

3 Material, Methoden und Statistik

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien, Reagenzien, Substanzen und Kleinmaterialien

Die Chemikalien und Substanzen wurden alle in p. A. Qualität bezogen.

3.1.1.1 Chemikalien

2-Aminobenzoessäureethylester	Sigma, Deisenhofen
2-Desoxy-D-Glucose (2-DOG)	Sigma, Deisenhofen
2-Mercaptoethanol (BME)	Sigma, Deisenhofen
2-Propanol	Merck, Darmstadt
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	Sigma, Deisenhofen
3-O-Methyl-D-Glucose (3-OMG)	Sigma, Deisenhofen
Acrylamid/Bisacrylamid Gellösung (29 : 1)	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	ICN Biochemicals, Ohio, USA
Agarose	Life Technologies, Berlin
Agarose, low melt	Biozym Diagnostik, Hameln
Ammoniumpersulfat	Roth, Karlsruhe
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Boehringer Mannheim, Mannheim
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenol Blau	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Calciumnitrat	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Cytochalasin B (CB)	Sigma, Deisenhofen
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Deisenhofen
DEPC-H ₂ O	Sigma, Deisenhofen
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
N-Ethylmaleimid (NEM)	Sigma, Deisenhofen
Fluoromount-G	Southern Biotechnology Ass., Birmingham, USA
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Sigma, Deisenhofen
Gentamicin	Sigma, Deisenhofen
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Glykogen	Boehringer Mannheim, Mannheim
Glyzerin	Serva, Heidelberg
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Difco, Hamburg
HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]piperazin)	Roth, Karlsruhe
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt

K3 (Karpfenfutter)	Trouvit, Hamburg
Kaliumacetat	Fluka, Neu-Ulm
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Lithiumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Mineralöl	Sigma, Deisenhofen
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Deisenhofen
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Natriumpyruvat	Roth, Karlsruhe
Natriumsulfit	Merck, Darmstadt
Natriumtetraborat	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
p-Chloromercuribenzolsulphonat (pCMBS)	Sigma, Deisenhofen
Pferdeserum	Biochrom, Berlin
Phloretin	Sigma, Deisenhofen
Phenol	Roth, Karlsruhe
Ready Protein + (Szintillationsflüssigkeit)	Beckmann, München
Rinderserumalbumin (RSA)	Serva, Heidelberg
Tetracyclin	P-L-Biochemicals, Milwaukee, USA
Tetramethylethylendiamid (TEMED)	Biorad, München
Triethanolamin	Merck, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypton	Difco, Hamburg
Xylene Cyanol	ICN, Eschwege

3.1.1.2 Radioaktive Substanzen

2-[1,2- ³ H (N)]-Desoxy-D-Glucose	NEN, Boston - USA
3-O-Methyl-D-[1- ³ H]Glucose	Amersham Pharmacia Biotech Europa GmbH, Freiburg
³⁵ S markiertes UTP	Geschenk der Abteilung Radiologie und Nuklearmedizin im Universitätsklinikum Benjamin Franklin, Berlin-Steglitz

3.1.1.3 Reagenziensysteme

Cycle sequencing Kit	Perkin Elmer, Rodgau
mMESSAGE mMACHINE™	Ambion, Frankfurt a. M.
QIAGEN-tip 500	Qiagen, Hilden
QIAprep 8	Qiagen, Hilden
RNeasy™	Qiagen, Hilden
U.S.E. mutagenesis Kit	Pharmacia Biotech, Freiburg

Wizard™ Minipräps

Promega, Heidelberg

3.1.1.4 Restriktions- und andere Enzyme

Kollagenase Typ I

Sigma, Deisenhofen

Restriktionsenzyme, Reaktionspuffer:

AlwN I,	NEB-Puffer 4	New England Biolabs, Schwalbach
BamH I,	spezifisch + RSA	New England Biolabs, Schwalbach
Bbs I,	NEB-Puffer 2	New England Biolabs, Schwalbach
Bgl II,	NEB-Puffer 3	New England Biolabs, Schwalbach
BsmA I,	NEB-Puffer 3	New England Biolabs, Schwalbach
Bsr I,	NEB-Puffer 3	New England Biolabs, Schwalbach
BsrD I,	NEB-Puffer 2 + RSA	New England Biolabs, Schwalbach
BstX I,	NEB-Puffer 3	New England Biolabs, Schwalbach
BstY I,	spezifisch + RSA	New England Biolabs, Schwalbach
Hga I,	NEB-Puffer 1	New England Biolabs, Schwalbach
Msc I,	NEB-Puffer 4	New England Biolabs, Schwalbach
Msl I,	NEB-Puffer 2	New England Biolabs, Schwalbach
Nsi I,	spezifisch	New England Biolabs, Schwalbach
PflM I,	NEB-Puffer 3 + RSA	New England Biolabs, Schwalbach
Pml I,	NEB-Puffer 1 + RSA	New England Biolabs, Schwalbach
PpuM I,	NEB-Puffer 4	New England Biolabs, Schwalbach
Pst I,	NEB-Puffer 3	New England Biolabs, Schwalbach
Sma I,	NEB-Puffer 4	New England Biolabs, Schwalbach
Spe I,	NEB-Puffer 2 + RSA	New England Biolabs, Schwalbach
Stu I,	NEB-Puffer 2	New England Biolabs, Schwalbach
Taq I,	spezifisch + RSA	New England Biolabs, Schwalbach

Die Zusammensetzungen der Pufferlösungen sind in Kapitel 3.1.2.2 aufgeführt.

T4-DNS Ligase

New England Biolabs, Schwalbach

T4-Polynukleotid Kinase

New England Biolabs, Schwalbach

3.1.1.5 Nukleotide

1 kB DNS-Standard (0,3 bis 12,2 kB)

Gibco BRL, Gaithersburg - USA

1 kB RNS-Standard (0,24 bis 9,5 kB)

Gibco BRL, Gaithersburg - USA

Nukleotide für die PCR

Roth, Karlsruhe

Oligonukleotide

Gibco BRL, Eggenstein

TIB MolBiol, Berlin

3.1.1.6 Antikörper

Anti-Rabbit IgG, FITC Conjugate in goat

Sigma, Deisenhofen

Peptidantikörper Anti-GLUT1 AK1462

BioGenes, Berlin

3.1.1.7 Sonstiges

Deckgläschen

Marienfeld, Lauda-Königshofen

Excel 4/0

Ethicon, Norderstedt

Filter (0,2 µm)

Schleicher & Schüll, Dassel

Glaskapillare

Drummond, Broomall, USA

Kim Wipes

Kimberly-Clark, Koblenz

Kulturröhrchen

Sarstedt, Nümbrecht

Monocryl 4/0	Ethicon, Norderstedt
Objektträger	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Parafilm	American National Can, Neenah, USA
Polaroid Filmkassetten Nummer 553	Polaroid, Berlin
Sterilfilter klein	Schleicher & Schüll, Dassel
Sterilfilter groß	Falkon; über Recker, Berlin

3.1.2 Medien und Lösungen

Die meisten Lösungen und Medien wurden nach den Angaben von Sambrook et al. (Sambrook et al., 1989) hergestellt. Aufgelistet sind die Medien, deren konkrete Substanzangaben im Methodenteil fehlen. Die Konzentrationsangaben werden als Endkonzentrationen angeführt.

3.1.2.1 Wachstumsmedien und Pufferlösungen für Bakterien

- Agarplatten:	1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 125 mM NaCl, 1 mM NaOH, 1,5 % Agar-Agar
- LB Medium:	1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 125 mM NaCl, 1 mM NaOH
- Puffer 1 für kompetente Zellen	100 mM KCl, 30 mM Kaliumacetat, 60 mM CaCl ₂ , 15 % Glycerin (v/v), mit 200mM Essigsäure auf pH 5,8, steril filtriert, Lagertemperatur 4° C.
- Puffer 2 für kompetente Zellen	10 mM MOPS, 10 mM KCl, 75 mM CaCl ₂ , 15 % Glycerin (v/v), mit 10 M NaOH auf pH 6,8, steril filtriert, Lagertemperatur 4° C.
- SOC-Medium	2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 125 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 40 mM Glucose

3.1.2.2 Pufferlösungen für Restriktionsendonukleasen

NEB-Puffer 1:	10 mM Bis-Tris-Propan-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, pH 7,0
NEB-Puffer 2:	50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, pH 7,9
NEB-Puffer 3:	100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, pH 7,9
NEB-Puffer 4:	50 mM Kaliumacetat, 20 mM Tris-Acetat, 10 mM Magnesiumacetat, 1 mM DTT, pH 7,9
spezieller NEB-Puffer (BamH I):	150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, pH 7,9
spezieller NEB-Puffer (BstY I):	10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, pH 7,9
spezieller NEB-Puffer (Nsi I):	100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, pH 8,4
spezieller NEB-Puffer (Taq I):	100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , pH 8,4
RSA für Restriktionsenzyme	100 µg•ml ⁻¹

3.1.2.3 Lösungen für die Agarosegelelektrophorese

- TBE	89,2 mM Tris-HCl, 89 mM H ₃ BO ₃ (Borsäure),
-------	--------------------------------------------------------------------

- TAE	0,2 mM Na ₂ -EDTA (Titriplex III) 40 mM Tris, 0,12 % Essigsäure (v/v), 10 mM Na ₂ -EDTA (Titriplex III)
- Probenpuffer	0,025 % Bromphenol Blau (w/v), 0,025 % Xylene- Cyanol (w/v), 3 % Glycerin (v/v)

3.1.2.4 Pufferlösungen für die Oozytenbehandlung

- Modifiziertes Barths-Medium (nach Colman et al., 1984)	88 mM NaCl, 1mM KCl, 2,4 mM NaHCO ₃ , 0,82 mM MgSO ₄ , 0,41 mM CaCl ₂ , 0,33 mM Ca(NO ₃) ₂ , 10 mM, 2,5 mM Na-Pyruvat, pH 7,5 (Für die Kultivierung der Oozyten wurden 0,005 % (w/v) Gentamicin und 0,1 % (w/v) RSA zugesetzt)
- PBS (Fluoreszenzmikroskopie)	137 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,47 mM KH ₂ PO ₄ , mit HCl auf pH 7,4
- Stopplösung	0,1 mM Phloretin, 137 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,76 mM KH ₂ PO ₄ , mit HCl auf pH 7,4

3.1.3 Geräte

Auto-Gamma Cobra	Packard, Meriden CT, USA
Axiovert 100 – Laser-Scanning Microscope 510	Zeiss, Jena
Bakterienschüttler G-25	New Brunswick Scientific, Edison - USA
Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Brutschrank BM 400	Memmert, Schwabach
Centrikon - H 401	Kontron, Zürich
DNS-Sequenzier ABI PRISM 377	Perkin Elmer, Rodgau
Flüssigszintillationsspektrophotometer LS 2800	Beckman, München
Fotodokumentationsanlage MP4 Land Camera	Polaroid Corporation, Cambridge, USA
Mikroinjektorpipette	Drummond, Broomall, USA
Mikromanipulator	Leitz, Wetzlar
Mikrowelle Egt	Europastyle, Berlin
Kapillarziehgerät Pul-1 E	World Precision Instruments, über Harry Fein, Mauer
Rotationsschwenker A258 (Ten Roller Mixer)	Denley, Sussex, England
Schüttler Reax 3	Heidolph, Schwabach
Spannungsquelle El. phor. Powerpack P 24	Biometra, Göttingen
Spektralphotometer PM 6	Carl Zeiss, Jena
Spektrphotometer Uvikon 930	Kontron, Zürich
Stereomikroskop - M37	Wild, Heerbruck
Tischkühlzentrifuge Z 252 MK	Hermle Labortechnik, Wehingen
TRIO-Thermocycler	Biometra, Göttingen
UV-Transilluminator BP 111	Bioblock Scientific, Illkirch
Vakuum-Absaugkammer QIAvac 6S	Qiagen, Hilden
Vakuum-Absaugkammer Vac-Man™	Promega, Heidelberg
Varifuge 3.0R	Heraeus, Hanau

3.1.4 Computer und Software

ABI PRISM Data Collection V. 2.1	Perkin Elmer, Rodgau
Corel Draw 8.0	Corel, Ottawa, Kanada
Excel 97	Microsoft, Redmond, USA
LSM 5	Zeiss, Jena
Origin 5.0	MicroCal, Northampton - USA
PC mit AMD K6 Prozessor	Zolltronic, Berlin
Power PC mit Mac OS 9	Pandasoft, Berlin
Swiss-Pdb viewer	ExPASy, Genf, Schweiz
Windows 98 SE	Microsoft, Redmond, USA
Windows NT	Microsoft, Redmond, USA
Word 97	Microsoft, Redmond, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologischer Teil

3.2.1.1 Das pSP64T-GLUT1 Plasmid

Für die verschiedenen Klonierungsstrategien und zur RNS-Synthese wurde ein speziell für *X. Oozyten* entwickelter Vektor eingesetzt. Dieser Vektor besteht zum größten Teil aus dem kommerziell zu beziehenden Klonierungsvektor pSP64 von Promega. Er besitzt einen Replikationsursprungsort, der für die Vermehrung des Plasmids in *E. coli* verantwortlich ist. In einem Teil der Vektorsequenz ist das Protein β -Laktamase kodiert, das Bakterienzellen eine Resistenz gegenüber Ampicillin verleiht. Vor der Polylinkersequenz dieses Vektors befindet sich eine SP6-Promotor Erkennungssequenz, die es einer SP6-Polymerase ermöglicht nachfolgende cDNS in die entsprechende cRNS zu übersetzen. Eingefügt in den Polylinker des Vektors sind kodierende Sequenzteile des β -Globinproteins von *Xenopus laevis* (Krieg & Melton, 1987). Angehängt am Ende dieser Sequenz befindet sich ein Poly-Adenosin Poly-Cytosin Schwanz, der dazu dient, die Stabilität der übersetzten cRNS zu erhöhen. In der Arbeit von Krieg und Melton wurde nachgewiesen, dass synthetisierte cRNS, die von dieser Globinsequenz flankiert und in *X. Oozyten* injiziert wurde, gegenüber den in der Zelle befindlichen RNasen wesentlich unempfindlicher war und somit zu einer höheren Expression des kodierenden Proteins führte. Dieser über mehrere Klonierungsschritte entwickelte Vektor wird pSP64T genannt.

