

3 Material und Methoden

3.1 Geräte

Tabelle 3: Übersicht über die Geräte, Parameter und Bezugsquellen.

Verwendung	Bezeichnung/ Einstellungen	Hersteller	Ort
Proteinexpression: Blot-Apparatur für Western Blots	FastBlot B33	Biometra	Göttingen, D
Detektion: Phosphorimager-Scanner	BAS1500	Fuji	Akasaka, JP
Detektion: Szintillationszähler	LS6500 Multi-Purpose Szintillator	Beckmann/ Coulter	Fullerton, USA
Gaschromatograph	HP6890series, Serie H; HP GC Chemstation Rev. A.06.03 [509]	Hewlett-Packard	Palo Alto, USA
Gelelektrophorese und Geldokumentation	ChemDoc, QuantifyOne 4.2.1 built 008	BioRad	Hercules, USA
Proteinexpression: Gelelektrophorese	vertikale Elektrophoresekammer	BioRad	Hercules, USA
Hybridisierung: ³² P-Detektor	QC2000	BioScan Inc.	Washington, USA
Hybridisierung: DNA-UV-Fixierung	UV Stratalinker 1800	Stratagene	La Jolla, USA
Hybridisierung: Rollerofen	MiniOven	Hybaid	Ashford, GB
Probenkonzentrator	Sample Concentrator	Labtech International	Ringmer, GB
Vakuum-Konzentrator	Concentrator 5301	Eppendorf	Hamburg, D
Mikroskopie: Konfokales Laser-scanning Mikroskop	TCS SP2 mit UV-Ausstattung, Software: Leica Vers. 2.0	Leica	Solms, D
Partikelbeschuß	Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System	BioRad	Hercules, USA
Molekularbiologie: PCR-Maschine	T-Gradient	Biometra	Göttingen, D
Pflanzenanzucht: Gewächshaus für <i>Arabidopsis</i> -Anzucht	HPIT, 50 % Luftfeuchte konstant, Tag: 16 h, 100-150 µE, 21 °C; Nacht: 19 °C	Exner Handels-GmbH	Mahlow, D
Pflanzenanzucht: Phytotron für <i>Arabidopsis</i> -Anzucht	P-U201, Tag: 16 h, 20 °C, 60 % Luftfeuchte, 120µmol Licht; Nacht: 16 °C, 75% Luftfeuchte	York international	York, USA
Pflanzenanzucht: Phytotron für <i>Arabidopsis</i> -Keimung	P-U201 A-F, ohne Feuchteregelung, 22 °C konstant, 16 h -Tag	York international	York, USA
Molekularbiologie: Photometer (Nukleinsäure- und Proteinquantifizierung)	Uvikon 942	Kontron Instruments	Watford, GB
Waagen: Analysenwaage	ARS 120-4	Kern	Balingen-Frommern, D
Zentrifuge: Tischzentrifuge	5417C	Eppendorf AG	Hamburg, D
Zentrifuge: Ultrazentrifuge	Centrikon T-1080 mit Ausschwingrotor TST 41.14/ Festwinkelrotor 21284	Kontron Instruments	Watford, GB
Zentrifuge: Untertischzentrifuge	Varifuge 3.0 R	Heraeus	Hanau, D

3.2 Materialien

Tabelle 4: Übersicht über die Verbrauchsmaterialien und deren Bezugsquellen.

