<u>TAE-Puffer:</u>	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA

7.5.2 Denaturierende Agarosegele

Die Reinigung von *in vitro* transkribierten RNA-Fragmenten und Ribozymen erfolgte zum Teil mit 2 bis 3,5 %igen (w/v) formaldehydhaltigen (5 %) Agarosegelen, die Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) enthielten. Die gefällten Proben wurden in 20 µl RNA-Probenpuffer aufgenommen und vor dem Auftragen auf das Gel 5 min bei 65 °C denaturiert. Die Elektrophorese wurde in MOPS-Puffer bei 1 bis 8 V/cm durchgeführt.

<u>MOPS-Puffer:</u>	20 mM MOPS 13 mM NaAcetat 1 mM EDTA	pH 8,0
<u>RNA-Probenpuffer:</u>	8 mM MOPS 5 mM NaAcetat 0,4 mM EDTA 0,025 % Bromphenolblau 0,025 % Xylencyanol-FF 0,025 % SDS 75 % Formamid 5 % Formaldehyd	pH 8,0

7.5.3 Denaturierende Polyacrylamidgele

Die Auftrennung der DNA-Fragmente aus Sequenzierungsreaktionen (Abschnitt II.7.4.7.3), der geschnittenen RNA-Fragmente aus Spaltreaktionen (Abschnitt II.7.8) und der geschützten mRNA-Fragmente aus RNase Protection Assays (RPA; Abschnitt II.7.7) erfolgte in Harnstoff-Polyacrylamidgelen (8 M Harnstoff). Für die Gele wurden gebrauchsfertige Acrylamid-Bisacrylamid-Lösungen (Sequagel XR 6 %, Biozym, Heidelberg oder Lösungen ohne Harnstoff, Amresco, England) verwendet, die mit TEMED und APS jeweils frisch polymerisiert wurden. Die Acrylamidkonzentrationen der Gele betrug 6 % oder 10 % für die Analyse der Spaltreaktionen.

Die Elektrophorese der Sequenzgele wurde bei 34 V/cm Gel und 50 °C in einem LI-COR 2000-System (MWG, Ebersberg) durchgeführt, die der RPA-Gele bei Raumtemperatur und

20 bis 30 V/cm Gel, in herkömmlichen vertikalen Elektrophoresekammern von Biometra (Göttingen). Zur Erhöhung der Trennleistung wurden die Gele vor dem Probenauftrag durch einen 30minütigen Vorlauf von störenden Elektrolyten befreit und gleich vorgewärmt.

7.6 *In vitro* Transkription

Die *in vitro* Transkriptionen wurden durchgeführt, um RNA-Fragmente und Ribozyme für Spaltreaktionen und Antisense-Sonden für RNase Protection Assays zu erhalten. Die RNAs wurden von Plasmiden mit entsprechenden DNA-Abschnitten generiert. Dafür wurden 0,4 bzw. 5 µg linearisiertes Plasmid, 40 mM Tris-HCl pH 8,0, 8 mM MgCl₂, 2 mM Spermidin, 50 mM NaCl, 10 mM DTT, 1,5 u/µl Rnasin und 0,5 mM der Ribonukleotide rATP, rCTP, rGTP und rUTP in 20-µl- oder 200-µl-Ansätzen in Gegenwart von 0,5 u/µl T7- oder SP6-RNA-Polymerase für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Sollte die RNA radioaktiv markiert werden, wurden anstelle von 0,5 mM rUTP 50 nM rUTP und 100 µCi [α -³²P]rUTP eingesetzt. Nach 15minütigem DNase I-Verdau (RNase-frei) bei 37 °C wurden die Sonden dann in 28 µl Formamid-Ladepuffer (RPAII Kit, Ambion, Austin, TX) denaturiert und auf einem denaturierendem Polyacrylamidgel aufgetrennt, um kürzere Transkripte zu entfernen. Die Sonden wurden dann im Elutionspuffer des Kits über Nacht bei 37 °C aus dem Gel eluiert.

7.7 Spaltreaktion

Entsprechend den zahlreichen ähnlichen Vorschriften für Spaltreaktionen (Kobayashi *et al.*, 1993; Tuschl und Eckstein, 1993; Lieber und Strauss, 1995; Gaughan und Whiteheat, 1997; Shelburne und Huff, 1999; Sucharita *et al.*, 2001) wurden die am meisten verwendeten Reaktionsbedingungen übernommen und optimiert.

Durchgeführt wurden die Spaltreaktionen in 20-µl-Ansätzen in 50 mM Tris-Puffer bei einem pH-Wert von 7,5. Dabei wurden 4 pmol [α -³²P]rUTP-markierte Substrat-RNA mit einer Aktivität von 1000 bis 5000 cpm, die durch *in vitro* Transkription (Abschnitt II.7.6) generiert wurden, eingesetzt. Dann wurden die entsprechenden Mengen Ribozym-Lösung und MgCl₂ zugegeben und die Reaktionsansätze 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Spaltreaktion erfolgte bei 37 °C für 3 bis 24 Stunden. Nach Ende der Reaktion wurden Aliquots mit 200 bis

300 cpm des Reaktionsgemisches entnommen, 5 µl Formamid-Ladepuffer (RPAII Kit, Ambion, Austin, TX) zugegeben, denaturiert und mit einem 10 %igen denaturierenden Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (Abschnitt II.7.5.2).

7.8 RNase Protection Assay (RPA)

[α -³²P]rUTP-markierte Antisense-Sonden wurden von Plasmiden mit geeigneten cDNA-Abschnitten generiert und mit Hilfe eines 6 %igen denaturierenden Polyacrylamidgeles gereinigt und dann im Elutionspuffer des Kits über Nacht bei 37 °C aus dem Gel isoliert.