Innerhalb der Globinsequenz des pSP64T befindet sich eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease Bgl II. Nachdem der pSP64T mit der entsprechenden Endonuklease linearisiert wurde, konnte die cDNS des humanen GLUT1 als BamH I Fragment in diese Schnittstelle kloniert werden. Das entstandene Konstrukt wird als pSP64T-GLUT1 bezeichnet und diente als Vorlage/Matrize für den von Wellner et al. (Wellner et al., 1995a) entwickelten cysteinfreien GLUT1. Die in dieser Arbeit erzeugten Cysteinmutanten sind auf dieses cysteinfreie GLUT1 Konstrukt zurückzuführen.

Für begleitende Untersuchungen, die in dieser Arbeit nicht dargestellt sind aber als zusätzliche Kontrollen verwendet wurden, wurde ein leicht verändertes Plasmid, das pSP64T-GLUT1-k (k steht für kurz), hergestellt. Die cDNS des GLUT1 (Mueckler et al., 1985) kodiert in den ersten 1476 Basen plus Stopcodon das funktionell aktive Protein. Die nachfolgenden 994 Basen gehören zum nichtkodierenden 3'-DNS Bereich.

Dieser wurde über eine 44 Basen hinter dem Stoppkodon liegende BstY I Restriktions-erkennungssequenz reduziert, indem ein BamH I/BstY I-Genfragment des GLUT1 in den mit Bgl II geöffneten pSP64T einkloniert wurde. Das 5716 Basen umfassende Plasmid des pSP64T-GLUT1 konnte so auf 4772 Basen gekürzt werden. Durch den Wegfall dieses Sequenzstücks wurden redundante Restriktionsstellen vermindert. Dies führte letztlich zu mehr Möglichkeiten in der Strategieentwicklung von Klonierungsansätzen.

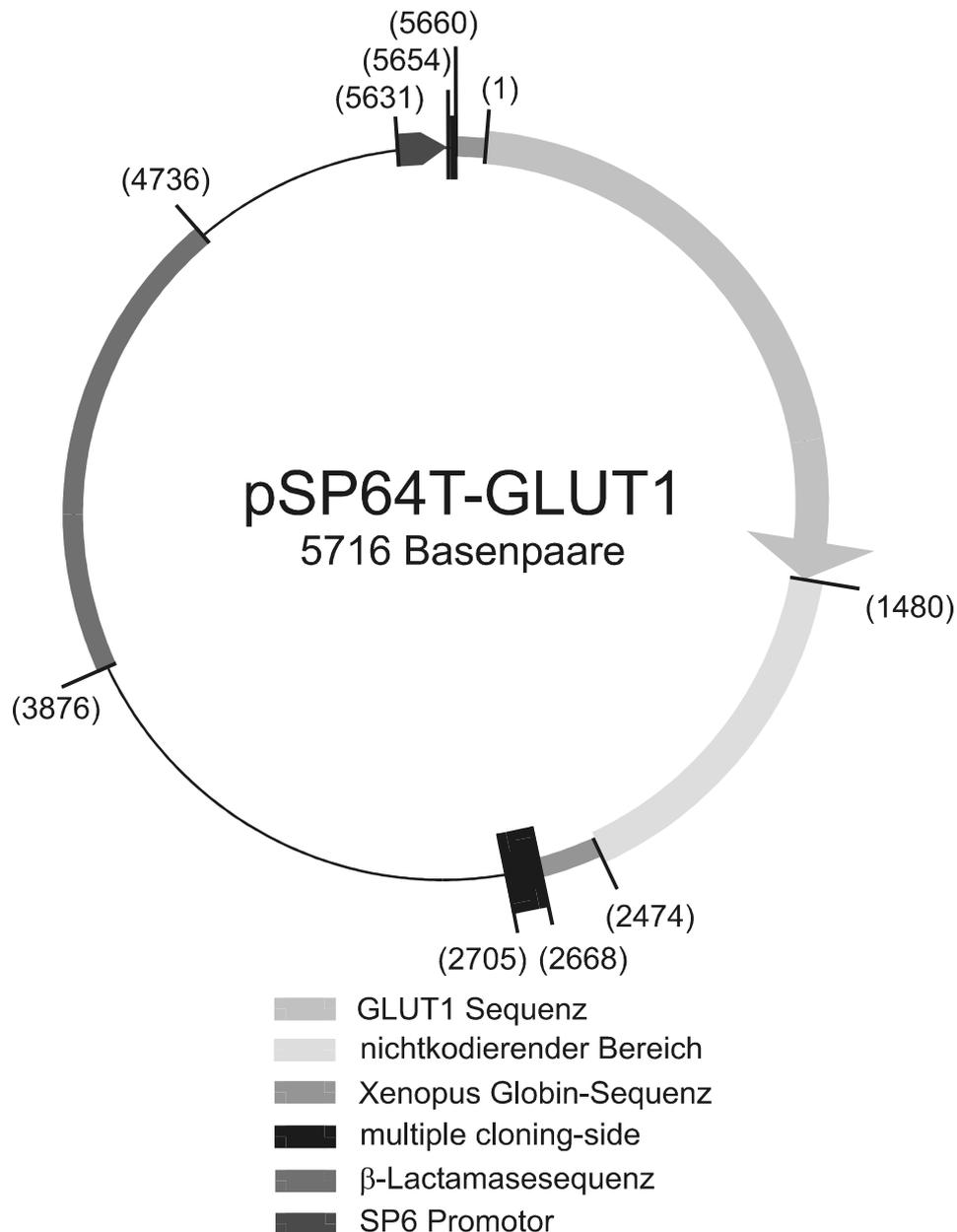


Abb. 4: Schematische Darstellung des Klonierungs- und Expressionsvektors als pSP64T-GLUT1 Plasmid. Die eingeklammerten Zahlen geben die Basennummer an, wobei das Adenin des Startkodons vom GLUT1 als erste Base beziffert wurde.

3.2.1.2 Bakterienstämme

Für die Vermehrung der DNS werden in der Molekularbiologie Bakterien eingesetzt. Besonders häufig werden dabei die Stämme des Bakteriums *Escherichia coli* verwendet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Stämme dieses Bakteriums verwendet. Für die Klonierung und Vermehrung der DNS diente der Stamm MV 1190 (Messing, 1983), der folgenden Genotyp besitzt:

thi, sup E, (Δ sr1-recA)306: TN10 (tet^r) Δ (lac-proAB) [F:tra D36, proAB, lacI^q Δ M15].

In der Mutagenese dagegen wurde der *E. coli* Stamm NM 522 mutS benutzt. Dieser ist ein speziell für die Mutagenese gezüchteter Stamm, dem DNS-Reparaturmechanismen fehlen, so dass bewusst induzierte Veränderungen der DNS über solche Mechanismen nicht wieder rückgängig gemacht werden können. Der Genotyp dieses Stammes lautet:

thi, sup E, Δ (hsdMS-mcrB)5, Δ (lac-proAB) [mutS::Tn10] F' [proAB⁺ lacI^q lacZ Δ M15].

Damit Bakterien spontan Plasmide aufnehmen können, müssen die Bakterien zunächst chemisch manipuliert werden. Die Art und Weise der chemischen Behandlung hängt dabei von der eingesetzten Transformationsmethode ab, wobei in dieser Arbeit nur Transformanden mittels Hitzeschock (Sambrook et al., 1989) erzeugt wurden. Die chemisch behandelten Zellen werden als kompetente Zellen bezeichnet. Für die Herstellung der kompetenten Zellen müssen die in dieser Arbeit eingesetzten Bakterien ein Resistenzgen gegenüber dem Antibiotikum Tetracyclin tragen.

3.2.1.3 Kompetente Bakterienzellen für die Hitzeschock-Transformation

Als Arbeitsgrundlage für die Herstellung der kompetenten Zellen wurde das in dem U.S.E. Mutagenesis Kit (Pharmacia Biotech) beschriebene Protokoll verwendet, das an Sambrook et al. (Sambrook et al., 1989) angelehnt ist.

① 100 ml LB-Medium mit $15 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Tetracyclin werden mit 1 ml aus einer 4 ml $15 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Tetracyclin-LB-Medium umfassenden Übernachtskultur des entsprechenden Bakterienstammes geimpft. Die Lösung wird bei 37°C und $220 \text{U}\cdot\text{min}^{-1}$ im Bakterien-schüttler (G-25, New Brunswick Scientific) inkubiert.

② Erreicht die Zelldichte eine Extinktion von 0,4 - 0,5 bei 600 nm (Spektralphotometer PM 6, Carl Zeiss) entsprechend einer Zelldichte von ca. $1\cdot 10^8$ Zellen $\cdot\text{ml}^{-1}$, werden die Zellen zunächst 15 min auf Eis gekühlt und dann mit $3500 g_{av}$ 15 min bei 4°C zentrifugiert (Centrikon - H 401, Kontron).

③ Dekantierung des Überstandes und Resuspendieren der Zellen in 33,3 ml steril filtriertem Puffer I für kompetente Zellen.

④ Es erfolgt eine Inkubation auf Eis für 1 h. Anschließend werden die Zellen mit $3500 g_{av}$ bei 4°C zentrifugiert.

⑤ Dekantierung des Überstandes und Resuspendieren der Zellen in 4 ml steril filtriertem Puffer II für kompetente Zellen.

⑥ Erneute Inkubation auf Eis für 15 min.

Danach erfolgte die Aliquotierung der Zellen in 500 μl Portionen mit anschließender Schockgefrierung durch flüssigen Stickstoff. Die Aliquote wurden bei -80°C aufbewahrt.

3.2.1.4 Vermehrung, Gewinnung und Reinigung von Plasmid-DNS

3.2.1.4.1 Kultivierung der Bakterienzellen

Die Kultivierung der Bakterien fand in LB-Medium bzw. auf Agar-Platten statt. Dabei wurde den Medien ein Antibiotikum, entsprechend der Resistenzfähigkeit des Bakterienstammes, in den Konzentrationen zugegeben, wie es die Versuchsbedingungen erforderten (zwischen 50 bis $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Das Animpfen der Flüssigmedien erfolgte durch Zugabe einer kleinen Menge Bakterienkultur aus dem Bakterienstock, die mit

einem sterilem Zahnstocher herausgebrochen wurde. Über die Verwendung von Festmedien siehe Kapitel 3.2.1.8. Das Wachstum der Bakterien in Flüssigmedien erfolgte bei 37° C für 10 – 18 h und 180 – 230 U•min⁻¹ im Bakterieneschüttler (G-25, New Brunswick Scientific). Die Inkubation auf Festmedien dagegen verlief abgedeckt im Brutschrank (BM 400, Memmert) unter den gleichen Temperatur- und Zeitbedingungen.

3.2.1.4.2 Präparation von Plasmid-DNS

Für die Präparation der DNS wurden bei einer kleinen Plasmidpräparation (Minipräp) 4 ml bzw. für eine große Plasmidpräparation (Maxipräp) 100 ml große Bakterienkulturen hergestellt. Dem Nährmedium wurde nach Animpfen durch Bakterienzellen das Antibiotikum Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg•ml⁻¹ zugesetzt. Damit wurde sichergestellt, dass nur die Bakterien in der Nährlösung wuchsen, die das Plasmid mit dem Gen für die β-Laktamase (Ampicillinresistenz) besaßen. Nach ausreichender Wachstumszeit wurden der Kultur 700 µl entnommen und mit 300 µl 50 %igem sterilem Glycerin vermischt. Diese Suspension wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° C gelagert. Sie diente als Bakterienstock. Der Rest der Kultur wurde für die kleine bzw. große Plasmidpräparation verwendet.

Das den Präparationsmethoden gemeinsame Prinzip der Plasmid-DNS-Isolierung besteht darin, die Plasmide über eine Affinitätschromatographie von den übrigen aufgeschlossenen Zellbestandteilen einschließlich genomischer DNS zu trennen und anschließend zu eluieren. Die drei verschiedenen in dieser Arbeit eingesetzten Präparationsmethoden, sowie die Reinigung der DNS aus Agarosegelen basierten auf den Arbeiten von Birnboim und Doly (Birnboim & Doly, 1979), Birnboim (Birnboim, 1983), Sambrook et al. (Sambrook et al., 1989) und Ausubel et al. (Ausubel, 1991).

3.2.1.4.2.1 Kleine Plasmidpräparation - Plasmid-Minipräparation

Die Gewinnung von kleinen Plasmidmengen erfolgte mit den kommerziell zu beziehenden DNS-Isolierungskits Wizard™ der Firma Promega bzw. QIAprep von Qiagen. In beiden Systemen waren neben speziellen Kleinmaterialien auch die für die Aufarbeitung notwendigen Lösungen enthalten. Das System von Promega wurde eingesetzt, wenn weniger als 21 einzelne Klone zu analysieren waren. Alternativ dazu kam bei einer größeren Anzahl der Klone das System von Qiagen zur Anwendung.