Verwendung	Bezeichnung/ Einstellungen	Hersteller	Ort
Chemikalien: ¹⁴ C-Substrat für Enzymtest	1,2,-dioleoyl -L-3-Phosphatidyl-L-[3- ¹⁴ C]serin, 1,85-2,29 GBq/mmol, 5 µCi (500 µl)	Amersham Pharmacia	Buckinghamshire, GB
Chemikalien: ³² P-dNTP für Hybridisierung	[alpha- ³² P]-dCTP, 110 TBq/mmol	Hartmann Analytic	Braunschweig, D
Chemikalien: Sonstige Chemikalien für Puffer, Lösungen, Medien u.a.	Soweit nicht anders vermerkt in <i>p.a.</i> Qualität von verschiedenen Herstellern	Merck AG Sigma	Fluka Darmstadt, D Neu-Ulm, D Deisenhofen, D
Dünnschichtchromatographie	Si250-PA	J.T. Baker	Phillipsburg, USA
Dünnschichtchromatographie: 2D	Silica 60	Merck	Darmstadt, D
Detektion: Röntgenfilm für Hybridisierung	X-OMAT	KODAK	Rochester, USA
Detektion: Software zum Auslesen der Rohdaten des Phosphorimagers	BAS-Reader (WIN 3.1, 1999)	Fuji	Akasaka, JP
Detektion: Szintillationscocktail	ReadySafe	Beckmann/ Coulter	Fullerton, USA
Hybridisierung: Detektion (nicht-radioaktiv)	CDP-Star, Anti-Digoxigenin, Fab fragments	Roche	Basel, CH
Hybridisierung: Sondenmarkierung (nicht-radioaktiv)	DIG DNA Labeling Kit	Roche	Basel, CH
Hybridisierung: Sondenmarkierung (radioaktiv)	Rediprime II DNA Labelling System	Amersham	Buckinghamshire, GB
Hybridisierung: Sondenmarkierung (radioaktiv)	Micro Bio-Spin Säulen	BioRad	Hercules, USA
Hybridisierung: Transfermembran für DNA- und RNA-Blots	Hybond N+	Amersham Pharmacia	Buckinghamshire, GB
Molekularbiologie: Aufreinigung von DNA aus PCR-Ansätzen	QiaQuick PCR Purification	Qiagen	Hilden, D
Molekularbiologie: genomische DNA aus Pflanzen	DNeasy Plant Mini Kit	Qiagen	Hilden, D
Molekularbiologie: Isolation von mRNA	polyAtract III	Promega	Mannheim, D
Molekularbiologie: Ligase	T4 DNA Ligase	New England Biolabs	Beverly, USA
Molekularbiologie: Plasmidpräparation	NucleoSpin Plasmid oder NucleoBond 500AX	Macherey & Nagel	Düren, D
Molekularbiologie: Proteinbestimmung	Bio-Rad Protein Assay	BioRad	Hercules, USA
Molekularbiologie: Western Blot	Nitrocellulose	Schleicher & Schuell	Dassel, D
Molekularbiologie: 1. Antikörper	PentaHIS (Maus)	Qiagen	Hilden, D
Molekularbiologie: 2. Antikörper	Anti-Maus + Phosphatase (Ziege)	Kirkegaard & Perry	Washington, USA
Molekularbiologie: Restriktionsenzyme	[Enzymname]	Boehringer/Roche	Ingelheim, D

Verwendung	Bezeichnung/ Einstellungen	Hersteller	Ort
Molekularbiologie: DNA-Extraktion aus Agarose	QiaQuick Gelextraction Kit	Qiagen	Hilden, D
Molekularbiologie: Nickelsäule für Aufreinigung nach Proteinexpression	Ni-NTA-Agarose	Qiagen	Hilden, D
Molekularbiologie: Dialyse für Aufreinigung nach Proteinexpression	10000 Da	Amersham	Buckinghamshire, GB
Molekularbiologie: 5'- und 3'-RACE	Advantage 2 PCR Kit	Clontech	Palo Alto, USA
Molekularbiologie: cDNA für 5'- und 3'-RACE	SMART RACE cDNA Amplification Kit	Clontech	Palo Alto, USA
Molekularbiologie: reverse Transkriptase für RACE	SuperScript II	GibcoBRL	Gaithersburg, USA
Partikelbeschuß: Zubehör	Microcarrier (Gold, 1 µm)	BioRad	Hercules, USA
Partikelbeschuß: Zubehör	Macrocarrier	BioRad	Hercules, USA
Partikelbeschuß: Zubehör	Berstscheiben (450psi)	BioRad	Hercules, USA
Software: Analysesoftware für DNA- und Proteinsequenzen	SeqMan 4.0, Protean 4.0, MapDraw 4.0, EditSeq 4.0, MegAlign 4.0	DNASStar Inc.	Madison, USA
Software: Software für Analyse der Phosphorimager-Scans	TINA Vers. 2.10i	Raytest	Straubenhardt, D