Die RNA-Proben wurden eine Stunde bei 37 °C mit 1 u RNase-freier DNase I (Boehringer Mannheim, Mannheim) je µg RNA inkubiert. Dann wurden 10 bis 80 µg RNA mit $1 \cdot 10^5$ bis $4 \cdot 10^5$ cpm der Sonde und etwa $8 \cdot 10^4$ einer niedrig aktiven β -Aktinsonde, als interne Kontrolle, über Nacht bei 42 °C, nach Angaben des Herstellers (RPAII Kit, Ambion, Austin, TX), hybridisiert. Zu jedem Hybridisierungs-Ansatz wurden anschließend 12 µg RNase A und 240 u RNase T1 des Kits hinzugefügt und eine Stunde bei 37 °C verdaut. Dann wurden die RNAs ausgefällt und die Pellets in Probenpuffer aufgenommen. Nach fünfminütiger Denaturierung bei 95 °C wurden die Proben, wie oben beschrieben, elektrophoretisch aufgetrennt und die Gele nach dem Lauf auf Whatman-Filterpapier bei 80 °C unter Vakuum getrocknet. Die Detektion erfolgte durch Autoradiographie mit Hilfe eines BAS2000 Phosphoimager-Systems (Fuji, Tokyo).

7.9 Southernblot

Doppelsträngige DNA-Fragmente wurden mit dem auf der Methode von Feinberg und Vogelstein (1983) basierten Megaprime-Kit und [α -³²P]dCTP (Amersham, Braunschweig) entsprechend den Angaben des Herstellers radioaktiv markiert. Die markierte Sonde wurde mit einer G-50-Sephadex-Säule (Pharmacia, Freiburg) nach den Angaben des Herstellers gereinigt und in einem Szintillationszähler gemessen. Vor der Hybridisierung wurde eine geeignete Menge ($1 - 5 \cdot 10^6$ cpm für eine Membran) mit 150 µl Heringsperma-DNA vermischt und 5 min bei 95 °C denaturiert.

Agarosegelelektrophorese wurde nach Standardmethoden in TBE-Puffer durchgeführt und die DNA mittels eines Vakuumblotters (Biometra, Göttingen) nach den Angaben des Herstellers

auf eine Nylon-Membran transferiert. Die DNA wurde durch zweiminütige UV-Bestrahlung auf der Membran fixiert.

Die Membran wurde dann eine Stunde bei 60 °C prähybridisiert. Anschließend wurde die markierte DNA-Probe zugegeben und über Nacht bei derselben Temperatur hybridisiert. Am nächsten Tag wurde die Membran unter den jeweils ausgewählten Stringenzbedingungen (meistens 2 × SSC/0,1 % SDS bis 0,1 × SSC/0,1 % SDS) dreimal 15 min gewaschen, wobei der dritte Waschschrift bei 60 °C erfolgte. Die Detektion erfolgte durch Autoradiographie des Filters mit Hilfe eines BAS2000 Phosphoimager-Systems (Fuji, Tokyo).

Hybridisierungs-Lösung: 10 % Dextransulfat (w/v)
50 % deionisiertes Formamid (v/v)
1 % SDS (w/v)
6 × SSC
Heringsperma-DNA

Wasch-Lösungen: 2 × SSC / 0,1 % SDS: 0,3 M NaCl, 30 mM Na-Citrat (pH 7,0),
0,1 % SDS
0,5 × SSC / 0,1 % SDS: 0,075 M NaCl, 7,5 mM Na-Citrat (pH 7,0),
0,1 % SDS
0,1 × SSC / 0,1 % SDS: 0,015 M NaCl, 1,5 mM Na-Citrat (pH 7,0),
0,1 % SDS

8 TIERVERSUCHE

8.1 Mausstämme und Haltung

Die verwendeten Mauslinien des Stammes *Mus musculus* waren C57BL/6 und FVB/N.

Die Tiere wurden in kleinen Gruppen von 3 bis 6 Tieren in klimatisierten Räumen mit einem 12-12-h-Hell-Dunkel-Zyklus gehalten. Außerdem hatten die Tiere freien Zugang zu Futter und Wasser.

8.2 Transgene Techniken

8.2.1 Superovulation von Oozyten-Spendertieren

Alle angegebenen Methoden der Manipulation von Mäuseembryos wurden, wenn nicht anders angegeben, nach Hogan *et al.* (1986) in Zusammenarbeit mit Dr. Natalia Alenina in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt.

Um für die Oozyteninjektion eine größere Anzahl befruchteter Eizellen zu erhalten, wurden die Spendertiere hormonell zur Superovulation gebracht. Die Superovulation wurde in den Mäusen mit PMS (Pregnant Mare Serum; Intergonan von Vemie: enthält das Follikelstimulierende Hormon, FSH) und zusätzlich mit HCG (Human Chorionic Gonadotropin; Perdalon von Organon) eingeleitet. Da nur sehr junge Tiere auf diese Hormonbehandlung ansprechen, wurden junge Weibchen zwischen 4 und 6 Wochen verwendet. Den Mäusen wurde das PMS (7 IE in 500 μ l) am ersten Versuchstag und das HCG (7 IE in 500 μ l) am dritten Versuchstag jeweils i.p. um 14 Uhr injiziert.

Die behandelten Weibchen wurden dann am Abend des dritten Tages verpaart und am kommenden Morgen auf einen Vaginalpfropf (VP) hin untersucht. Dieser VP besteht aus koagulierten Proteinen der Seminalflüssigkeit der Männchen und ist indikativ für die erfolgte Kopulation. Die Tiere mit VP konnten dann zur Isolierung von Oozyten genommen werden.

8.2.2 Isolierung von Oozyten

Vorbereitend zur Isolierung der Oozyten wurden in die Mitte von zwei Kulturschalen jeweils 250 μ l M16-Medium pipettiert, mit Mineralöl überschichtet und in einem Zellkulturinkubator bei 37 °C, gesättigter Wasseratmosphäre und 5 % CO₂ inkubiert. Außerdem wurden drei konkave Kulturschalen mit M2-Medium gefüllt und ebenfalls auf 37 °C temperiert.

Die superovulierten Weibchen mit VP wurden durch cervikale Dislokation getötet, und die Eileiter operativ entfernt. Die isolierten Eileiter wurden zunächst in einer der M2-Schalen gesammelt, bis alle operiert waren. Dann wurden die Eileiter nacheinander in die zweite M2-Schale überführt und unter einem Mikroskop die sogenannten Ampullen der Eileiter mit Hilfe von zwei spitzen Mikrodissektionspinzetten aufgerissen, wobei die Oozyten freigesetzt wurden. Die Reste der Eileiter wurden darauf entfernt, um den nächsten in derselben Schale aufzuarbeiten.