3.2.1.4.2.1.1 Kleine Plasmidpräparation nach Promega

Zur Kultivierung der Bakterienzellen siehe 3.2.1.4.1.

- ① Entnahme des Bakterienstocks und Zentrifugation der restlichen Zellen bei 1350 g_{av} für 3 – 5 min (Varifuge 3.0R, Heraeus).
- ② Den Überstand verwerfen und das Pellet in 200 µl Lösung I (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM EDTA, 100 mg•ml⁻¹ RNase A) resuspendieren.
- ③ Zugabe von 200 µl Lösung II (200 mM NaOH und 1 % SDS). Die Probe wird vorsichtig aufgeschüttelt und für eine vollständige Zelllyse 2 min stehen gelassen.
- ④ Zugabe von 200 µl Lösung III (1,32 M Kaliumacetat (pH 4,8)), kräftig aufschütteln und 5 min bei 13500 g_{av} (Biofuge pico, Heraeus) zentrifugieren.
- ⑤ Die flüssige Phase wird abgenommen, 1 ml Harzlösung (Wizard™ Minipräp DNS Purification Resin) zugeben und die Probe mehrmals über 180° geschwenkt. Diese Suspension wird in eine 5 ml Spritze überführt, an deren Ende anstatt einer Kanüle eine Wizardsäule aufgestöpselt ist. Diese Säule wiederum wird auf die Vakuumkammer „Vac-Man™“ (Promega) aufgesetzt.

⑥ Anlegen des Vakuums an die Vakuumkammer, die gelöste Plasmid-DNS bindet während des Durchlaufs der Lösung an das Säulenmaterial.

⑦ Waschen der Säule durch Zugabe von 2 ml Waschpuffer (84 mM NaCl, 8,4 mM Tris-HCl (pH 7,5), 2,1 mM EDTA, 58 % reiner Ethanol) durch die Spritze. Nach dem Waschvorgang erfolgt eine 3 minütige Zentrifugation der Wizardssäule bei 13500 g_{av} .

⑧ 55 μ l ca. 50° C warmes ddH₂O wird auf die Säule pipettiert, eine Minute inkubiert und das Eluat durch eine kurze Zentrifugation der Säule bei 13500 g_{av} in einem neuen Gefäß aufgefangen.

Danach konnte der Gehalt an DNS photometrisch bestimmt (siehe 3.2.1.5) und bei 4° C gelagert werden.

3.2.1.4.2.1.2 Kleine Plasmidpräparation nach Qiagen

① Entnahme des Bakterienstocks und Zentrifugation der restlichen Zellen bei 1350 g_{av} für 3 - 5 min (Varifuge 3.0R, Heraeus).

② Überstand verwerfen und das Pellet in 250 μ l Puffer P1 resuspendieren.

③ Zugabe von 250 μ l Puffer P2, die Probe wird vorsichtig aufgeschüttelt und für eine vollständige Zelllyse 2 min stehen gelassen.

④ Zugabe von 500 μ l Puffer N3, Lösung kräftig aufschütteln und 10 min bei 13500 g_{av} (Biofuge pico, Heraeus) zentrifugieren.

⑤ Die flüssige Phase abnehmen und auf eine Säule geben, die in Gruppen als QIAprep 8 organisiert sind und in der Vakuumkammer QIAvac 6S eingesetzt werden können.

⑥ Anlegen des Vakuums an die Vakuumkammer, die gelöste Plasmid-DNS bindet während des Durchlaufs der Lösung an das Säulenmaterial.

⑦ Waschen der Säule durch Zugabe von 1 ml Puffer PB.

⑧ Waschen der Säule durch Zugabe von 1 ml Puffer PE. Anschließend erfolgt die Trocknung durch Beibehaltung des Vakuums von 5 min und dem Abtupfen der Säulenenden mit einem fusselfreien Tuch (Kim Wipes).

⑨ 100 μ l ca. 50° C warmes ddH₂O wird auf die Säule pipettiert und 1 min inkubiert. Durch erneutes Anlegen eines Vakuums an die Kammer wird das Eluat in ein neues Gefäß überführt.

Danach konnte der Gehalt an DNS photometrisch bestimmt (siehe 3.2.1.5) und bei 4° C gelagert werden.

3.2.1.4.2.2 Große Plasmidpräparation – Plasmid-Maxipräparation

Die Präparation großer Mengen DNS erfolgte mit dem Kit für große Plasmidpräparationen QIAGEN-tip 500 der Firma Qiagen.

① Entnahme des Bakterienstocks mit anschließender Zentrifugation der restlichen Zellen bei 7200 g_{av} und 4° C für 15 min (Centrikon H-401, Kontron).

② Der Überstand wird dekantiert und die Bakterien mit 10 ml 4° C kalten Resuspensionspuffer (50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA, 100 μ g•ml⁻¹ RNase A) aufgenommen.

③ Zugabe von 10 ml Lysepuffer (200 mM NaOH und 1 % SDS). Die Probe wird kräftig durchgeschüttelt und für eine vollständige Zelllyse 5 min stehen gelassen.

④ Zugabe von 10 ml 4° C kalten Neutralisationspuffer (3 M Kaliumacetat (pH 5,5)), Probe kräftig durchschütteln und 20 min auf Eis inkubieren.

⑤ Anschließend erfolgt eine 30 minütige Zentrifugation bei 4° C und 27000 g_{av} .

⑥ Der Überstand wird durch ein Stück Mull auf eine Qiagen-Säule verbracht, über die vorher 10 ml Equilibrierungspuffer (750 mM NaCl, 50 mM MOPS (pH 7,0), 15 %

Ethanol, 0,15 % Triton X-100) geströmt sind. Anschließend wird die Säule mit 60 ml Waschpuffer (1 M NaCl, 50 mM MOPS (pH 7,0), 15 % Ethanol) gespült.

⑦ Durch das Aufbringen von 15 ml Elutionspuffer (1,25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8,5), 15 % Ethanol) auf die Säule wird die Plasmid-DNS eluiert. Der aufgefangenen DNS wird anschließend 10,5 ml 2-Propanol zugegeben. Nach leichtem Schwenken wird die Probe bei 4° C und 38850 g_{av} 30 min zentrifugiert.

⑧ Der Dekantierung des Überstandes und der Zugabe von 7 ml 70%igen 4° C kaltem reinem Ethanol zum Pellet folgt nochmals eine Zentrifugation bei 38850 g_{av} und 4° C für 30 min.

⑨ Der Überstand wird abgegossen, das Pellet unter Vakuum getrocknet und die Plasmid-DNS in 100 - 200 μ l ddH₂O unter Bewegung gelöst.

Die Konzentration an DNS wurde mittels photometrischer Messung bestimmt (siehe 3.2.1.5) und bei 4° C gelagert.

3.2.1.4.3 Reinigung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen

Für einige Klonierungsstrategien war es notwendig DNS-Fragmente durch eine Agarosegelelektrophorese voneinander zu trennen und aus dem Gel zu reinigen. Dies wurde nach folgender Arbeitsmethode durchgeführt:

① Erhitzen des Gelstückes auf 65° C und Zugabe von einem Volumen Phenol (es werden mindestens 100 mg Gel eingesetzt, da sonst zu große DNS-Verluste entstehen).

② 2 min vortexen, 10 min Zentrifugation bei 13500 g_{av} (Biofuge pico, Heraeus) und Überführung des Überstandes in ein neues Gefäß.

③ Zugabe von einem Volumen Phenol und Wiederholung von Schritt ②.

④ Zugabe von einem Volumen Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) und Wiederholung von Schritt ② mit 5 minütiger Zentrifugation bei 13500 g_{av} .

⑤ Zugabe von einem Volumen Chloroform, kurz vortexen und 30 sec zentrifugieren mit anschließender Überführung des Überstandes in ein neues Gefäß.

⑥ Zugabe von zwei Volumen eiskaltem reinen Ethanol, 0,2 Volumen 10 M Ammoniumacetat und 0,015 % Glykogen (v/v - Boehringer Mannheim), kurz vortexen.

⑦ DNS-Fällung bei -20° C für mindestens 30 min.

⑧ 30 min Zentrifugation bei 13500 g_{av} , dekantieren des Überstandes und Zugabe von 250 μ l 70 %igem 4° C kaltem reinen Ethanol.

⑨ 30 min Zentrifugation bei 13500 g_{av} , Dekantierung des Überstandes und Trocknung der DNS bei 37° C.

Nach dem Trocknen wurde die DNS in 10 bis 30 μ l ddH₂O aufgenommen und unter Bewegung gelöst. Anschließend konnte die DNS-Konzentration photometrisch bestimmt werden (siehe 3.2.1.5).

3.2.1.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNS und RNS

Aufgrund der Ringstruktur der Purin- und Pyrimidinbasen hat die DNS bzw. RNS ein Adsorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Beziehung Nukleinsäuremenge zur Extinktion verhält sich linear und das weit über den Extinktionswert 1,0 hinaus. Berechnet wurde die DNS-Konzentration wie folgt:

$$DNS [\mu g/ml] = 50 \cdot Extinktion \cdot Verdünnungsfaktor$$

Der Faktor 50 in dieser Formel gilt für doppelsträngige DNS. Er ändert sich auf 40, wenn einzelsträngige DNS oder RNS gemessen wird (Sambrook et al., 1989).

① 1 bis 10 μl der zu bestimmenden Probe wird auf 125 μl aufgefüllt und in eine Quarzglasmikroküvette überführt.

② Messung der Extinktion in einem Spektrophotometer (Uvikon 930, Kontron) bei 260 und 280 nm.

Die Konzentration wurde nach der oben beschriebenen Formel berechnet und der Quotient zwischen 260 und 280 nm gebildet. Er ist ein Maß für die Reinheit der DNS im Vergleich zu den aromatischen Aminosäuren, die ihr Adsorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 280 nm haben. Dieser Quotient sollte für DNS bei 1,7 bis 1,9, bzw. für die RNS bei 1,8 bis 2,0 liegen (Sambrook et al., 1989).

3.2.1.6 Restriktionsfragmentanalyse, präparative DNS-Schnitte und Ligation

Jede DNS hat aufgrund ihrer spezifischen Primärsequenz eine individuelle Verteilung von Erkennungsbereichen für Restriktionsenzyme. Durch den Einsatz dieser Enzyme wird die DNS in verschieden große Fragmente geschnitten, die nach elektrophoretischer Auftrennung in einem Agarosegel ein charakteristisches Bandenmuster ergeben. Wird die Primärsequenz in den Erkennungsbereichen dieser Enzyme verändert, kommt es zu einer Änderung des Bandenmusters. Die Auftrennung in einem Agarosegel kann somit zu einer ersten Analyse der DNS nach Restriktionsverdau eingesetzt werden. Auch ist es möglich, durch die spezifischen Schnitte definierte DNS-Sequenzen voneinander zu trennen und über eine Ligation neu zu kombinieren.

3.2.1.6.1 Restriktionsfragmentanalyse und präparative DNS-Schnitte

Die Restriktionsenzyme wurden bei der Firma New England BioLabs bezogen. Diese Firma vertreibt für ihre Restriktionsenzyme 4 verschiedene Standardpuffer (Reaktionspuffer 1 bis 4), die im Reaktionsansatz eingesetzt werden. Bei einigen Enzymen werden spezifische Reaktionspuffer mitgeliefert, da keine befriedigenden Ergebnisse mit den Standardpuffern erreicht werden können.

① Je nach erwarteter Fragmentgröße werden 0,5 – 2 μg DNS, für präparative Schnitte bis zu 50 μg DNS eingesetzt. Zugabe von 0,5 - 20 Einheiten Enzym (je nach Aktivität des Enzyms und eingesetzter DNS-Menge), bei präparativen Schnitten bis zu 400 Einheiten.

② Zugabe von Reaktionspuffer (NEB-Puffer 1, 2, 3, oder 4 bzw. spezifisch - siehe 3.1.2.2), der optimal zum jeweiligen Restriktionsenzym passt. Bei analytischen Schnitten wird mit dH_2O auf 20 μl , bei präparativen Schnitten auf bis zu 400 μl aufgefüllt. Je nach verwendetem Enzym erfolgt eine Zugabe von 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ RSA.

③ Die Inkubation lag in Abhängigkeit von der Enzymaktivität und der eingesetzten DNS-Menge zwischen 2 - 16 h bei einer Temperatur zwischen 25 - 65° C.

Nach dem Schnitt erfolgte die Trennung der DNS-Fragmente durch die Agarosegelelektrophorese (siehe 3.2.1.6.2.).

3.2.1.6.2 Agarosegelelektrophoresen

Die Auftrennung der DNS-Fragmente erfolgte nach einer von Aaij und Borst (Aaij & Borst, 1972) beschriebenen Methode, in der die Fragmente nach ihrer Größe im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Für die Trennung mit anschließender Reinigung der DNS-Fragmente aus dem Agarosegel wurde eine spezielle bei Niedertemperatur schmelzende Agarose (low melt, Biozym) verwendet. Für die Größenbestimmung der cRNS aus der in vitro RNS-Synthese musste ein denaturierendes Agarosegel verwendet werden, da die sekundäre Struktur der Transkripte eine fehlerhafte Migration bewirkt

und zusätzlich multiple Banden auftreten können (Ambion-Incorporation, 1997). Die Herstellung und Durchführung der denaturierenden Agarosegelelektrophorese war angelehnt an ein Arbeitsprotokoll von Sambrook et al. (Sambrook et al., 1989).