3.3 Plasmide

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Vektoren, Referenzen und Selektionsmarker

Verwendung	Bezeichnung	Referenz	Selektionsmarker
Vektor für Expression in Hefe	pYes2	Invitrogen, Carlsbad, USA	URA3, <i>ampR</i>
Vektor für Expression in Hefe	pDR196	Rentsch <i>et al.</i> (1995)	URA3, <i>ampR</i>
Vektor für Expression His-markierter Proteine	pQE30	Qiagen, Hilden (D)	<i>ampR</i>
Vektor für Expression His-markierter Proteine in E.coli M15pREB4	pQE31	Qiagen, Hilden (D)	<i>ampR</i>
Vektor für Expression His-markierter Proteine in E.coli M15pREB4	pQE100	Qiagen, Hilden (D)	<i>ampR</i>
Vektor für Expression GFP-markierter Proteine in <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-24	pEZR-KLN	Jan deBoer (unveröffentlicht)	<i>nptII</i>
Vektor für die Klonierung von PCR-Fragmenten	pGem-Teasy	Promega, Mannheim (D)	<i>ampR</i>
GFP-Proteinexpressionsvektor für <i>Arabidopsis thaliana</i> : Tonoplasten-Lokalisation	pA7-KCO1	Czempinski <i>et al.</i> , 2002	<i>ampR</i>
GFP-Proteinexpressionsvektor für <i>Arabidopsis thaliana</i> : Cytosol/Nukleus	pA7	Hong <i>et al.</i> , 1999	<i>ampR</i>
GFP-Proteinexpressionsvektor für <i>Arabidopsis thaliana</i> : Endoplasmatisches Retikulum	KDEL-GFP	Scott <i>et al.</i> , 1999	<i>ampR</i>
GFP-Proteinexpressionsvektor für <i>Arabidopsis thaliana</i> : Mitochondrien	pre-101	AG Müller-Röber, MPI Golm (D)	<i>ampR</i>

3.4 Stämme und Linien

Tabelle 6: Übersicht über die im Projekt verwendete Organismen, ihre Charakteristika und Herkunft, bzw. Referenz.

Art	Bezeichnung	CGSC Nr.	Charakteristika	Referenz
<i>E. coli</i>	XL1blue	-	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr)]	Stratagene, La Jolla (USA)
<i>E. coli</i>	EH150	6528	fhuA2, lacY1, tsx-1 or tsx- 70, glnV44(AS), gal-6, LAM-, xylA7, mtlA2, psd- 2(ts)	Hawrot u. Kennedy (1976)
<i>E. coli</i>	M15pREP4	-	Nal ^s , Str ^s , Rif ^s , RecA ⁺ , Uvr ⁺ , Lon ⁺ lac, ara, gal, mtl, f	Qiagen, Hilden (D)
Art	Bezeichnung	EUROSCARF Nr.	Charakteristika	Referenz
<i>S. cerevisiae</i>	YNL169c, <i>psd1</i>	Y02043	BY4741; Mat a; his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0; YNL169c::kanMX4	EUROSCARF, Frankfurt (D)
<i>S. cerevisiae</i>	BY4741, wt	Y04800	BY4741; Mat a; his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0; YGR170w::kanMX4	EUROSCARF, Frankfurt (D)
Art	Bezeichnung	Ökotyp/ ABRC Nr.	Charakteristika	Referenz
<i>A. thaliana</i>	C-24	Columbia	Wildtyp	MPI, Golm (D)
<i>A. thaliana</i>	Col-0	Columbia/CS1093	Wildtyp	ABRC, Columbus (USA)
<i>A. thaliana</i>	<i>psd3</i>	Columbia/ Garlic_86_G10	T-DNA Insertion in <i>PSD3</i>	Syngenta, San Diego (USA)

3.5 Oligonukleotide

Tabelle 7: Übersicht über die im Projekt hergestellten und verwendeten Oligonukleotide für die PCR. Hierbei bedeuten O = Orientierung der Oligonukleotide (► = vorwärts, ◄ = rückwärts) und Ss = in die Oligonukleotide eingebaute Schnittstellen für Restriktionsenzyme. Nicht berücksichtigt wurden die von der Firma DNACloningService (Hamburg) die für die Überprüfung der Konstrukte hergestellten Sequenzierungsoligonukleotide.