Da die Oozyten zunächst noch von Follikelzellen umgeben waren, mussten sie 10 min bei 37 °C mit Hyaluronidase-Lösung (Zugabe von 100 μ l mit 10 mg/ml zum Medium) inkubiert werden, wonach sie mit einer Mundkapillare auf und ab pipettiert wurden, um die Trennung von den Follikelzellen mechanisch zu unterstützen. Dann wurden die Oozyten zunächst in die dritte M2-Schale transferiert, wobei darauf zu achten war, dass möglichst wenig Gewebsbrocken der Eileiter und Blutzellen überführt wurden. Nach diesem Reinigungsschritt

wurden die Oozyten in die M16-Schalen überführt, in denen sie im Inkubator bis zur Mikroinjektion aufbewahrt wurden.

M2-Medium: 94,66 mM NaCl, 4,78 mM KCl, 1,17 mM CaCl₂, 1,19 mM KH₂PO₄, 1,19 mM MgSO₄, 4,15 mM NaHCO₃, 20,85 mM HEPES, 23,28 mM Natriumlactat, 0,33 mM Natriumpyruvat, 5,56 mM Glucose, je 50 mg/l Penicillin G-Kaliumsalz und Streptomycinsulfat und 10 mg/l Phenolrot. Nach Fertigstellung sterilfiltriert.

M16-Medium: Wie das M2-Medium, aber mit 25 mM NaHCO₃, für bessere Pufferkapazität unter CO₂-Atmosphäre.

8.2.3 Mikroinjektion von Oozyten

Zuerst wurden die für die Mikroinjektion benötigten Kapillaren ausgezogen. Haltekapillaren (GC 120F-15, Clark Electromedical Instruments) wurden ausgezogen und an einer Stelle abgebrochen, an der die Kapillaren einen Außendurchmesser von etwa dem Durchmesser einer Oozyte hatten. Die scharfen Kanten der Bruchstelle wurden dann durch Erhitzen geglättet, wobei auch der Innendurchmesser der Haltekapillare verringert wurde. Auf diese Weise konnten die Embryos bei der Mikroinjektion nicht in die Haltekapillare hineingezogen werden. Außerdem wurden sehr feine Injektionsnadeln (GC 100TF-15, Clark Electromedical Instruments) für die Mikroinjektion von Oozyten ausgezogen.

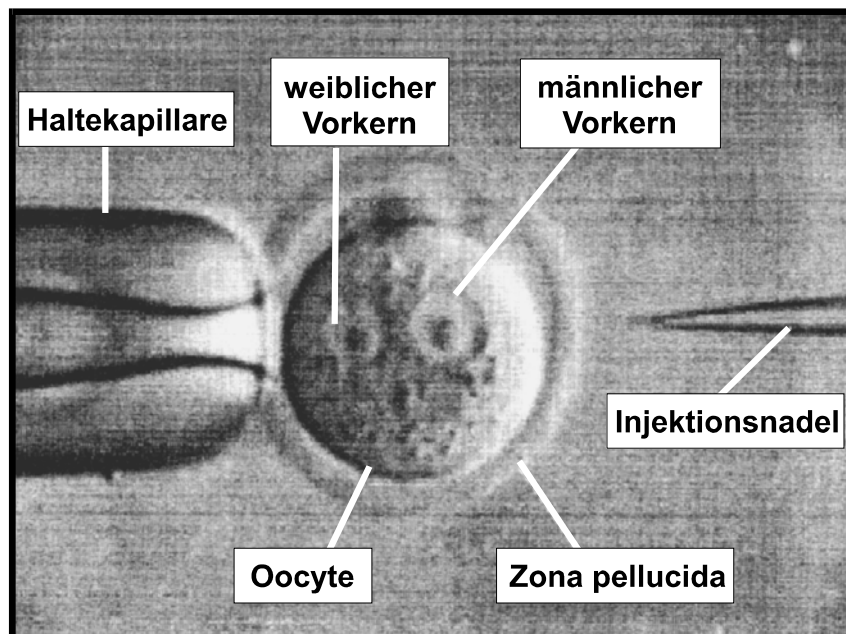


Abbildung II.6: Mikroinjektion einer Oozyte. Die Zygote (Durchmesser ca. 200 μm) wurde mit der Haltekapillare angesaugt, um sie für die Injektion festzuhalten. Die Injektionsnadel wird in den männlichen, meist größeren, Vorkern gestochen um die DNA-Lösung zu injizieren (aus Hogan *et al.*, 1986). Viruspartikel wurden unter die Zona pellucida injiziert.

Die Anlage zur Mikroinjektion bestand im Wesentlichen aus zwei Mikromanipulatoren (Leitz), einem Mikroskop (Axiovert 35, Zeiss) und einem Druckluftregler als Mikroinjektor (genaue Beschreibung in Hogan *et al.*, 1986). Die Injektionsnadeln wurden mit den Spitzen nach oben in die Injektionslösung (DNA-Konstrukt in Injektionspuffer; vgl. Abschnitt II.7.2.4) gestellt, wodurch sie sich durch Kapillarkräfte mit dieser füllten. Nachdem Haltekapillare und Injektionsnadel in die jeweiligen Mikromanipulatoren eingespannt waren, wurde ein Tropfen M2-Medium auf einen Objektträger mit einer Vertiefung gegeben und mit Mineralöl überschichtet.

Die Kapillaren wurden dann in das Medium getaucht und fokussiert, wonach Oozyten mit Hilfe einer Mundkapillare in das Medium pipettiert wurden. Auf die Haltekapillare wurde dann mit Hilfe eines mit einer Mikrometerschraube betriebenen Kolbens Unterdruck angelegt, wodurch jeweils eine Oozyte angesaugt und festgehalten wurde. Auf die Injektionsnadel wurde Überdruck gelegt, so dass es zu einem kontinuierlichen Ausfluss der DNA-Lösung kam. Die Nadel wurde dann in den größeren, männlichen Vorkern der Oozyte gestochen, wobei sich dieser durch die einströmende Lösung aufblähte. Alternativ wurden auf die gleiche Weise Viruspartikel unter die Zona pellucida der Oozyte injiziert (Abbildung II.6). Nachdem alle Embryos auf dem Objektträger manipuliert waren, wurden sie mit der Mundkapillare in M16-Medium überführt und im Brutschrank bis zum Retransfer in einem Inkubator bei 37 °C, gesättigter Wasseratmosphäre und 5 % CO₂ inkubiert. Diese Schritte wurden wiederholt, bis alle Oozyten injiziert waren.