3.2.1.6.2.1 Analytische und präparative Agarosegelelektrophorese

① Eine entsprechende Menge Agarose wurde für 0,8 bis 2,5%ige Gele eingewogen und je nach Gelgröße mit TBE oder TAE (für Niedertemperatur schmelzende Agarosegele) aufgefüllt.

② In der Mikrowelle (Egt, Europastyle) wurde die Suspension aufgeköcht und anschließend auf ca. 50° C abgekühlt.

③ Zugabe von 0,035 % Ethidiumbromid (v/v) zur späteren Visualisierung der Nukleinsäurebanden.

Die Lösung wurde, nachdem das Ethidiumbromid homogen verteilt war, unter dem Abzug in die vorbereiteten Gelkammern gegossen. Nach vollständiger Gelbildung wurde der Probenkamm entfernt und das Gel in eine mit TBE bzw. TAE gefüllte Laufkammer überführt, so dass es ausreichend mit Flüssigkeit bedeckt war.

④ 3 µl Probenpuffer wird den Proben zugegeben und diese in die Geltaschen des Agarosegels überführt. In eine der Geltaschen wird 1 µg eines gelösten DNS-Größenstandards aufgetragen.

⑤ Start des Trennungslaufs bei 60 Volt (Spannungsquelle Powerpack 24, Biometra) und nach Eintritt der Proben in das Gel Erhöhung der elektrischen Spannung auf 100 Volt.

Die Elektrophorese für ein bei Niedertemperatur schmelzendes Agarosegel musste aufgrund der Wärmeentwicklung unter Kühlung stattfinden.

Nach ca. 30 Minuten konnte das Muster der DNS-Fragmente im Vergleich zum aufgetragenen Größenstandard unter UV-Licht (UV-Transilluminator BP 111, Bioblock Scientific) analysiert und zur Dokumentation photographiert (Fotodokumentationsanlage MP4 Land Camera, Polaroid) werden. Anschließend wurden die Fragmente für präparative Schnitte mit einem Skalpell aus dem Gel herausgetrennt und entsprechend den Kapiteln 3.2.1.4.3 bzw. 3.2.1.6.3 weiter behandelt.

3.2.1.6.2.2 Denaturierende Agarosegelelektrophorese

Zunächst wurde die Gelapparatur mit 1 % SDS gereinigt, um RNasen zu entfernen bzw. zu inaktivieren.

① Für ein 1 %iges Gel wird die entsprechende Menge Agarose eingewogen, mit 20 mM MOPS pH 7,0, 5 mM Natriumacetat und 1 mM EDTA versetzt und durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlung auf ca. 50° C wird zu der Lösung unter dem Abzug 100 %iges Formaldehyd in der Menge entsprechend einer Endkonzentration von 0,05 % (v/v) zugegeben, gut gemischt und weitere 10 min bei dieser Temperatur gehalten.

② Gießen des Gels in die vorbereitete Gelkammer und mindestens 1h warten, bis das Gel vollständig polymerisiert ist.

③ 1 – 2 µg cRNS aus der RNS-Synthese (siehe 3.2.1.9.) werden mit 47,5 % Formamid, 0,0125 % Xylene Cyanol, 0,0125 % Bromphenol Blau, 0,25 mM EDTA in 20 µl DEPC-H₂O bei 90° C für 5 min erhitzt.

③ Zugabe von 1 µl Ethidiumbromid (1 mg•ml⁻¹) und kurze Zentrifugation bei 13500 g_{av} (Biofuge pico, Heraeus). Nach Entfernung des Probenkammes aus dem Gel werden die Proben in die Geltaschen überführt. Eine der Geltaschen wird mit 4,5 µg eines speziellen RNS-Größenstandards, der wie die cRNS-Proben behandelt wird, beladen. Als Elektrophoresepuffer dient 20 mM MOPS pH 7,0, 5 mM Natriumacetat

und 1 mM EDTA, der das Gel in der Laufkammer ausreichend bedeckt.

④ Start der Gelelektrophorese bei 75 Volt für ca. 30 - 60 min.

Unter einer UV-Lichtquelle (UV-Transilluminator BP 111, Bioblock Scientific) konnte die cRNS im Vergleich zum RNS-Standard analysiert und zur Dokumentation fotografiert (Fotodokumentationsanlage MP4 Land Camera, Polaroid) werden.

3.2.1.6.3 Ligation

Bei der Ligation wurden ausgewählte DNS-Fragmente, die nach Reaktion mit Restriktionsenzymen entstanden, in die entsprechenden Schnittstellen des Plasmids kloniert. Dafür wurden die geschnittenen DNS-Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese voneinander getrennt und die entsprechenden Banden aus dem Gel herausgetrennt. Diese DNS enthaltenden Gelstücke wurden entweder direkt oder als gereinigte DNS aus dem Gel (3.2.1.4.3) in der Ligation eingesetzt. Für die Transformation, die nach der Ligation erfolgte, sollten 50 – 100 ng legierte DNS vorhanden sein. Deshalb musste die Menge der DNS-Fragmente, die legiert werden sollte, vorher kalkuliert werden. Sehr wichtig dafür sind die Größenverhältnisse zwischen den zu legierenden DNS-Fragmenten. Standardmäßig wurde das Verhältnis zwischen der aufnehmenden Plasmid-DNS und dem zu legierenden DNS-Stück bei überhängend geschnittenen DNS-Enden mit 1 : 3, bei glatt geschnittenen DNS-Enden mit 1 : 10 (Mol : Mol) vorgegeben. Grundsätzlich wird davon ausgegangen, je kleiner das einzusetzende DNS-Fragment zum aufnehmenden Plasmidfragment ist, desto stärker wird das Verhältnis zugunsten des kleineren Fragmentes verschoben. Als praktisches Beispiel für diese Beschreibung diente ein Plasmidfragment mit einer Größe von 4000 Basen und einem einzusetzenden DNS-Fragment von 1700 Basen, die jeweils überhängend an ihren Enden fragmentiert waren.

① Zu 0,027 pmol (\cong 0,0648 μ g) geschnittenem Plasmid werden 0,054 pmol (\cong 0,0551 μ g) DNS-Fragmente, Ligationspuffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 50 μ g \cdot ml⁻¹ RSA, pH 7,8), 200 - 400 Einheiten hochkonzentrierter T4-DNS Ligase (New England Biolabs) gegeben und auf ein Volumen von 30 μ l mit dH₂O eingestellt. Sollten DNS-enthaltende Gelstücke direkt im Ligationsansatz eingesetzt werden, mussten diese zunächst bei 65° C aufgelöst werden.

② Inkubation des Ansatz entweder über Nacht bei 16° C oder aber 45 min bei Raumtemperatur und weitere 45 min bei 37° C. Vor der Zugabe des Ligationsansatzes zu den kompetenten Zellen für die Transformation (siehe 3.2.1.8) wird am Ende der Inkubationszeit der Ansatz 5 min auf Eis gekühlt.

3.2.1.7 Gerichtete Mutagenese (Site-directed mutagenesis) mit synthetisch hergestellten Oligonukleotiden

Die gerichtete Mutagenese kann mit unterschiedlichen Methoden durchgeführt werden. Einige von ihnen sind so standardisiert worden, dass sie als Reagenziensystem bei kommerziellen Anbietern zu erwerben sind. In dieser Arbeit wurde ein System von Pharmacia (U.S.E. Mutagenesis Kit) eingesetzt, das auf einem von Deng und Nickoloff (Deng & Nickoloff, 1992) entwickelten Verfahren basiert. Die enthaltenen Chemikalien und Enzyme umfassen bis auf die Oligonukleotide und Restriktionsenzyme alle notwendigen Komponenten zur Durchführung der gerichteten Mutagenese.

Das Prinzip der Methode von Deng und Nickoloff beruht darauf, dass in einem Plasmid über ein Selektionsoligonukleotid eine einzigartige Restriktionsstelle durch stille Mutation zerstört und bei gleichzeitigem Einsatz eines Mutationsoligonukleotids eine definierte Mutation gesetzt wird. Nach den Angaben von Pharmacia binden beide

Oligonukleotide in 90 Prozent der Fälle gleichzeitig an die aufgeschmolzene doppelsträngige parentale DNS. Nach Komplementierung der einzelsträngig vorliegenden parentalen DNS durch eine T4-Polymerase, wird die DNS mit dem Restriktionsenzym, dessen Erkennungssequenz durch das Selektionsoligonukleotid zerstört wurde, geschnitten und in Bakterien transformiert. Die ungeschnittenen Plasmide werden gegenüber den linearisierten um den Faktor 100 bis 1000 stärker in die Bakterien transformiert, d. h. die mutierte DNS wird in wesentlich größeren Mengen und einem wesentlich größeren Teil der Bakterien transformiert (Conley & Saunders, 1984). Damit die Mutationen nach der Transformation erhalten bleiben, muss ein Bakterienstamm (mutS) eingesetzt werden, dessen DNS-Reparaturmechanismen zerstört sind. Dadurch wird gewährleistet, dass die eingefügten Mutationen nicht von den normalerweise vorhandenen Reparaturmechanismen wieder rückgängig gemacht werden. Nach einer DNS-Präparation aus diesen Bakterienzellen und einer weiteren Restriktion mit dem Selektionsenzym kann die DNS in andere Bakterienstämme transformiert werden, ohne dass eine Gefahr besteht, die Mutation zu verlieren.

Die in dieser Methode verwendeten Oligonukleotide (Selektions- und Mutationsoligonukleotid) mussten vorher an der freien OH-Gruppe des 5'-Endes phosphoryliert werden, damit die eingesetzte Ligase den neusynthetisierten, komplementären Strang durch Bildung einer Phosphodiester-Bindung an der 3'-Hydroxylgruppe schließen und damit den Ringschluss des Plasmids vollenden konnte.

3.2.1.7.1 Die Oligonukleotide

Für die Erzeugung der Punktmutationen wurden künstlich hergestellte Oligonukleotide eingesetzt, die für die hier angewandten Versuchsbedingungen aus 21 bis 36 Basen bestanden. Die zu induzierende Mutation resultierte aus der Veränderung einzelner Basen des Triplettkodes für Aminosäuren zum komplementären DNS-Strang. Dabei war es von Vorteil, um eine schnellere und einfachere Analyse der induzierten Mutation durchzuführen, die Oligonukleotide so zu gestalten, dass durch die Änderung der Mutation selbst oder durch Einführung einer stillen Mutation eine charakteristische Restriktionserkennungssequenz verändert wurde. Mutierte Klone konnten so relativ schnell nach der Mutagenese über die Restriktionsfragmentanalyse (siehe 3.2.1.6.1) von den nicht mutierten Klonen unterschieden und zur weiteren Verarbeitung selektiert werden. Als Selektionsoligonukleotid in der Mutagenese wurde am erfolgreichsten ein 35 Basen umfassendes Oligonukleotid, das eine Sma I Restriktionserkennungssequenz veränderte, eingesetzt (Sequenz des Oligonukleotids siehe Tab. 1, Kapitel 4.1.1). Es kam als Standardselektionsoligonukleotid zur Anwendung.

3.2.1.7.2 Phosphorylierung der Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden ausschließlich bei den Firmen Gibco und TIB MolBiol erworben und von den Firmen im lyophilisierten Zustand geliefert.

① Lösen der Oligonukleotide in ddH₂O in einer Konzentration von 50 pmol•µl⁻¹ und Kontrolle der Konzentration durch photometrische Messung bei 260 nm (siehe 3.2.1.5). Die Lagerung erfolgt bei -20° C.

② 200 pmol Oligonukleotide werden mit Reaktionspuffer (1 mM ATP, 70 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT bei pH 7,6) und einer Einheit T4-Polynukleotid Kinase versetzt. Anschließend erfolgt die Ergänzung des Ansatzes mit ddH₂O auf 30 µl.

③ Inkubation für 40 min bei 37° C.

④ Stopp der Reaktion durch Erhitzen für 10 min bei 65° C.

Die phosphorylierten Oligonukleotide konnten direkt aus dem gestoppten Ansatz in der Mutagenese verwendet oder bei -20°C gelagert werden.

3.2.1.7.3 Mutagenese

Die Arbeitsprozedur gliederte sich in 2 Teile, die an jeweils einem Arbeitstag durchgeführt werden konnten.

1. Teil:

① 0,43 μg Plasmid-DNS, 1 pmol phosphorylierte Selektionsoligonukleotide, 1 pmol phosphorylierte Mutationsoligonukleotide, Reaktionspuffer (10 mM Tris-Acetat; 10 mM Magnesiumacetat; 50 mM Kaliumacetat (pH 7,5)) werden in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert und mit ddH₂O auf 10 μl aufgefüllt.

② Kurzes Mischen und Zentrifugieren der Probe bei 13500 g_{av} (Biofuge pico, Heraeus). Es folgt eine 5 minütige Inkubation in kochendem Wasser (Aufschmelzen der doppelsträngigen DNS) und anschließend eine 5 minütige Inkubation auf Eis.

③ Kurze Zentrifugation bei 13500 g_{av} und 30 min Inkubation bei Raumtemperatur (Verschmelzen der Oligonukleotide mit der DNS).

④ Zugabe von Nukleotidmix (je 0,67 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP; 1 mM ATP; 3,33 mM Tris-Acetat; 3,33 mM Magnesiumacetat; 16,68 mM Kaliumacetat (pH7,5)) und Enzymmix (1,25 - 1,75 Einheiten T4-DNS Ligase; 1,25 - 2,5 Einheiten T4-DNS Polymerase; 0,3 - 0,42 μg T4-Gen 32 Protein) in ein Volumen von 15 μl . Dann erfolgt ein kurzes Mischen und anschließend eine 1,5 stündige Inkubation bei 37°C (Komplementierung der DNS und Ringschluss an den phosphorylierten Oligonukleotiden).