Name	bp	O	Beschreibung	Ss	Sequenz
PD 35	29	-	JL-202 (T-DNA)		CATTTTATAATAACGCTGCGGACATCTAC
PD 88	29	►	atPSD 1 (genomisch, vor Start)		CTGCGACATTCTCAAAGGAAATGATCAAC
PD 89	29	◄	atPSD 1 (genomisch, hinter Stop)		GTTCAACTCAACAGAGAATGAGAGAGCCA
PD 90	29	►	atPSD 2 (genomisch, vor Start)		ATGCTCGCTCAACTGCTCATGAAGTATAG
PD 91	29	◄	atPSD 2 (genomisch, hinter Stop)		TCAAACATATGTTGCAGCCTTGTACACCTG
PD 97	32	►	atPSD2 Klonierung der cDNA	<i>SphI</i>	CATGCATGCGTTTATCTTCCTGGTGCGTTAGG
PD 98	32	◄	atPSD2 Klonierung der cDNA	<i>KpnI</i>	GTCGGTACCTCAGTGGCAAAGATTTTCAGATC
PD 99	20	►	atPSD1 (AV527283) F Sequenzierung		CTGATACTACCAACCATTGT
PD 100	20	◄	atPSD1 (AV527283) R Sequenzierung		GTATTTGAGACCAATAGACT
PD 101	20	►	atPSD1 (AV527283) F2 Sequenzierung		GTACGAAGAATTCATTGAAC
PD 102	20	◄	atPSD1 (AV527283) R2 Sequenzierung		TCAAATGACCGGAGGGTTCT
PD 103	20	►	atPSD1 (AV527283) F3 Sequenzierung		CTTGTCAAGTTGAAGAGCCT
PD 104	20	◄	atPSD1 (AV527283) R3 Sequenzierung		GTAAAGCCTGGTGCAAGAC
PD 105	20	►	atPSD2 F Sequenzierung		CAGGAACCCGAGTCGACTTG
PD 106	20	◄	atPSD2 R Sequenzierung		CAGAGACAGGGACATGAAAC
PD 107	20	►	atPSD1 (AV527283) F4 Sequenzierung		CATCTGCGCTCACAGATCTC
PD 108	20	◄	atPSD1 (AV527283) R4 Sequenzierung		CAACAATGGTTGGTAGTATC
PD 111	20	►	PSD2 F2 Sequenzierung		GACACACTTATCAACTTATG
PD 112	20	◄	PSD2 R2 Sequenzierung		GAACATCCATCCATAAGAAG
PD 113	20	►	PSD2 F3 Sequenzierung		CAATAGCAAGTACTGTAATG
PD 114	20	◄	PSD2 R3 Sequenzierung		CTATTGGTCTCAAATACTGA
PD 175	29	►	atPSD3 (genomisch, vor Transkriptbeginn)		TGTACACCAAGAGAAGAGTAGAACAACAT
PD 176	29	◄	atPSD3 (genomisch, nach Translationsende)		TGTTTATAAGTAGCCTCGACTCTCAAGTA
PD 185	29	◄	atPSD1 (Exon 9)		GAAATCTAACCCATATGAAGCCTGCCTAT
PD 189	29	►	atPSD3 (genomisch, vor Transkriptbeginn)		CTCGTTGTTCTACAGTTACAAACACTAC