8.2.4 Vorbehandlung von Leihmüttern und Retransfer manipulierter Embryos

Am Vorabend von Embryo-Manipulationen wurden adulte weibliche Mäuse mit vasektomierten Männchen verpaart. Die Vasektomie besteht darin, den *Vas deferens* zu durchtrennen, so dass es nicht mehr zur Spermienübertragung kommen kann. Allerdings sind die Männchen noch in der Lage, Seminalflüssigkeit zu übertragen, weshalb die erfolgte Kopulation am nächsten Morgen durch einen VP festgestellt werden konnte. In den Weibchen trat dann eine Scheinträchtigkeit auf, weshalb sie als Leihmütter verwendet werden konnten. Für den Retransfer von Oozyten wurden die Tiere zuerst mit 50 µl Ketavet und 50 µl Rompun (gebrauchsfertige Lösungen aus der Apotheke) pro 10 g Körpergewicht i. p. narkotisiert, wonach das Fell mit einer Schere am Rücken eingeschnitten wurde. Die Öffnung wurde so über die Bauchhöhle gezogen, dass nach einem Schnitt durch das Bauchfell, die Ovarien und

ein Teil der Uteri mit einer Pinzette am umgebenden Fett gegriffen und herausgezogen werden konnten. An dieser Fettschicht wurde eine OP-Klammer befestigt, die über den Rücken des Tieres gelegt wurde, was das Zurückgleiten des Ovars während der Operation verhinderte.

Um starke Blutungen zu vermeiden, wurde auf das Ovar erst ein Tropfen Suprarenin (Hoechst AG) gegeben, um die Blutgefäße zu kontrahieren. Dann wurde das Häutchen, das Ovar und Eileiter umgibt, mit zwei Mikrodissektionspinzetten aufgerissen und das Infundibulum des Eileiters freigelegt. Schließlich wurden ca. sechs Oozyten in möglichst wenig M2-Medium mit einer Mundkapillare in das Infundibulum geblasen.

Danach ließ man das Ovar zurück in die Bauchhöhle gleiten, wofür die OP-Klammer entfernt wurde. Dann konnte die Wunde einfach mit Wundklammern verschlossen werden. Zur Prophylaxe wurden die Wunden mit antibiotikahaltigem Puder (Leukase, Smith & Kline, Becham) bestreut.

8.2.5 Schwanzbiopsie potentiell transgener Nachkommen

Die Geburt der manipulierten Jungtiere erfolgte ca. drei Wochen nach dem Retransfer. Nach weiteren drei bis vier Wochen wurden die Jungen vom Muttertier abgesetzt und konnten weiter untersucht werden. Dafür wurden den potentiell transgenen Tieren entweder 0,5 cm der Schwanzspitze abgetrennt (für Southernblot), oder direkt die kleinen Ohrstückchen verwendet (für PCR), die bei der Markierung der Tiere herausgestanzt werden. Die Biopsien wurden dann wie unter Abschnitt II.7.2.1 beschrieben aufgearbeitet.

8.3 Hämatologische Untersuchungen

8.3.1 Ermittlung von Blutungszeiten

Blutungszeiten wurden nach der von Holland (1976) beschriebenen Methode bestimmt. Dafür wurden die Tiere zuerst mit 50 µl Ketavet und 50 µl Rompun (gebrauchsfertige Lösungen aus der Apotheke) pro 10 g Körpergewicht i. p. narkotisiert, wonach 2 mm der Schwanzspitze mit einem neuen Skalpell oder einer Rasierklinge abgetrennt wurden. An den sich bildenden Blutropfen wurde in Abständen von 20 bis 30 s ein Stück Filterpapier so gehalten, dass die

Schnittstelle nicht berührt wurde. Als Blutungszeit wurde dann der Zeitpunkt betrachtet, zu dem der Blutropfen nicht mehr vom Filterpapier aufgesogen wurde.

8.3.2 Bestimmung der Blutgehalte von 5-HT- und Trp-Metaboliten

Die Versuchstiere wurden zuerst mit 50 µl Ketavet und 50 µl Rompun (gebrauchsfertige Lösungen aus der Apotheke) pro 10 g Körpergewicht i. p. narkotisiert, worauf die Bauchhöhle geöffnet und die *Vena cava* freigelegt wurde. Aus der *Vena cava* wurde dann Blut mit einer Spritze abgenommen, in der 30 u/ml (erwartete Endkonzentration) an Heparin vorgelegt waren, wonach das Blut, gut durchmischt, in Eppendorf-Röhrchen überführt wurde. Dann wurde ein halbes Volumen Tyrode-HEPES-Puffer hinzugegeben und für 7,5 min bei Raumtemperatur und 3500 × g zentrifugiert. Das Plasma wurde vorsichtig abgenommen und eine Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wiederholt und wieder vorsichtig abgenommen, um alle Blutplättchen zu entfernen. Für die Bestimmung der Metaboliten wurden zum plättchenfreien Plasma 100 mM Perchlorsäure zugegeben, um die Proteine auszufällen (Abschnitt II.6.3.2).

Tyrode-HEPES-Puffer: 134 mM NaCl pH 7,3
 0,34 mM Na₂HPO₄
 2,9 mM KCl
 12 mM NaHCO₃
 20 mM HEPES
 5 mM Glucose
 1 mM MgCl₂

8.4 Pharmakologische Untersuchungen mit 1-Methyltryptophan (1-MeTrp)

Zwölf Mäusen wurden je eine Suspension von 900 mg/kg Körpergewicht 1-MeTrp in 0,9 %iger NaCl-Lösung i.p. appliziert und zwölf weiteren Mäusen als Kontrolle nur 0,9 %ige NaCl-Lösung. Nach 30 min folgte eine zweite Injektion bei sechs Tieren jeder Gruppe mit 400 mg/kg Körpergewicht Tryptophan und wieder mit einer NaCl-Lösung als Kontrolle bei den anderen sechs Tieren. Nach den angegebenen Zeiten wurden die Tiere wie zuvor beschrieben (Abschnitt II.8.3.2) narkotisiert und die Organe entnommen und sofort bei -80 °C eingefroren. Die Bestimmung der Metaboliten aus den Organen erfolgte anschließend wie in Abschnitt II.6.3.2 beschrieben.