⑤ Zugabe von 20 Einheiten der Restriktionsendonuklease Sma I als Selektionsenzym, NEB-Puffer 4 (50 mM Kaliumacetat; 20 mM Tris-Acetat; 10 mM Magnesiumacetat; 1 mM DTT - pH 7,9), hinzufügen von ddH₂O auf 25 μl und inkubieren für 2,5 h bei 25°C .

⑥ Weitere Zugabe von 14 Einheiten Sma I und anschließend 2,5 stündige Inkubation.

⑦ Zusammenpipettierung des Ansatzes mit 200 μl kompetenten Zellen (E. coli Stamm NM522 mutS) in einem Kulturröhrchen (Sarstedt) und 30 min Inkubation auf Eis.

Es folgte die Transformation der DNS durch Hitzeschock (siehe 3.2.1.8) und eine Vermehrung der transformierten Bakterienzellen über Nacht.

2. Teil:

Nach der Bakterienvermehrung wurde eine kleine Plasmidpräparation durchgeführt (siehe 3.2.1.4.2.1.) und mit einem Teil der gewonnenen DNS der zweite Teil der Mutagenese durchgeführt.

① Entnahme von 300 ng DNS aus der Plasmidpräparation, Zugabe von 20 Einheiten Sma I als Selektionsenzym und NEB-Puffer 4 (50 mM Kaliumacetat; 20 mM Tris-Acetat; 10 mM Magnesiumacetat; 1 mM DTT - pH 7,9) auf ein Gesamtvolumen von 50 μl mit ddH₂O. Anschließende Inkubation bei 25°C für 2,5 h.

② Weitere Zugabe von 14 Einheiten Sma I und anschließend 2,5 h Inkubation bei 25°C .

③ 10 μl des Ansatzes werden entnommen, mit 100 μl kompetenten Zellen des E. coli Stammes MV1190 in einem Kulturröhrchen zusammenpipettiert und auf Eis gestellt.

Es erfolgte die Transformation und Ausplattierung wie in 3.2.1.8 beschrieben. Anschließend wurden die auf den Agarplatten entstandenen Klone kultiviert und eine

Restriktionsfragmentanalyse (siehe 3.2.1.4.1 und 3.2.1.6.1) durchgeführt.

3.2.1.7.4 Verifizierung der Mutationen durch Sequenzierung der Plasmid-DNS

Die Verifizierung der Mutationen erfolgte über die Sequenzierung der DNS in einem automatisierten Sequenzierungsverfahren. Dafür kam in der Regel DNS aus der großen Plasmidpräparation zum Einsatz, die nach der Restriktionsfragmentanalyse hergestellt wurde. Diese nach der Sequenzierung positiv analysierte DNS diente dann auch als Transkriptionsvorlage für die RNS-Synthese. Die Sequenzierung bestand aus zwei Teilen und basiert auf den Arbeiten von Sanger et al. (Sanger et al., 1977) bzw. den Arbeitsanleitungen zur PCR-Sequenzierung der Firma Perkin Elmer. Im ersten Teil wurden in einer PCR-Reaktion verschieden große DNS-Stücke hergestellt, die anschließend im zweiten Teil des Sequenzierungsverfahrens auf einem Polyacrylamid-Harnstoff Gel aufgetrennt und analysiert wurden. Die Durchführung der Sequenzierungsreaktion erfolgte mit einem cycle sequencing Kit der Firma Perkin Elmer, von der auch die gesamte Sequenzierungs- und Analyseanlage (ABI PRISM 377 DNA-Sequencer und Macintosh Power PC) bezogen wurde.

Im ersten Teil des Sequenzierungsverfahrens, der PCR, wurden der DNS Sequenzierungsoligonukleotide zugesetzt, die ihren komplementären Bereich ca. 100 Basen vor dem zu kontrollierenden Bereich der DNS hatten. Nach Aufschmelzung der DNS und Verschmelzung mit den Sequenzierungsoligonukleotiden erfolgte beginnend an deren 5'-Ende die DNS-Synthese durch eine hitzestabile Polymerase. Ein Teil der für die Synthese notwendigen Nukleotide war mit fluoreszierenden Substanzen markiert, wobei für jedes der vier Nukleotidarten ein spezifischer Fluoreszenzfarbstoff benutzt wurde. Erfolgte der Einbau eines dieser markierten Nukleotide in der DNS-Synthese, war eine Strangverlängerung aufgrund der Modifikation durch den Fluoreszenzfarbstoff nicht mehr möglich. So wurden in dem Sequenzierungsansatz unterschiedlich lange Kopien des komplementären DNS-Stranges erzeugt, die auf einem Sequenzierungsgel nach ihrer Größe aufgetrennt werden konnten. Dies geschah auf einem 36 cm langen 4,5 %igen Polyacrylamid-Harnstoffgel, das in einem bestimmten Bereich in der Sequenzierungskammer mit Laserlicht bestrahlt wurde. Durchliefen die DNS-Fragmente diesen Bereich, wurden die fluoreszenzmarkierten Nukleotide angeregt und emittierten aufgrund der spezifischen Fluoreszenzfarbstoffe Licht einer spezifischen Wellenlänge. Dadurch war es möglich, das Nukleotid am Ende eines (jeden) synthetisierten Stranges zu definieren. Die Fluoreszenz wurde mit einem Detektor aufgenommen und die Signale an einen angeschlossenen Computer weitergeleitet. Mit Hilfe einer entsprechenden Software (ABI PRISM Data Collection V. 2.1, Perkin Elmer), wurden die Signale ausgewertet und in Form einer Text- und Analysedatei für jede Probe ausgegeben.

3.2.1.7.4.1 Sequenzierungsreaktion

① 200 – 300 ng doppelsträngige DNS werden mit 1,8 pmol Sequenzierungsoligonukleotiden in 4 µl ddH₂O vermischt.

② Zu der Probe werden 1,5 µl Reaktionsmix (Perkin Elmer) gegeben, leicht gemischt und die Probe mit 10 µl Mineralöl überschichtet. Alle Ansätze werden in einem auf 75° C vorgeheizten Thermocycler (Biometra) gestellt und die Reaktion mit folgenden Parametern gestartet:

- 15 sec bei 96° C (Denaturierung - Aufschmelzen der doppelsträngigen DNS).
- 15 sec bei 45 - 50° C (Hybridisierung - Verschmelzen der Sequenzierungsoligonukleotide mit der DNS).
- 60 sec bei 72° C (Elongation - DNS-Strang-Verlängerung durch die Taq-Polymerase).

- Stopp der Reaktion nach 25 maligem Durchlauf dieser 3 Reaktionsschritte und Aufbewahrung der Probe bei 4° C im Thermocycler bis zur Entnahme.

Zur Reinigung des PCR-Produktes wird eine Ethanol-fällung durchgeführt:

③ Zugabe von 50 µl Chloroform, kurz gevortext und 20 sec bei 13500 g_{av} (Biofuge pico, Heraeus) abzentrifugiert, den Überstand abnehmen und in ein neues Gefäß überführen.

④ Zugabe von 1 µl 3 M Natriumacetat und von 15 µl reinem Ethanol. Nach kurzem, sofortigen Mischen wird 30 min später bei 13500 g_{av} zentrifugiert.

⑤ Der Überstand wird dekantiert und die restliche Flüssigkeit mit einem fusselfreien Einmaltuch (Kim Wipes) abgetupft, Zugabe von 500 µl 70 %igen reinem Ethanol und anschließend 20 min Zentrifugation bei 13500 g_{av}.

⑥ Überstand dekantieren und Flüssigkeitsreste mit einem fusselfreien Einmaltuch (Kim Wipes) entfernen.

Die DNS wurde im Reaktionsgefäß unter Vakuum getrocknet und konnte bis zur Auftragung auf das Sequenzierungsgel bei -20° C gelagert werden.

3.2.1.7.4.2 Sequenzierungsgel und -lauf

① Für die Herstellung des Sequenzierungsgels wird zunächst eine Lösung aus 18 g Harnstoff, 7,5 ml 30 %iger Acrylamidlösung (aus 29 % Acrylamid und 1 % Bisacrylamid), 6 ml 10-fach konzentriertem TBE und 23 ml ddH₂O zusammenpipettiert, erhitzt, durch einen Filter (0,2 µm) gegeben und 10 min lang entgast. Dann erfolgt die Zugabe von 15 µl TEMED und 360 µl 10 %igem Ammoniumpersulfat. Es wird gut gemischt, die Lösung in die vorbereitete Gelkammer gegeben und der Probenkamm eingesetzt.

② Innerhalb von 1,5 - 2 h polymerisiert das Gel aus und wird danach in die Sequenzierungsapparatur (ABI PRISM 377 DNA Sequenzer, Perkin Elmer) eingespannt. Die Pufferkammern werden mit TBE als Laufpuffer gefüllt und der Probenkamm aus dem Gel entfernt. Es folgt ein Vorlauf, der bei 2700 Volt gestartet wird und solange stattfindet, bis das Gel eine Temperatur von 51° C erreicht (ca. 15 min).

③ Während des Vorlaufs werden die Sequenzierproben aufgetaut und 4 µl Probenpuffer (80 % Formamid und 5 mM EDTA, pH 8,0) dazugegeben. Es folgt ein zweiminütiges Erhitzen im Wasserbad bei 90° C und die anschließende Lagerung auf Eis. Dann werden jeweils 1 µl der Probe mit einer Pipette in die Geltaschen pipettiert, wobei zunächst nur die ungeraden Probenslots gefüllt werden. Nachdem diese Proben in das Gel eingelaufen sind, werden die anderen Slots gefüllt und der Gellauf bei 51° C mit 2700 Volt weitergeführt.

Nach 4 h war der Gellauf beendet und mit entsprechender Kalkulation durch die Software ABI PRISM Data Collection V. 2.1 konnten die Daten am Computer ausgedruckt und ausgewertet werden.

3.2.1.8 Transformation von DNS in Bakterien durch Hitzeschock

Für eine effektive Übertragung der DNS in die Bakterien mussten diese wie in 3.2.1.3 beschrieben, vorbehandelt werden.

① 0,04 - 0,1 µg DNS werden zu 100 bis 200 µl kompetenten Zellen in ein steriles Kulturröhrchen gegeben, gemischt und für 30 min auf Eis gestellt.

② Der Hitzeschock erfolgt für 40 bis 110 sec in einem 42° C warmen Wasserbad, wobei die Länge des Hitzeschock von der Dicke des Inkubationsgefäßes abhängt.

③ Dann werden die Zellen für 2 min auf Eis gestellt und 1 ml SOC-Medium

zugegeben.

④ Inkubation für 1 h (2 h für mutS-Zellen) im Bakterienschüttler (G-25, New Brunswick Scientific) bei 37° C und 180 U•min⁻¹.

Nur bei Ausplattierung von Bakterienzellen auf Agar-Platten:

⑤ 50 bis 130 µl werden der Zellsuspension entnommen und auf Agar-Platten, die 100 µg•ml⁻¹ Ampicillin enthalten, aufgebracht und homogen verteilt. Nach Trocknung der Suspension wird die Platte gedeckelt und in einem Brutschrank (BM 400, Memmert) bei 37° C gehalten.

⑥ Es erfolgt eine Zugabe von 3 ml LB-Medium, das mit 133 µg•ml⁻¹ Ampicillin versetzt ist, zur Zellsuspension und die Steigerung der Umdrehungszahl des Bakterienschüttlers auf 225 U•min⁻¹.

Nach 16 h erschienen die einzelnen Ampicillin resistenten Klone auf der Nährplatte als Plaques. Die Zellen in der verbliebenen Zellsuspension im Bakterienschüttler stellten je nach dem Ausgangsmaterial den Pool der auf den Nährplatten erscheinenden Plaques nach der Transformation oder den Pool eines einzeln gepickten Klons von der Nährplatte dar.

3.2.1.9 RNS-Synthese

Die Herstellung von RNS verlief *in vitro*. Das Verfahren dafür ist so weit standardisiert, dass für die Herstellung der RNS kommerzielle Reaktionskits verwendet wurden. Für die eigentliche Transkription wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Transkriptionskit mit einer SP6-Polymerase der Firma Ambion (*mMESSAGE mMACHINE™ In Vitro Transcription Kit*) eingesetzt. Puffer- und Lösungszusammensetzungen dieses Kits sind patentgeschützt, so dass zu diesen Reagenzien keine näheren Angaben gemacht werden können. Als Arbeitsanweisung zur Prozedur der RNS-Synthese dienten die Arbeiten von Schenborn und Mierendorf (Schenborn & Mierendorf, 1985), Krieg und Melton (Krieg & Melton, 1987), Ben Aziz und Soreq (Ben Aziz & Soreq, 1990), Krieg (Krieg, 1990) und das Handbuch zum Transkriptionskit (Ambion-Incorporation, 1997).

Notwendig für eine effektive RNS-Synthese war ein gereinigtes Template. Dieses Template entspricht linearisierter DNS aus der großen Plasmidpräparation (siehe 3.2.1.4.2.2) und diente als Vorlage für die cRNS. Bevor das Template in der RNS-Synthese eingesetzt wurde, erfolgte eine visuelle Kontrolle zum Linearisierungszustand der DNS in einer Agarosegelelektrophorese. Weiterhin ist anzumerken, dass während der Herstellung des Templates statt mit Acetat mit NaCl gearbeitet wurde, da Acetat für die Oozyten toxisch wirken kann (Keller, persönliche Mitteilung).