Name	bp	O	Beschreibung	Ss	Sequenz
PD 228	34	►	atPSD3 (Exon 2)	<i>SphI</i>	AGCGCATGCCTTGTGCCCGGAGCAACAATGGCTA
PD 229	34	◄	atPSD3 cDNA (Exon 11)	<i>PstI</i>	AGCCTGCAGCTTCTGGATCATAACCCGCTCCTC
PD 230	25	◄	atPSD3 (Exon 4)		CCAAGCTCTTGAGATTGATCGCAGA
PD 235	27	►	atPSD3 3'-RACE (Exon 11)		CCTACAGAGCCACCAGAGGAGCGGGTG
PD 236	28	◄	atPSD3 5'-RACE (Exon 2)		GAGGCGGCGAGCATGAAGAGCTCCAAGC
PD 240	45	-	RACE UPM (lange Komponente)		CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
PD 241	22	-	RACE UPM (kurze Komponente)		CTAATACGACTCACTATAGGGC
PD 242	29	◄	atPSD2 (Exon 13)		AACTGAGCTCATTCTTCCCCTGCTTCT
PD 243	32	►	atPSD3 für pEZR-K-LN (inkl. Startcodon)	<i>EcoRI</i>	GCCGAATTCATGAAACCTCGTTTTCTCAAAA
PD 244	32	◄	atPSD3 für pEZR-K-LN (exklusive Stopcodon)	<i>BamHI</i>	AATGGATCCCGTTCCTCTTTCCATCTTCCCAA
PD 247	32	◄	atPSD3 für pEZR-K-LN (exklusive Stopcodon)	<i>KpnI</i>	AATGGTACCCGTTCTCTTTCCATCTTCCCAA
PD 248	32	►	atPSD3 für pYes2 (inkl. Startcodon)	<i>HindIII</i>	GGAAAGCTTACCATGAAACCTCGTTTTCTCA
PD 249	32	◄	atPSD3 für pYes2 (inkl. Stopcodon)	<i>SphI</i>	ATAGCATGCTCATTCTCTTTCCATCTTCCCA
PD 253	24	►	Kanamycin-Resistenzgen		AGAAGAACTCGTCAAGAAGGCGAT
PD 254	24	◄	Kanamycin-Resistenzgen		AACAAGATGGATTGCACGCAGGTT
PD 284	29	►	atPSD1 genomisch (partiell, für Northern)		CATGATAAACATCTAATTTGGAGGCCT
PD 285	29	◄	atPSD1 genomisch (partiell, für Northern)		GCTTAGATTTACCTCAGTGTCACCTTACAT
PD 286	29	►	atPSD2 genomisch (partiell, für Northern)		CTCTCTGCTTATTTGCTTTCTTTGGCGTG
PD 287	29	◄	atPSD2 genomisch (partiell, für Northern)		GGATGTGTTGCATTATATCAGCTACATCA
PD 288	32	►	atPSD3 (Startcodon)	<i>SphI</i>	AAAGCATGCATGAAACCTCGTTTTCTCAAAA
PD 289	32	◄	atPSD3 genomisch, letztes Intron)	<i>PstI</i>	ACACTGCAGAACTGGAATTTTTATTCTCTCT
ZP1F	22	►	atPSD1 für pEZR-P1	<i>KpnI</i>	CTCAGGTACCGAGAATCATGGG
ZP1R	26	◄	atPSD1 für pEZR-P1	<i>BclI</i>	CTCATGATCAACGGGCTCAAGTACAC
ZP2F	27	►	atPSD2 für pEZR-P2	<i>EcoRI</i>	CACGAATTCAACATGCGTTTATCTTCC
ZP2R	29	◄	atPSD2 für pEZR-P2	<i>BclI</i>	CTCATGATCAACGATCAATGTAGACCTAG
QP1E CF	24	►	atPSD1 partiell für pQE-PSD1-EC	<i>SacI</i>	CACGAGCTCAAATAGGACTCCGG
QP1R	22	◄	atPSD1 partiell für pQE-PSD1-EC	<i>PstI</i>	CACTCTGCAGGCTCAAGTACAC

3.6 Medien und Lösungen

Für alle Medien und Lösungen wurde grundsätzlich demineralisiertes Wasser (Millipore, Billerica, USA) verwendet. Die Lösungen für experimentelle Arbeiten wurden soweit möglich für 25 Minuten bei 120° C sterilisiert.