8.5 Verhaltenstests

Die Verhaltenstests umfassten ätiologische Messungen und Messungen des Angstverhaltens mit dem Elevated-Plus-Maze-Test und wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Heidrun Fink im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Freien Universität Berlin durchgeführt.

Der Elevated-Plus-Maze-Test ist ein Standardtest für die Messung von Angst bedingtem Verhalten. Die Apparatur besteht aus zwei offenen und zwei geschlossenen Armen, die zusammen ein Kreuz bilden (Abbildung II.7). Die zu testenden Mäuse wurden in die Mitte des Kreuzes gesetzt und fünf Minuten lang beobachtet. Während dieser Zeit wurden die Anzahl der Eintritte in die jeweiligen Arme und die Zeit, die in jedem Arm verbracht wurde, gemessen. Der Test fand unter hellen Umgebungsbedingungen statt.

Der prozentuale Zeitanteil, der in den geschlossenen Armen verbracht wurde und Häufigkeit der Eintritte in die offenen Arme werden als Maß für die Angst betrachtet.

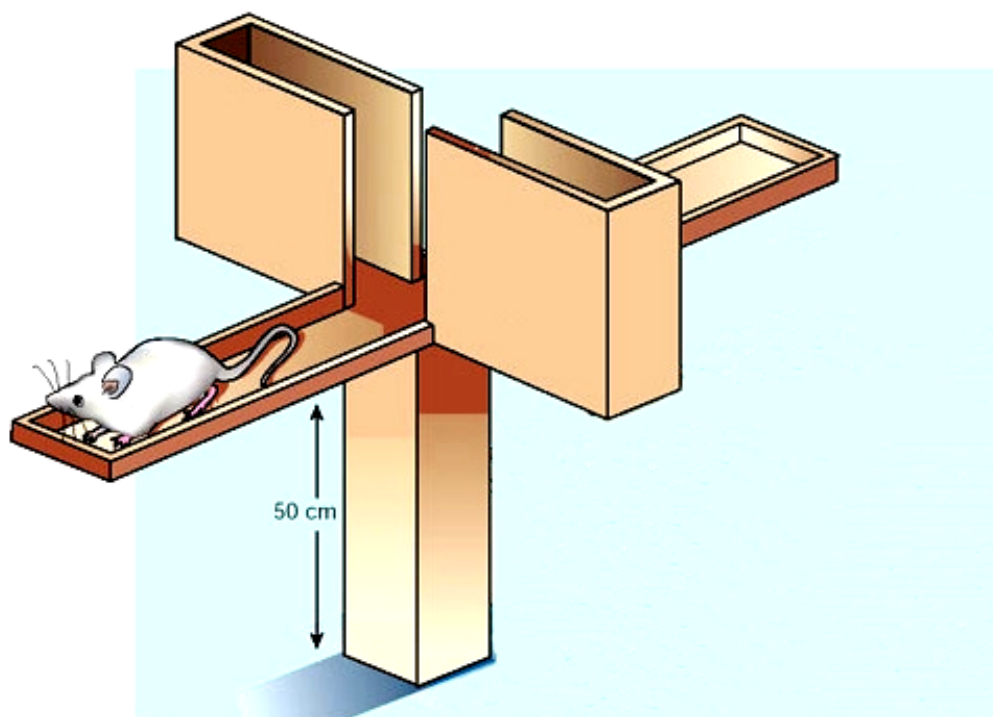


Abbildung II.7 Schematische Darstellung der Versuchsvorrichtung für den Elevated-Plus-Maze-Test (modifiziert nach Snyder, 2002).

8.6 Anzucht und Haltung von Fruchtfliegen (*Drosophila melanogaster*)

Die Haltung und Anzucht von *Drosophila melanogaster* erfolgte auf den entsprechenden Standardmedien in mit Schaumstoffstopfen verschlossenen Gefäßen bei 18 bis 25 °C. Für Eiablagen wurden Platten mit einem speziellen Medium verwendet.

Am zweiten Tag nach der Verpuppung paaren sich die Fliegen, am dritten Tag legen die Weibchen ihre Eier, während die Larven oft noch am selben Tag schlüpfen. Die Verpuppung erfolgt nach etwa 14 Tagen an den Wänden oder trockenen Stellen des Futters. Die Puppenruhe dauert 5 bis 6 Tage, die gesamte Lebensdauer beträgt ca. 3 bis 4 Wochen.

Zur Entnahme und Untersuchung der Fliegen wurden die Fliegen durch Einleiten von CO₂ in die Gefäße betäubt.

Standardmedium für Fliegen:

- 1 % Agar
- 2,5 % Sirup
- 3 % Grieß
- 5 % Hefe
- 0,1 % Nipagin
- 0,16 % Propionsäure
- 100 mg/l Ampicillin

Standardmedium für Larven:

- 4 Teile Haferflocken
- 4 Teile Sojamehl
- 4 Teile Milchpulver
- 1 Teil Hefe

trocken vermischen und mit Wasser zum Brei ansetzen

Eiablagemedium:

- 2 % Agar
- 10 % Zucker
- 5 % Hefe
- 2,25 % Nipagin
- 0,1 % Essigsäure
- 100 mg/l Ampicillin

8.7 Behandlung und Untersuchung von Fruchtfliegen

Für die Bestimmung der Toxizität von 7-HTP und um zu sehen, welche Wirkung es auf die Entwicklung von *Drosophila melanogaster* hat, wurden Fütterungsversuche durchgeführt. Dabei wurden in doppelter Ausführung je 60 frisch gelegte Eier in das Standardmedium für Larven gelegt, das steigende Konzentrationen an 7-HTP enthielt. Dokumentiert wurde die Anzahl der Puppen und der geschlüpften Fliegen, die außerdem auf morphologische Auffälligkeiten hin untersucht wurden.