Nach der Transkription der RNS wurde sie mit dem RNeasy™ Kit von Qiagen gereinigt. Auch bei diesem Kit sind die Puffer- und Lösungszusammensetzungen patentgeschützt, so dass zu diesen Reagenzien keine näheren Angaben gemacht werden können.

Nach der RNS-Reinigung wurde deren Konzentration und Qualität bestimmt. Dies war notwendig, um bei vergleichenden Untersuchungen cRNS-Mengen vergleichbarer Größenordnung injizieren zu können, denn die Höhe der Expression des Glucosetransporters hängt in einem bestimmten Konzentrationsbereich linear von der eingesetzten RNS-Menge ab (Due et al., 1995b). Die Konzentration der RNS wurde photometrisch bzw. durch radioaktiv markiertes UTP bestimmt. Die Qualitätsbeurteilung fand im Vergleich mit den entsprechenden Basiskonstrukten durch eine nicht denaturierende Agarosegelelektrophorese statt. Als Anhaltspunkt für diese qualitative Beurteilung, diente die einmalige Größendefinition der RNS von den Basiskonstrukten GLUT1, GLUT1-k und cysteinfreier GLUT1. Diese exemplarische Analyse wurde in einem denaturierenden Agarosegel (siehe 3.2.1.6.2.2) mit einem

speziellen RNS-Größenstandard durchgeführt (siehe Kapitel 4.1.2). Aus methodischen und finanziellen Gründen wurde in dieser Arbeit auf den standardisierten Einsatz dieser denaturierenden Agarosegelelektrophorese verzichtet und stattdessen die oben genannte nicht denaturierende Agarosegelelektrophorese angewendet.

3.2.1.9.1 Herstellung und Reinigung des Templates

① Zugabe von ca. 50 µg DNS aus der verifizierten Maxipräparation, 400 Einheiten Restriktionsendonuklease Xba I (bei einer Inkubationsdauer von 12 h reichen 20 Einheiten), NEB-Puffer 2 (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7,9) und 100 µg•ml⁻¹ RSA auf ein Volumen von 400 µl.

② Inkubation bei 37° C für 2 Stunden.

③ Inkubation bei 65° C für 15 min zur Deaktivierung der Restriktionsendonuklease.

④ Versetzen des Ansatzes mit einem Volumen Phenol und 2 min vortexen.

⑤ Zur besseren Phasentrennung werden 20 µl Chloroform zugegeben, kurz vortexen und zentrifugieren bei 13500 g_{av} (Biofuge pico, Heraeus).

⑥ Obere Phase abnehmen und ein Volumen Chloroform zugeben (Probe a), die untere Phase wird dagegen mit 200 µl ddH₂O verdünnt (Probe b) und die Proben kurz gevortext und bei 13500 g_{av} zentrifugiert.

⑦ Obere Phase aus Probe a in ein neues Gefäß überführen, die untere Phase dagegen mit der oberen Phase von Probe b vereinen und kurz vortexen, bei 13500 g_{av} zentrifugieren und den Überstand dieser erweiterten Probe b mit der oberen Phase aus Probe a vereinen.

⑧ Zugabe von 120 mM NaCl und 75 % reinen Ethanol, Fällung der DNS bei -20° C für mindestens 30 min mit anschließender 15 minütiger Zentrifugation bei 13500 g_{av} und 4° C (Tischkühlzentrifuge Z 252 MK, Hermle Labortechnik).

⑨ Überstand dekantieren und Zugabe von 500 µl 70 %igem reinen Ethanol mit anschließender 5 minütiger Zentrifugation bei 13500 g_{av}.

⑩ Verwerfen des Überstandes und Trocknung der DNS bei 37° C.

Nach dem Trocknen der DNS wurde sie in 20 µl DEPC-H₂O aufgenommen und unter Bewegung gelöst. Anschließend wurde die DNS-Konzentration photometrisch bestimmt (siehe 3.2.1.5) und das Template idealerweise auf 1 µg•µl⁻¹ mit DEPC-H₂O eingestellt. Dem Template wurde 0,5 µg DNS entnommen und zur Überprüfung der Linearisierung mit einer Agarosegelelektrophorese analysiert (siehe 3.2.1.6.2.1). Die Lagerung erfolgte bei -20° C.

3.2.1.9.2 In vitro Transkription und Reinigung der Transkriptionsprodukte

① Zu 1 µg Template werden aus dem Transkriptionskit 2 µl 10x Transkriptionspuffer, 10 µl 2x Ribonukleotidmix, 2 µl 10x Enzymmix und 1 µl radioaktiv markiertes Ribonukleotid (³⁵S-UTP; ist nicht im Transkriptionskit enthalten sondern war ein Geschenk der Abteilung Radiologie des Universitätsklinikums Benjamin Franklin) gegeben und mit DEPC-H₂O auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt (eine ³⁵S-UTP-spezifische Aktivität des radioaktiv markierten Ribonukleotids wurde vorher im Flüssigszintillationsspektrophotometer LS 2800 bestimmt und diente zur späteren Quantifizierung der umgesetzten DNS).

② Inkubation für 2,5 h bei 37° C.

③ Zugabe von 2 Einheiten DNase und 15 minütige Inkubation bei 37° C (Verdau des Templates).

④ Der Ansatz wird auf 100 µl mit DEPC-H₂O aufgefüllt, wovon 5 µl wieder entnommen und in ein separates Gefäß überführt werden. Diese Probe dient als

Referenzwert in der RNS-Konzentrationsbestimmung (siehe 3.2.1.9.3). Der Ansatz wird wieder auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt.

⑤ Zu den 100 µl werden 350 µl Lysepuffer gegeben, kurz vortexen, anschließend Zugabe von 350 µl reinem Ethanol.

⑥ Aufbringen des gesamten Volumens auf eine RNeasy Säule und 15 sekündige Zentrifugation bei 8000 g_{av} (Biofuge pico, Heraeus).

⑦ Zugabe von 500 µl Waschpuffer auf die Säule und 15 sekündige Zentrifugation bei 8000 g_{av} .

⑧ Schritt ⑦ wird wiederholt, wobei die Zentrifugationszeit auf 2 Minuten und 13500 g_{av} erhöht wird.

⑨ Für die Elution der RNS werden 30 µl DEPC-H₂O auf die Säule pipettiert, 5 min einwirken lassen und wiederum bei 8000 g_{av} zentrifugieren. Dieser Schritt wird wiederholt, so dass am Ende ein erstes und zweites Eluat der RNS vorhanden sind.

⑩ Dann werden den Elutionen Proben entnommen (siehe 3.2.1.9.3), während der Rest bis zur Injektion bei -80° C gelagert wird.

3.2.1.9.3 Bestimmung der RNS-Konzentration durch ³⁵S markiertes UTP

① Aus dem ersten und zweiten Eluat des Arbeitsschrittes ⑨ vom Kapitel 3.2.1.9.2 werden je dreimal 1,5 µl Lösung entnommen und jeweils in ein extra Gefäß überführt. Je eine der Proben pro Eluat dient zur photometrischen Konzentrationsbestimmung (siehe 3.2.1.5), die zweiten zur visuellen und damit auch qualitativen Kontrolle der RNS in einer Agarosegelelektrophorese (siehe 3.2.1.6.2.1).

② Das letzte Probenpaar und die 5 µl-Probe aus dem Pool des Arbeitsschrittes ④ in Kapitel 3.2.1.9.2 werden dagegen mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit (Ready Protein) aufgefüllt und gut gemischt.

③ Die emittierte radioaktive Strahlung der Proben wird im γ -Counter (Beckmann) bestimmt. Für die Berechnung der RNS-Konzentration dient als Referenzwert die aus Schritt ④ des Kapitels 3.2.1.9.2 entnommene Probe.

Die Berechnung der Konzentration erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{RNS} [\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}] = \left(\frac{\text{counts Probe} \cdot \frac{\text{Vol. Probe} [\mu\text{l}]}{\text{Vol. Entnahme} [\mu\text{l}]}}{\text{counts Pool} \cdot \frac{\text{Vol. Pool} [\mu\text{l}]}{\text{Vol. Entnahme} [\mu\text{l}]}} \right) \cdot \frac{100 [\%] \cdot 1,3 [\mu\text{g}]}{\text{Vol. Probe} [\mu\text{l}] \cdot 1 [\%]}$$

Der Faktor 100 (als %) in der Formel berücksichtigt die gesamte eingesetzte Radioaktivitätsmenge, während der Faktor 1,3 einer transkribierten RNS-Menge (in µg) entspricht, wenn 1 % des radioaktiv markierten UTP in die RNS eingebaut wurde. Dieser Faktor bezieht sich auf RNS, die durch eine SP6-Polymerase transkribiert wurde (Ambion-Incorporation, 1997).

3.2.2 Biologische und biochemische Methoden

3.2.2.1 Haltung des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis*

Die weiblichen Frösche der Art *Xenopus laevis* wurden von den Zuchtanstalten Kähler (Hamburg, Deutschland) und African Xenopus Facility c.c. (Knysna, Südafrika) bezogen. Gehalten wurden jeweils 4 Frösche in einem Plastikbecken, das mit 18° C

temperiertem Wasser gefüllt war. Es wurde darauf geachtet, dass pro Frosch 600 cm² Bodenfläche im Hälterungsgefäß zur Verfügung standen, wobei grundsätzlich eine Gesamtgrundfläche von mindestens 2400 cm² existieren musste, unabhängig davon ob 4 oder weniger Frösche in dem Gefäß gehalten wurden. Die Wassertiefe im Becken lag zwischen 20 bis 50 cm (Hilken et al., 1997).

Innerhalb der Becken war ein Unterstand aus Plastik eingelegt, unter dem die Frösche ausreichend Platz zum Schutz finden konnten. Zweimal pro Woche erfolgte die Fütterung der Frösche mit Karpfenfutter (K3, Trouvit) und am darauffolgenden Tag ein kompletter Wasserwechsel.

3.2.2.2 Die Oozyten von *Xenopus laevis* als Expressionssystem

Die Oozyten des Krallenfrosches werden in der experimentellen Biologie vielfach als Expressionssystem für verschiedene Transportproteine und Rezeptoren eingesetzt (Colville & Gould, 1994), denn sie bieten besondere Vorteile, die sie gegenüber anderen Expressionssystemen interessant machen. Die Oozyten sind in den letzten Wachstumsstadien der Oogenese im Vergleich zu Zellen anderer Expressionssysteme sehr groß und einfach zu handhaben. Dadurch können die Zellen individuell behandelt werden und funktionelle Analysen in Einzelzellen sind auf verhältnismäßig einfache Weise möglich. Voraussetzung ist, dass die Oozyten in ihren unterschiedlichen Entwicklungsstadien visuell differenziert werden können.

Die Wachstumsphase in der Oogenese besteht aus 6 Oozyten-Stadien (Dumont, 1972; Hilken et al., 1997). Für die heterologe Expression der artfremden Proteine sind jedoch nur die Oozyten der Entwicklungsstadien 4 bis 6 zu verwenden. Gut zu erkennen sind die Oozyten ab dem vierten Stadium durch eine optische Polarisierung, in der die animale Hälfte durch eine schwarz-braune homogene Pigmentierung von der helleren vegetalen Hälfte zu unterscheiden ist (siehe Abb. 5).

Der Durchmesser normal entwickelter Oozyten der Stadien 5 und 6 beträgt 1,2 bis 1,3 mm mit einem Volumen von 0,9 bis 1,2 µl. Die Oberfläche einer idealen Kugel mit diesen Ausmaßen hat eine Größe von 4,5 bis 5,3 mm² und vergrößert sich bei den Oozyten unter Einbeziehung der eingebrachten Membranflächen der Mikro- und Makrovilli, welcher mit einem mittleren Faktor 4 (Dick et al., 1970) kalkuliert wird, auf ca. 22 mm².

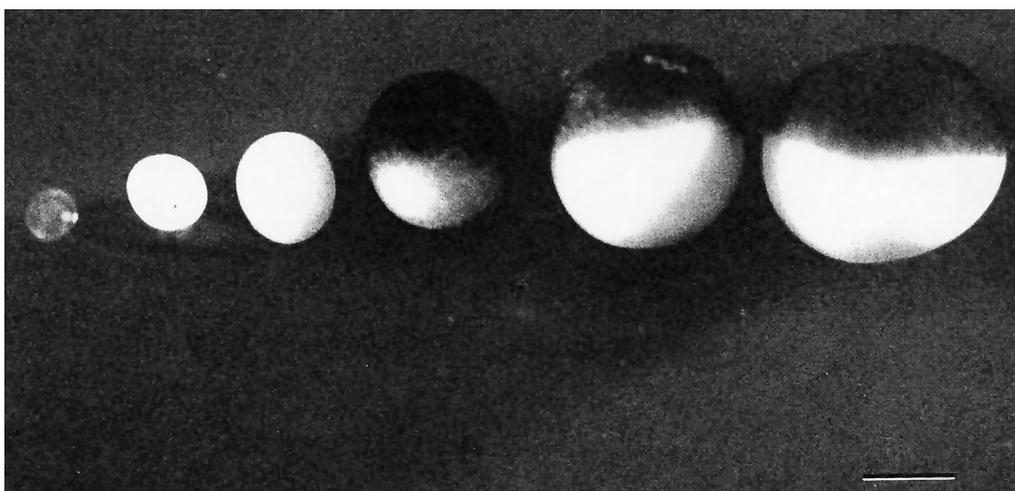


Abb. 5 (aus Smith et al., 1991): Oozyten von *Xenopus laevis* nach Defollikulation, die sich in unterschiedlichen Entwicklungsstadien befinden. Die kleinste, transparente Oozyte verkörpert das Stadium I, während die Oozyten mit zunehmender Größe die

Stadien II - VI repräsentieren (nach Dumont, 1972). Der weiße Balken unten rechts entspricht 500 μm .