Sofern nicht anders angegeben, wurden Lösungsmittel wie Ethanol, Isopropanol, usw. absolut, d.h. in der jeweilig verfügbaren, höchsten Reinheit verwendet.

Medien für *Escherichia coli*

LB-Medium

10 g NaCl, 10 g Select Peptone 140 (GibcoBRL, Gaithersburg, USA), 5 g Bacto Yeast Extract (Difco, Detroit, USA), auf pH 7,0 und 1000 ml Volumen. Für Festmedien wurden 15 g Select Agar (Invitrogen, Carlsbad, USA) zugegeben.

NBY-Medium (nach Matsumoto *et al.*, 1998)

1 g NaCl, 5 g Select Peptone 140 (GibcoBRL, Gaithersburg, USA), 2 g Bacto Yeast Extract (Difco, Detroit, USA), 8 g Nutrient Broth (Difco, Detroit, USA) auf pH 7,2 und 1000 ml. Für Festmedien wurden 15 g Select Agar (Invitrogen, Carlsbad, USA) zugegeben.

YT-Medium

8 g Bacto-Trypton (Difco, Detroit, USA), 5 g Bacto Yeast Extract (Difco, Detroit, USA), 5 g NaCl, auf pH 7,0 und 1000 ml. Für Festmedien wurden 15 g Select Agar (Invitrogen, Carlsbad, USA) zugegeben.

Für die Selektion notwendige Antibiotika wurden nach dem Autoklavieren der Medien zugesetzt. Dabei wurden folgende Endkonzentrationen (nach Sambrook *et al.*, 1989) eingestellt:

- Kanamycin 50 µg/ ml (gelöst in Wasser, anschließend sterilfiltriert)
- Ampicillin 50 µg/ ml (gelöst in Ethanol)

Medien für *Arabidopsis thaliana*

MS-Medium

4.4 g Murashige – Skoog-Salze (Gibco BRL, Gaithersburg, USA), 10 g Saccharose auf pH 5.7 (mit KOH) und 1000 ml. Für Festmedien wurden 20 g Select Agar (Invitrogen, Carlsbad, USA) zugegeben. Die Festmedien zur Selektion wurden vor dem Gießen der Medienplatten mit 50 mg/ l sterilfiltriertem Kanamycin versetzt.

Medien für *Saccharomyces cerevisiae*

YPD-Vollmedium

10 g Bacto Yeast Extract (Difco, Detroit, USA), 20 g Bacto-Pepton (Difco, Detroit, USA), 20 g Glucose, auf pH 7 und 1000 ml. Für Festmedien wurden 20 g Select Agar (Invitrogen, Carlsbad, USA) zugegeben.

URA3-Selektionsmedien

6,7 g Bacto Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren (Invitrogen, Carlsbad, USA), 0,8 g URA3-Dropout-Mix (Fa. Bio101, Carlsbad, USA), 20 g Galactose oder 18,36 ml 90 % (v/v) Milchsäure oder 20 g Glucose, auf pH 5,6 (mit NaOH) und 1000 ml. Für Festmedien wurden 16,7 g Select Agar (Invitrogen, Carlsbad, USA) zugegeben.

3.7 T-DNA-Insertionsmutantenpopulation von *Arabidopsis thaliana*

Die T-DNA-Insertionsmutantenpopulation der *Arabidopsis* knockout facility (University of Wisconsin, Madison, USA) ermöglicht die Durchmusterung von insgesamt 60750 T-DNA-Insertionsmutantenlinien von *Arabidopsis thaliana* nach genspezifischen Null- oder k.o.-