9 SYNTHESECHEMISCHE METHODEN

9.1 Chemische Synthese von nicht käuflichen Substanzen

9.1.1 Die Fenton-Reaktion

Die Synthese von 7-Hydroxy-L-tryptophan nach Fenton (1894) durch radikalische Hydroxylierung von L-Tryptophan wurde modifiziert nach Udenfriend (1954) in 10 mM Natriumphosphatpuffer bei pH 7,2 durchgeführt. Dabei wurden der 5 mM L-Tryptophanlösung 1 mM Eisen(II)-sulfat, 1,1 mM EDTA und 1 mM Wasserstoffperoxid zugegeben und ca. zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt (Abbildung II.8). Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mittels HPLC-FD aufgetrennt und die Fraktionen durch Farbreaktion mit Fast Blue BN-Salz identifiziert (Abschnitt II 9.2.1).

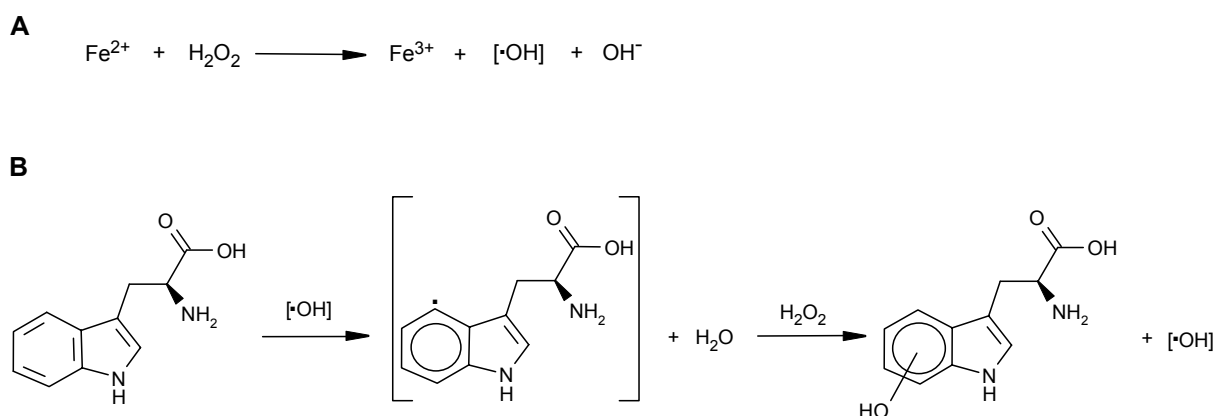


Abbildung II.8 Die Darstellung von 4-, 5-, 6-, 7-Hydroxy-L-tryptophan nach Fenton: (A) Generierung von Hydroxylradikalen aus Wasserstoffperoxid durch Oxidation von Eisen(II)-ionen, (B) nichtselektive radikalische Hydroxylierung am Kern von L-Tryptophan.

9.1.2 Synthese von 7-HTP vom 7-Benzyloxyindol ausgehend

Die Synthese von 7-Hydroxy-DL-tryptophan (7-HTP) vom 7-Benzyloxyindol ausgehend nach Ek und Witkop (1954) vollzieht sich in vier Stufen (Abbildung II.9). In der ersten Stufe, einer Mannich-Reaktion, wurden 235 mg (1,12 mmol) 7-Benzyloxyindol in 1,2 ml Dioxan gelöst und innerhalb von 30 min zu einer eisgekühlten Lösung von 93,3 µl (1,24 mmol) Formaldehyd (37 %ig), 1,12 ml Eisessig und 157,6 µl (1,24 mmol) Dimethylamin (40 %ig) in

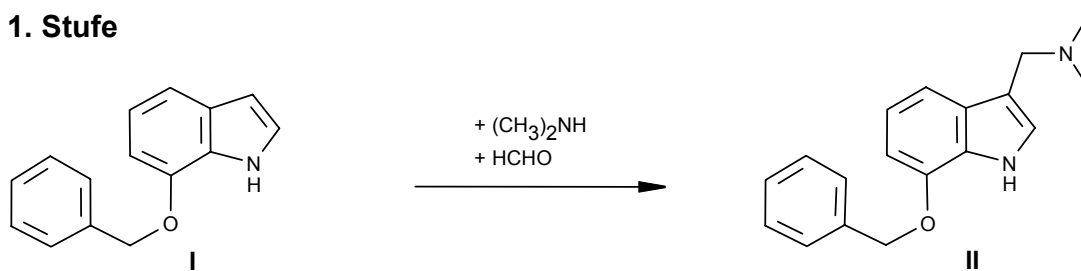
1,2 ml Dioxan getropft und dann über Nacht bei 0 °C gerührt. Aufgearbeitet wurde die Lösung durch Zugabe von 13,7 ml Wasser und Alkalisierung mit Natriumhydroxid, woraufhin 7-Benzylxygramin als ein weißer Niederschlag ausfiel. Nach dem Abfiltrieren und Trocknen ergaben sich 273,2 mg (0,97 mmol) 7-Benzylxygramin, was einer Ausbeute von 87 % entspricht.

In der zweiten Synthesestufe wurden die 273,2 mg (0,97 mmol) 7-Benzylxygramin mit 243,75 mg (1,2 mmol) Diethylformamidomalonat und 19,5 mg (0,49 mmol) zerkleinertem Natriumhydroxid in 3,5 ml trockenem Toluol ca. 40 Stunden unter trockener Stickstoffatmosphäre am Rückfluss gekocht, wobei sich allmählich eine braune Kruste am Kolben absetzte. Zum Aufarbeiten wurde die Lösung dreimal mit 2 M Salzsäure, einmal mit Wasser, einmal zum Neutralisieren mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und noch einmal mit Wasser gewaschen. Diese Lösung wurde anschließend mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und das Toluol abdestilliert. Übrig blieben 400 mg (0,99 mmol) Ethyl- β -(5-Benzylxyindolyl-3)- α -carbethoxy- α -formamidopropionat als gelbes viskoses Öl, was einer 99 %igen Ausbeute entspricht.