Für die Untersuchungen mussten die Oozyten zunächst operativ aus einem Frosch entfernt und anschließend defollikuliert werden. Das operative Vorgehen und die Entnahme der Ovarläppchen erfolgte nach Hilken et al. (Hilken et al., 1997), die Isolierung der X. Oozyten nach Gurdon und Wickens (Gurdon & Wickens, 1983). Erst nach An- bzw. Ablösen der den Oozyten anhaftenden Theka und Follikelzellen, konnte mit einer Glaskapillare RNS für die Expression in die Oozyten injiziert werden ($\hat{=}$ defollikulierte Oozyten - siehe auch Abb. 6). Dafür wurde eine Kollagenase eingesetzt, die eine Kollagenvernetzung der Theka spaltete.

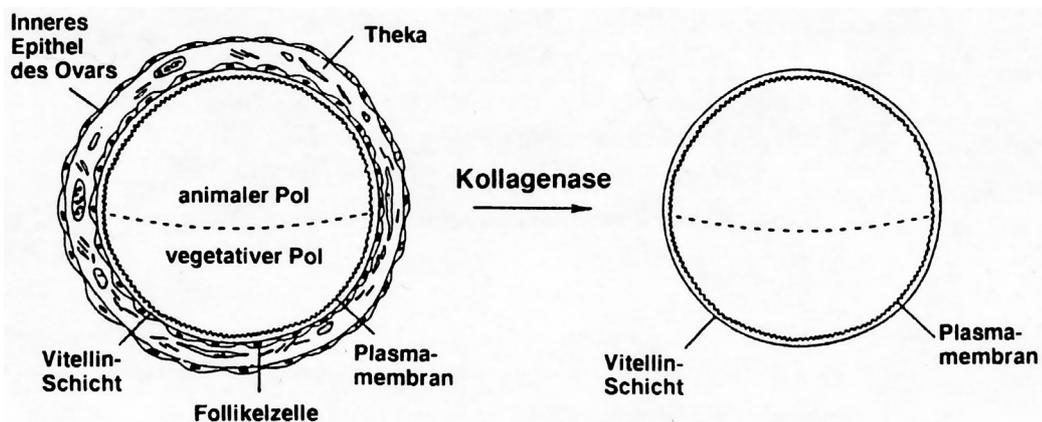


Abb. 6 (aus Wellner, 1994): Schematische Darstellung einer Oozyte von *Xenopus laevis* vor und nach einer Behandlung durch Kollagenase Typ I (Sigma, Deisenhofen).

Bei vergleichenden Untersuchungen der Mutanten mit dem Basiskonstrukt wurden gleiche RNS-Mengen in die Oozyten injiziert, da die Expressionshöhe und die damit verbundene Transportaktivität in einem bestimmten Konzentrationsbereich linear von der injizierten RNS-Menge abhängt (Due et al., 1995b). War die RNS-Konzentration der Lösungen zwischen den zu vergleichenden Gruppen unterschiedlich, wurde sie auf das entsprechende Maß mit DEPC-H₂O verdünnt. Die Injektion der RNS erfolgte nach Hitchcock et al. (Hitchcock et al., 1987) möglichst in die vegetale Hälfte der Oozyten. Dies war angezeigt, um zu vermeiden, dass RNS in den Zellkern injiziert wurde, da dieser in der animalen Hälfte der Oozyte lokalisiert ist. Die RNS hätte sich dann nicht in einer angemessenen Zeit im Zytoplasma verteilen können, was wiederum die Menge an translatiertem Protein negativ beeinflusst hätte. Die anschließende Kultivierung der Oozyten bis zur experimentellen Analyse erfolgte nach Keller et al. (Keller et al., 1989).

3.2.2.2.1 Gewinnung und Defollikulation der Oozyten von *Xenopus laevis*

① Zunächst wird ein weiblicher Frosch in 1 bis 2 Litern 0,1 %igen 3-Aminobenzoesäure-ethylester (w/v) für ca. 25 min narkotisiert und dann mit der Rückenseite auf Eis gelegt. In der unteren Bauchgegend wird durch das Körpergewebe ein ca. 1 cm langer Skalpellschnitt durchgeführt. Der Schnitt durchtrennt die Haut, das darunter liegende Muskelgewebe und das Bauchfell. Anschließend kann mit einer Pinzette und einem Scherenschnitt ein Stück des Mesovars entnommen werden.

② Die entnommenen Ovarläppchen werden zunächst in kalziumfreies Barths-Medium überführt und das Muskelgewebe mit der Bauchhaut zusammen durch 2 Stiche mit

einem resorbierbaren Nahtmaterial (Monocryl 4/0, Ethicon) vernäht.

③ Anschließend wird die Froschhaut mit zwei Stichen nicht resorbierbaren Nahtmaterials (Excel 4/0, Ethicon) geschlossen, wobei darauf zu achten ist, dass die Bauchhaut nicht mit vernäht wird. Danach erfolgt die Überführung des Frosches in ein Aufwachbecken.

④ Die entnommenen Mesovarstücke werden nun vorsichtig mit zwei Pinzetten aufgezogen und in kleine ca. 10 bis 20 Oozyten enthaltende Stücke gezupft. Anschließend werden die Oozyten in ein verschließbares Gefäß überführt.

⑤ Zugabe von ca. 8 ml Barths-Medium ohne Kalzium pro 1000 Oozyten mit 0,1 % Kollagenase Typ I (w/v). Die Lösung sollte kein Kalzium enthalten, da Kalzium die Aktivität der Kollagenase hemmt. Inkubation für 30 – 150 min (je nach Festigkeit der Zellumhüllungen) auf einem Rotationsschwenker (A258 Ten Roller Mixer, Denley) bei $40 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$.

⑥ Es folgt die Spülung der Oozyten in Barths-Medium, das mit 0,1 % RSA (w/v) und 0,005 % (w/v) Gentamicin versetzt ist. Dieser Vorgang wird mindestens vier mal wiederholt. Danach werden die Oozyten in 0,1 % RSA (w/v) und 0,005 % Gentamicin (w/v) versetztem Barths für 14 – 22 h bei 18° C gehalten, bevor die RNS injiziert wird.

3.2.2.2.2 Mikroinjektion und Kultivierung der Oozyten von *Xenopus laevis*

① Mit Kollagenase behandelte Oozyten der Stadien 5 und 6 (siehe 3.2.2.2) werden unter einem Stereomikroskop (M37, Wild) bei einer 160-fachen Vergrößerung für die RNS-Injektion bzw. Injektion von DEPC-H₂O als Kontrollgruppe (\triangleq Shamgruppe) ausgesucht.

② Auf einem speziellen Kapillarziehgerät (Pul-1 E, World Precision Instruments) wird eine Glaskapillare gezogen, die Spitze mit einer Pinzette fein gebrochen und die Kapillare mit RNase-freiem Mineralöl gefüllt.

③ Die vorbereitete Kapillare wird auf den Metallstift der Mikroinjektorpipette (Drummond) aufgesetzt und in einen Mikromanipulator (Leitz, Wetzlar) eingespannt.

④ Die auf Parafilm aufgetragene RNS wird in die Glaskapillare aufgesaugt und die Oozyten auf einem Plexiglasblock, in den eine Rinne eingefräst ist und in der sich Barths-Medium befindet, aufgereiht.

⑤ Unter dem Stereomikroskop bei einer 160-fachen Vergrößerung werden die Oozyten mit 50 nl RNS-Lösung bzw. DEPC-H₂O pro Oozyte injiziert, wobei sich die Einstichstelle möglichst auf der vegetalen Hälfte befinden sollte (siehe 3.2.2.2).

⑥ Nach der Injektion werden die Oozyten in mit 0,1 % RSA (w/v) und mit 0,005 % Gentamicin versetztem Barths-Medium überführt und bei 18° C aufbewahrt. Die injizierten Oozyten werden ca. alle 24 Stunden auf ihren Zustand hin unter dem Stereomikroskop untersucht, verdämmerte Oozyten entfernt und ein Mediumwechsel vorgenommen. Nach 2 bis 3 Tagen ist die höchste Expression bei einer vertretbaren Integrität der Zellen erreicht und es beginnt die Durchführung der Transportmessungen.

3.2.2.3 Funktionelle Charakterisierung der Transportermutanten

Die funktionelle Charakterisierung der Mutanten erfolgte durch Transportmessungen nach Protokollen von Keller et al. (Keller et al., 1989) und Keller und Mueckler (Keller & Mueckler, 1990). Als Substrate kamen für Influx-Messungen unter „zero-trans“ Bedingungen die Glucoseanaloge 2-Desoxy-D-Glucose (2-DOG) bzw. 3-O-Methyl-D-Glucose (3-OMG) zum Einsatz. Influx-Messungen unter „equilibrium-exchange“ Bedingungen wurden nur mit 3-OMG durchgeführt. Wie in Kapitel 1.1 und den dazugehörigen Unterkapiteln angesprochen, ist der GLUT1 ein passiv arbeitender

Transporter und die Substratbewegung verläuft demnach entlang des Konzentrationsgradienten. Die in die Zelle transportierten Glucosemoleküle werden durch die Hexokinase phosphoryliert, so dass sich innerhalb der Zelle keine Glucosekonzentration aufbauen kann, die den Konzentrationsgradienten von extrazellulär nach intrazellulär aufhebt. Nach der Phosphorylierung gehen die Glucosemoleküle in den Stoffkreislauf ein und werden metabolisiert. Das Glucoseanalogon 2-DOG hingegen wird zwar phosphoryliert, kann aber aufgrund seiner Struktur nicht weiter verstoffwechselt werden. Demzufolge akkumuliert es in der Zelle und durch die Phosphorylierung bleibt der Konzentrationsgradient für 2-DOG trotzdem bestehen. 2-DOG ist daher ein ideales Substrat für die Bestimmung der Transportleistung unter „zero-trans“ Bedingungen.

3-OMG dagegen wird nicht durch die Hexokinase phosphoryliert. Das bedeutet konsequenter Weise für Transportmessungen eine zeitabhängige Abflachung des Konzentrationsgradienten. Deshalb werden in Experimenten mit diesem Substrat relativ hohe extrazelluläre Substratkonzentrationen im Bereich der K_m -Werte eingesetzt und kurze Transportzeiten für den Transport gewählt, um 20 % der Sättigungskonzentration nicht zu überschreiten. Für Transportmessungen unter „zero-trans“ Bedingungen ist es nicht das ideale Substrat. 3-OMG wird aber insbesondere in Experimenten eingesetzt, in denen Substanzen appliziert werden, die eine Hexokinaseaktivität beeinflussen.

Eine ideale Verwendung findet 3-OMG in Experimenten unter „equilibrium-exchange“ Bedingungen. In diesen Versuchsansätzen wird vor der Transportmessung für einen Ausgleich der Substratkonzentration gesorgt. Die 2-DOG kann hier nicht eingesetzt werden, da durch die Phosphorylierung der Hexokinase kein Konzentrationsausgleich stattfinden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die funktionelle Charakterisierung verschiedener Transporterproteine die Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol (BME) und Dithiothreitol (DTT) sowie die Schwefelgruppen sensitiven Substanzen p-Chloromercuribenzolsulphonat (pCMBS) und N-Ethylmaleimid (NEM) eingesetzt. NEM gehört zu den Substanzen, die eine hemmende Wirkung auf die Hexokinaseaktivität ausüben (D'Amore & Lo, 1986).

3.2.2.3.1 “Zero-trans“-Influx-Messungen mit 2-Desoxy-D-Glucose in Oozyten von *Xenopus laevis*

Das Transportmesssystem der “Zero-trans“-Influx-Messungen mit 2-Desoxy-D-Glucose wurde als Standardmethode in dieser Arbeit verwendet und diente u. a. zur Charakterisierung der Basalaktivität der verschiedenen Transportermutanten. Zum Start des Transports erfolgte eine Applikation von Substrat außerhalb der Oozyte, welche selbst kein Substrat enthielt. Nach einer definierten Zeitspanne wurde der Transport beendet und die aufgenommene Substratmenge mittels der aufgenommenen radioaktiv markierten Substratmenge in die Oozyte bestimmt. Variiert wurde der Versuchsansatz durch die Zugabe von Chemikalien außerhalb der Oozyte oder durch Mikroinjektion in die Oozyte.

① 48 bis 72 Stunden nach der RNS- bzw. DEPC-H₂O-Injektion in die Oozyten werden jeweils 10 Zellen ausgesucht und in 400 bzw. 450 μ l mit Barths-Lösung gefüllte Reaktionsgefäße überführt. Den Ansätzen mit 400 μ l Barths Lösung werden zusätzlich 50 μ l in Barths gelöste transportmodifizierende Substanzen (BME, DTT oder pCMBS), in der Regel in einer Endkonzentration von 1 bzw. 2 mM, eine Stunde vor der Substratzugabe zugegeben ($\hat{=}$ Applikation von außen). Erfolgt der Einsatz des spezifischen Glucosetransporthemmstoffs Cytochalasin B (CB), wird er in einer Endkonzentration von 20 μ M 5 bis 10 Minuten vor dem Start der Transportmessung zugegeben (CB gelöst

in 100 %igem Ethanol; aufgrund der schädigenden Wirkung des Ethanols an der Oozytenmembran wird die Ethanolmenge auf 1 % in der Endkonzentration des Versuchsansatzes beschränkt).