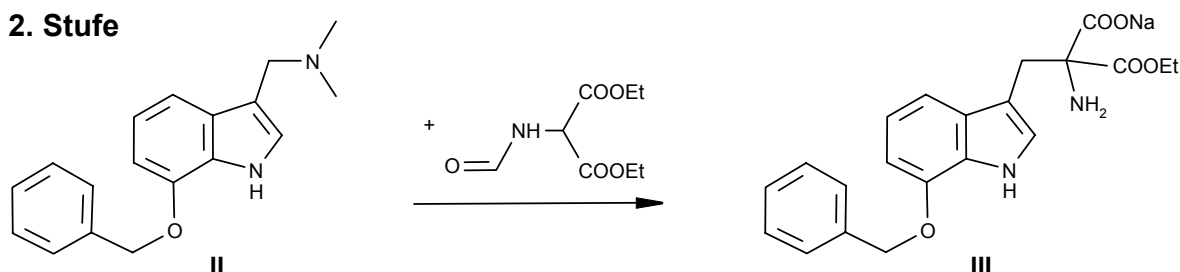
Die Umsetzung zur Aminosäure (7-Benzylxy-DL-tryptophan) erfolgte in der dritten Stufe durch Hydrolyse des Formamidoesters. Dazu wurden die 400 mg (0,99 mmol) mit 333 mg (8,33 mmol) Natriumhydroxid in 3,33 ml Wasser über Nacht am Rückfluss gekocht. Dabei löste sich der Formamidoester auf. Die Decarboxylierung erfolgte anschließend durch Kochen nach Zugabe von 5 ml 2 M Salzsäure, wobei ein weißer voluminöser Niederschlag ausfiel, der nach ca. 45 min fast aufgelöst war. Nach weiterem 30minütigem Kochen am Rückfluss fiel ein neuer fein kristalliner hellbräunlicher Niederschlag aus, der filtriert und einmal mit Wasser gewaschen wurde. Nach dem Trocknen ergaben sich 301 mg (0,96 mmol) 7-Benzylxy-DL-tryptophan, was einer Rohausbeute von 97 % entspricht. Um die Reinheit zu erhöhen, wurde das Reaktionsprodukt noch aus heißer Sodalösung durch Ansäuern mit Essigsäure umkristallisiert, was die Ausbeute auf 250 mg (0,81 mmol) oder auf 82 % verringerte.

In der vierten Stufe wurde die Benzylxy-Schutzgruppe durch Hydrierung mit molekularem Wasserstoff am Palladium-Katalysator abgespalten. Dabei wurde zu einer Suspension von 250 mg (0,81 mmol) 7-Benzylxy-DL-tryptophan in 15 ml 50 %igem Ethanol 430 mg Palladium/Aktivkohle (10 % Palladium) zugegeben und unter Rühren für etwa 2 Stunden Wasserstoffgas eingeleitet. Danach wurde die Lösung filtriert und das Lösungsmittel am Vakuum abdestilliert. Als Rückstand verblieben 66 mg (0,30 mmol) weißes 7-Hydroxytryptophan, entsprechend einer Ausbeute von 37 %.

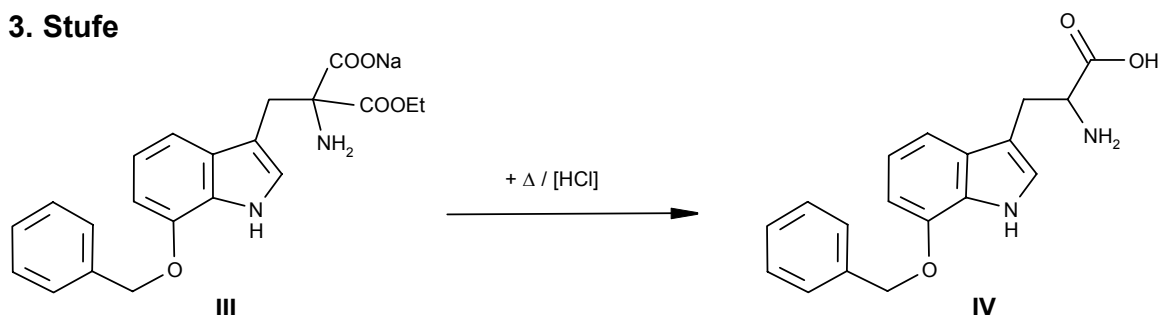
1. Stufe



2. Stufe



3. Stufe



4. Stufe

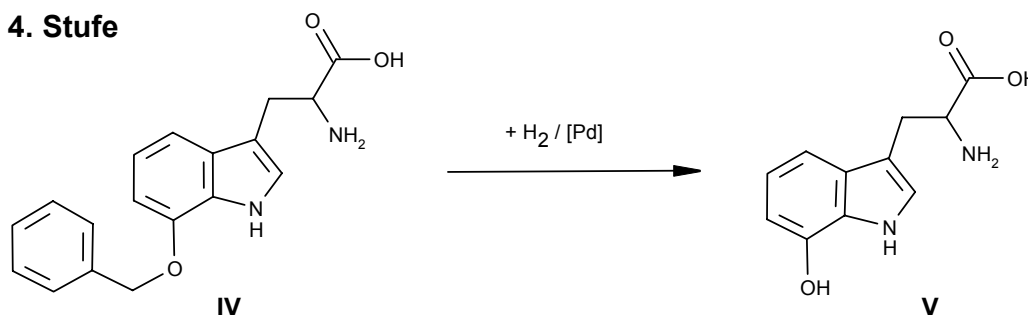


Abbildung II.9 Vierstufige chemische Synthese von racemischen 7-HTP (V) ausgehend vom 7-Benzyloxyindol (I). Die einzelnen Syntheseschritte sind im Text beschrieben.

9.1.3 Totalsynthese von 7-HTP

Die Totalsynthese nach Ek und Witkop (1954) begann mit Nitrierung von 3-Kresol in 2-Position. Dazu mussten zunächst die 4- und 6-Positionen durch Sulfonierung mit rauchender Schwefelsäure blockiert werden. Im selben Ansatz wird die 2-Position mit konzentrierter Salpetersäure nitriert und anschließend die Sulfongruppen durch Hydrolyse entfernt. Nach der Reinigung durch Wasserdampfdestillation ergaben sich aus 111.25 g

(1,0 mol) 3-Kresol 20,80 g (136 mmol) 2-Nitro-m-Kresol. Nach dem Schutz der Hydroxylgruppe durch Acylierung mit Acetanhydrid, was 13,60 g (69 mmol) 2-Nitro-3-acetoxytoluen ergab, folgte die Oxydation der Methylgruppe zum 2-Nitro-3-acetoxybenzaldehyddiacetat mit Chrom(VI)-oxid in Acetanhydrid und Essigsäure (5,10 g oder 16 mmol). Nach Abspaltung der Acyl-Schutzgruppen durch Hydrolyse mit Salzsäure und Reinigung mittels Wasserdampfdestillation konnten 0,65 g (3,9 mmol) 2-Nitro-3-hydroxybenzaldehyd erhalten werden. Damit ergab sich eine Gesamtausbeute von 0,4 %.

9.2 Analyse der synthetisierten Substanzen

9.2.1 Farbreaktionen

Die Identifizierung von Hydroxytryptophanen erfolgte durch Farbreaktion, einer Azokupplung mit dem Diazoniumsalz o-Dianisidine (Fast Blue BN-Salz) in methanolischer Lösung, wobei je nach Hydroxytryptophanisomer verschiedenfarbige Azofarbstoffe entstehen (Maskos *et al.*, 1992; Abbildung II.10).

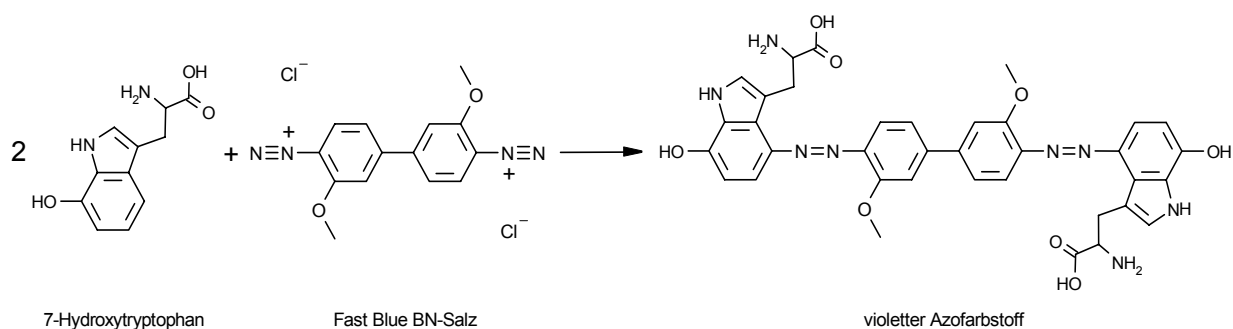


Abbildung II.10: Farbreaktion als Nachweis von 7-HTP. Dabei reagieren die beiden Diazogruppen des Fast Blue BN-Salzes mit zwei Molekülen 7-HTP in einer Kupplungsreaktion in methanolischer Lösung zu einem charakteristischen violetten Azofarbstoff.

Für die Reaktion wurden 0,5 Volumen einer frisch zubereiteten gesättigten Lösung von o-Dianisidine in Methanol zu der zu testenden Hydroxytryptophanlösung gegeben und kräftig gemischt. Der Farbstoff erreicht nach ca. 10 bis 20 min bei Raumtemperatur seine stärkste

Intensität. Der Farbton dieser Lösung verweist auf das entsprechende Hydroxytryptophan (Tabelle II.4).

Tabelle II.4: Farben der verschiedenen Hydroxytryptophane nach der Farbreaktion mit Fast Blue BN-Salz nach Maskos *et al.* (1992).

Substanz	Farbreaktion mit Fast Blue BN
4-Hydroxytryptophan	intensiv rotbraun
5-Hydroxytryptophan	blau-violett
6-Hydroxytryptophan	braun
7-Hydroxytryptophan	intensiv violett

9.2.2 Dünnschichtchromatographie

Dünnschichtchromatographien wurden zur Kontrolle von Zwischen- und Endprodukten der verschiedenen Reaktionen durchgeführt. Dabei dienten RP-18 F_{254s}-DC-Alufolien (Merck, Darmstadt) als feste Phase und Ethanol als Laufmittel. Zum Anfärben der Hydroxytryptophane wurde eine 0,1 %ige methanolische Fast Blue BN-Salz-Lösung und für Aminosäuren eine 0,2 %ige alkoholische Ninhydrinlösung mit einem Zerstäuber auf die Chromatographieplatten aufgesprüht und trocknen gelassen, für die Ninhydrinreaktion wurden die Platten anschließend kurz erhitzt.

9.2.3 Bestimmung von 7-HTP und Nebenprodukte mit HPLC-FD/UV

Die HPLC mit Fluoreszenz- und UV-Detektion bei der Anregungswellenlänge von 270 nm und Detektion der Emission bei 315 nm bei gleichzeitiger UV-Detektion bei 295 nm, erfolgte hauptsächlich um 7-Hydroxytryptophan in Reaktionsgemischen zu analysieren. Sie diente aber auch der Kontrolle der Reinheit und der Quantifizierung der synthetisierten Substanzen, wobei nur fluoreszierende Substanzen detektierbar sind, bzw. Substanzen, die UV-Licht der Wellenlänge um 295 nm absorbieren.

10 STATISTIK

Datenreihen wurden mit Hilfe von Microsoft Excel 2000 statistisch ausgewertet. Alle in Diagrammen dargestellten Werte sind, wenn nicht anders angegeben, die Mittelwerte der Datenreihen mit den Mittelabweichungen als Fehlerbalken. Das Signifikanzniveau zwischen Datenreihen wurde mit Hilfe von t -Tests (zweiseitig, Typ 3) ermittelt. Unterschiede mit Irrtumswahrscheinlichkeiten $P \leq 0,05$ wurden als signifikant betrachtet, Irrtumswahrscheinlichkeiten zwischen $0,09 > P > 0,05$ als Trend bzw. Tendenz.