Die Applikation von pCMBS in den Intrazellularraum ($\hat{=}$ Applikation von innen) erfolgt analog zur RNS-Injektion (siehe 3.2.2.2.2). Hierbei werden 1 h vor dem Start der Transportmessung 50 nl in ddH₂O gelöstes pCMBS mit einer Konzentration von 11 oder 33 mM injiziert ($\hat{=}$ einer Endkonzentration innerhalb der Zelle von 1 bzw. 3 mM) und die Oozyten anschließend in Vorratsgefäße überführt, die mit Barths-Medium gefüllt sind. Bei diesen Versuchsansätzen werden die Oozyten erst kurz vor dem Start der Transportmessung in die entsprechenden Reaktionsgefäße überführt.

② Start der Transportmessung durch Zugabe von 50 μ l einer 500 μ M 2-DOG-Lösung, die 1 μ Ci radioaktiv markierte [³H]2-DOG enthielt. Nach einer halben Stunde wird die Reaktion mit 3 ml eiskalter Stopplösung beendet. Die Flüssigkeit wird abgesaugt und die Oozyten durch dreimaliges Wiederholen dieses Vorganges mit der Stopplösung gewaschen.

③ Danach wird jede Oozyte in ein eigenes Szintillationsgefäß überführt, das mit 500 μ l einer 1 %igen SDS-Lösung gefüllt ist. Die Gefäße werden auf 60 - 70° C erhitzt, damit sich die Zersetzung der Oozyten beschleunigt. Nach ca. 1 h sind die Oozyten gelöst und es werden 3 ml Szintillationslösung (Ready-Protein, Beckmann) zupipettiert. Anschließend erfolgt die Zählung der radioaktiven Zerfälle im Flüssigszintillationspektrophotometer (LS 2800, Beckmann). Die Zählung wird in counts pro min (cpm) ausgegeben. Die anschließende Berechnung und Auswertung der Transportleistung ist in 4.2.1 beschrieben.

3.2.2.3.2 “Zero-trans“ Influx-Messungen mit 3-O-Methyl-D-Glucose in Oozyten von *Xenopus laevis*

Dieses Meßsystem wurde angewendet, wenn bei den Funktionsuntersuchungen Substanzen appliziert wurden, welche die Aktivität der Hexokinase in den Oozyten beeinflussten (NEM). Der Versuchsansatz und die Durchführung gleicht weitgehend dem für 2-DOG, wie er im Kapitel 3.2.2.3.1 beschrieben wurde. Es wurde lediglich das Substrat ausgetauscht. Einzelne Modifikationen waren die wesentlich höhere Substratkonzentration von 1 mM 3-OMG mit 5 μ Ci versetzter 3-O-Methyl-D-[1-³H]Glucose und die kürzere Transportzeit von 5 min. Diese Modifikationen ergaben sich aus den unter Kapitel 3.2.2.3 dargelegten Gründen. Außerdem wurden in der Regel jeweils 15 statt 10 Oozyten eingesetzt. Diese Änderung ergab sich aus den wesentlich höheren Kosten für Versuche mit radioaktiv markierter 3-OMG. Es mussten wesentlich größere Mengen dieses Radioisotops eingesetzt werden im Vergleich zu den Messungen mit Einsatz von 2-DOG (mit 5 μ l pro Ansatz eine 5-fach höhere Menge gegenüber 2-DOG).

3.2.2.3.3 Influx-Messungen unter „equilibrium exchange“ Bedingungen mit 3-O-Methyl-D-Glucose in Oozyten von *Xenopus laevis*

Mit dieser Transportmethode wurde untersucht, ob durch hohe Substratkonzentrationen verhindert werden konnte, dass von außen applizierte Substanzen ihre transportmodifizierende Wirkung (D'Amore & Lo, 1986) weiterhin ausbildeten.

① Nach 48 bis 54 Stunden der RNS- bzw. DEPC-H₂O-Injektion in die Oozyten erfolgt eine Aufteilung der Oozyten in 4 Gruppen. Anschließend werden zwei der vier Gruppen mit in Barths-Medium gelöstem pCMBS inkubiert (in einer Endkonzentration von 2 oder 0,025 mM, siehe 4.2.4.2).

② Nach Ablauf von 1 h werden die Oozyten einer der mit pCMBS inkubierten Gruppen gespült. Dies geschieht in einem Volumen von mindestens 15 ml Barths-Lösung. Dieser Vorgang wird drei mal wiederholt, so dass kein pCMBS mehr bei diesen Oozyten vorhanden ist.

③ Anschließend werden alle Gruppen getrennt voneinander in mit 3-OMG (in einer Endkonzentration von 10 oder 100 mM, siehe 4.2.4.2) angereicherter Barths-Lösung überführt und für mindestens 10 h inkubiert (= equilibrieren). Dabei wird den Oozyten, die mit pCMBS inkubiert wurden und nicht gespült sind, die entsprechende Menge pCMBS zugesetzt, so dass die Endkonzentration des pCMBS erhalten bleibt.

④ Nach der Equilibrierung werden aus den Gruppen Ansätze mit je 10 Oozyten gebildet und in Reaktionsgefäße überführt, die 400 bzw. 450 µl 3-OMG angereicherte Barths-Lösung in entsprechender Endkonzentration enthalten. Zu den Ansätzen mit 400 µl Lösung wird zusätzlich 50 µl in Barths-Medium gelöstes pCMBS in einer Endkonzentration von 2 mM oder 0,025 mM eine Stunde (in den Versuchsansätzen mit 0,025 mM pCMBS nur 15 min) vor dem Start der Transportmessung zugegeben. Dies erfolgt bei den Ansätzen einer der Gruppen, die bisher noch nicht mit pCMBS inkubiert wurde und den Oozyten der Gruppe, die schon die ganze Zeit in Anwesenheit von pCMBS gehalten wurden.

⑤ Durch Zugabe von 50 µl 10 oder 100 mM 3-OMG angereicherter Barths-Lösung, der 8 µCi radioaktiv markiertes 3-OMG zugesetzt ist, wird die Messung gestartet.

⑥ Nach 10 oder 30 min wird die Reaktion gestoppt und die darauffolgenden Arbeitsgänge der Messung, sowie eine Weiterbehandlung der Oozyten, wie unter 3.2.2.3.1 in den Schritten ② und ③ beschrieben, fortgeführt.

3.2.2.4 Immunfluoreszenz des GLUT1 in der konvokalen Laserlicht-Mikroskopie

Für einige Fragestellungen war es wichtig, die Menge an Glucosetransportprotein in der Plasmamembran im Vergleich zur Transportleistung der Zelle zumindest semiquantitativ zu ermitteln. Dafür wurde ein von Keller entwickeltes Protokoll eingesetzt, das auf den Arbeiten von Tordjman et al. (Tordjman et al., 1990), Garcia et al. (Garcia et al., 1992), Tanner et al. (Tanner et al., 1992) und Marshall et al. (Marshall et al., 1993) beruhte und an halbierten Oozyten von *Xenopus laevis* eingesetzt wurde.

Das Prinzip dieser Methode besteht in der Reaktion des Zielproteins mit einem Antikörper, der wiederum mit einem weiteren Antikörper reagiert. Dieser zweite Antikörper ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, der durch Laserlicht einer spezifischen Wellenlänge angeregt werden kann und dann ein Fluoreszenzsignal emittiert. Dieses Signal wird unter einem speziellen Mikroskop detektiert, wodurch eine Lokalisation des Proteins in der Zelle möglich ist. Weiterhin ist mit diesem Verfahren und den entsprechenden Vergleichs- und Kontrollgruppen eine visuelle Bewertung des Glucosetransporteranteils in halbierten Oozyten gegeben. Anhand der so gewonnenen Daten und den Ergebnissen der basalen Transportaktivitätsbestimmung der Oozyten, die parallel erfolgte, konnte beurteilt werden, ob eine Gruppe im Vergleich zur anderen stärker exprimiert wurde und/oder mehr Substrat pro exprimiertem Transporter transportiert wurde.

① Nach 48 bis 72 Stunden der RNS- bzw. DEPC-H₂O-Injektion in die Oozyten wird ein Teil von ihnen für die Fixierung in 4 %iges Paraformaldehyd überführt und 16 h bei 4° C inkubiert. Mit den verbliebenen Oozyten erfolgt die Bestimmung der basalen Transportaktivität, wie sie unter 3.2.2.3.1 beschrieben ist. Nach der Fixierung folgt eine Reinigung der Oozyten von der Fixierlösung durch gründliches Waschen in 100 mM Glycin-PBS. Der Waschvorgang wird zweimal wiederholt. Während der

Waschvorgänge sollten die Oozyten in der Lösung auf einem Schüttler (Reax 3, Heidolph) mit $40 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ bewegt werden. Nach der kompletten Reinigungsprozedur, ist es möglich, die Oozyten in 0,1 %igem RSA-PBS bei 4°C für mehrere Tage zu lagern.

② Überführen der Oozyten in 10 mM Triethanolamin-PBS und Waschung für mindestens 15 min unter Bewegung. Danach wird je eine Oozyte in eine Bohrvertiefung ($\varnothing 1,4 \text{ mm}$) einer Plexiglasbank befördert und mit einem Skalpell halbiert. Eine der Hälften wird in 2 %iges Pferdeserum-PBS überführt und für mindestens 1 h inkubiert (= blocken).

③ Nach dem Blocken erfolgt ein weiterer dreiteiliger Waschvorgang, wobei die Oozyten zweimal in 0,1 %igem Triton X-100-PBS und zum Schluss einmal in 10 mM Triethanolamin-PBS gereinigt werden. Die Oozytenhälften verbleiben je 5 min in den Waschlösungen.

④ Die Oozytenhälften kommen in eine 2 %ige Pferdeserum-PBS-Lösung, die ein Gehalt an 0,00002 % des GLUT1-Antikörpers AK1462 (w/v) hat. Die Inkubationszeit beträgt 1,5 – 2 h auf dem Schüttler. Anschließend erfolgt ein Waschvorgang wie in Schritt ③ beschrieben.

⑤ Die Oozytenhälften werden für die Markierung mit fluoreszenzmarkiertem Antikörper (Anti-Rabbit IgG, FITC Conjugate in goat - Sigma) in eine 2 %ige Pferdeserum-PBS-Lösung mit einer 1 : 100 bis 1 : 300 Verdünnung dieses zweiten Antikörpers für 1 h inkubiert. Die Inkubation findet wiederum auf dem Schüttler diesmal im Dunkeln statt. Auch alle folgenden Arbeitsschritte erfolgen im Dunkeln, da der Fluoreszenzfarbstoff lichtempfindlich ist. Wo dies nicht möglich ist, sollte zumindest unter gedämpften Licht gearbeitet werden.

⑥ Nach der Markierung mit dem zweiten Antikörper werden die Oozytenhälften dreimal in PBS unter Bewegung gewaschen.

⑦ Es folgt das Aufbringen der Oozytenhälften auf Objektträger. Dazu werden 3 - 5 Oozytenhälften mit der Schnittseite nach oben auf einen Objektträger übertragen und die restliche Feuchtigkeit mit einer Pipette und einem fusselfreien Tuch (Kim Wipes, Kimberly-Clark) entfernt. Zu den Oozytenhälften werden 1 - 2 Tropfen Fluoromount-G gegeben und ein Deckgläschen vorsichtig aufgesetzt und angedrückt. In Dunkelheit bei 4°C muss das Fluoromount für mindestens 12 h aushärten. Die präparierten Oozyten können unter diesen Bedingungen einige Wochen gelagert werden.

Die Auswertung der Präparate fand mit einem konvokalen Laserlichtmikroskop (Axiovert 100 – Laser-Scanning Microscope 510, Zeiss) statt. Angeschlossen an dieses Mikroskop war ein PC mit entsprechender Software (LSM 5, Zeiss) für die Analysen. Der Fluoreszenzfarbstoff des zweiten Antikörpers wurde mit Laserlicht der Wellenlänge 488 nm angeregt. Das emittierte Licht hatte eine Wellenlänge von 505 nm, so dass die Oozytenoberfläche unter dem Mikroskop und auf dem Bildschirm des PC's grün erschien. Wichtig war für eine vergleichbare Darstellung der Oozytenhälften untereinander, dass die Fluoreszenz konstant bis zu einer Tiefe von 10μ von der Schnittoberfläche ermittelt wurde.

3.3 Statistik

Die angegebene Standardabweichung (s) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$s = \sqrt{\frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n-1}}$$

Dabei ist x der Messwert und n die Anzahl der untersuchten Oozyten aus mehreren unabhängigen Versuchen (Sachs, 1984).

Die Signifikanz (t) wurde nach dem Student's t-Test Verfahren für unabhängige Zufallsstichproben bei ungleichen Stichprobenumfängen berechnet:

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\left[\frac{n_1 + n_2}{n_1 \cdot n_2}\right] \cdot \left[\frac{Q_1 + Q_2}{n_1 + n_2 - 2}\right]}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\left[\frac{n_1 + n_2}{n_1 \cdot n_2}\right] \cdot \left[\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}\right]}}$$

wobei \bar{X} den Mittelwert, n die Anzahl der Oozyten aus mehreren unabhängigen Versuchen, Q die Summe der Abweichungsquadrate und s die Standardabweichung darstellt (Sachs, 1984).