Mutanten. Die Population (Krysan *et al.*, 1999) wurde durch Transformation mit dem T-DNA-Vektor pD991-AP3 erzeugt. Das Durchsuchen nach einer Linie mit genspezifischer Integration erfolgt über PCR mit T-DNA-spezifischen und genspezifischen Oligonukleotiden (Krysan *et al.*, 1996). Die Durchmusterung wird in 4 Schritten vorgenommen, wobei die PCR der ersten beiden Runden bis auf die Detektion und Auswertung (Gelelektrophorese, Hybridisierung, Sequenzierung) durch die *Arabidopsis* knockout facility durchgeführt wird. Für *atPSD1* wurden dafür die genspezifischen Oligonukleotide PD88 und PD89 und für *atPSD2* PD90 und PD91 entwickelt. Für die T-DNA-Insertion wurde das nach Angaben der *Arabidopsis* knockout facility erstellte Oligonukleotid PD35 verwendet. Als Sonden für die Hybridisierung (siehe 3.8.11) wurde die mit PD88/ PD89 und PD90/ PD91 amplifizierte, genomische DNA von *atPSD1* und *atPSD2* verwendet. Die dritte Runde wurde inklusive PCR mit isolierter DNA aus Keimlingen (siehe 3.8.8 und 3.8.14) durchgeführt und die zur Mutante führende vierte Runde erfolgt ebenfalls vor Ort durch Beprobung der aus dem Samen-Pool angezogenen Pflanzen.

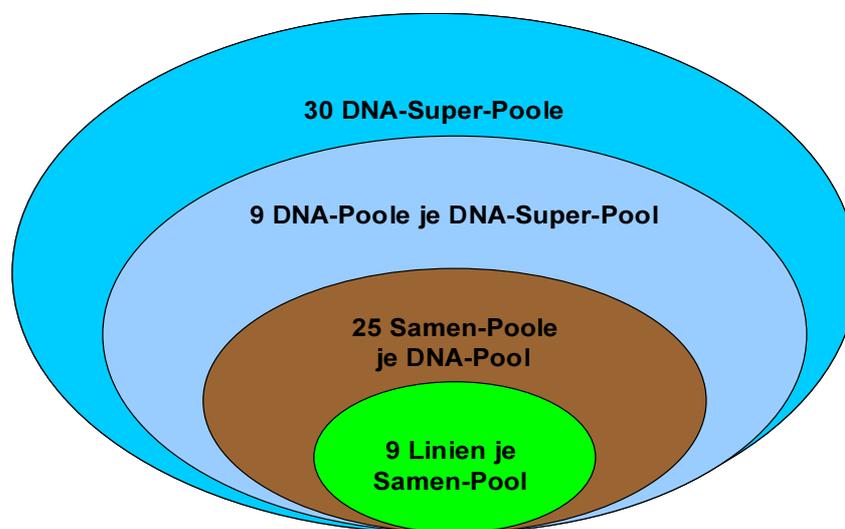


Abb. 6: Schematischer Aufbau der Insertionsmutantenpopulation von *Arabidopsis thaliana* der *Arabidopsis* knockout facility, University of Wisconsin, Madison, USA.

Bei einer Länge des gesuchten Gens von rund 4 kb wird bei dieser Populationsgröße bereits eine Wahrscheinlichkeit einer T-DNA-Insertion von rund 90 % angegeben (<http://www.biotech.wisc.edu/NewServicesAndResearch/Arabidopsis/SequencesAndPrimersIndex.html>). Da die Integration jedoch zufällig erfolgte, wurde die Lage der Insertion bereits im ersten Schritt durch Sequenzierung des PCR-Fragmentes überprüft. Insertionen im Intron oder außerhalb des translatierten Bereiches sind möglich und können womöglich die Genexpression nicht oder nicht ausreichend unterbinden.

3.8 Methoden und Techniken

3.8.1 Plasmidisolierung

Es wurden sowohl kommerziell verfügbare Systeme als auch eine rein manuelle Methode mit selbst angesetzten Puffern verwendet. Bei den kommerziellen Systemen werden die Zellen gemäß Protokoll mit fertigen Puffern lysiert, die DNA wird an eine Silicamatrix gebunden, gewaschen und mit Wasser eluiert. Hierbei kamen für kleine Kulturvolumen und Plasmidausbeuten bis zu 50 µg das NucleoSpin Plasmid-System (Macherey & Nagel, Düren, D) und für große Kulturvolumen bis 500 ml das System NucleoBond 500AX

(Macherey & Nagel, Düren, D) zum Einsatz. Diese Methode wurde in der Regel für Präparationen verwendet, die sehr saubere DNA liefern mußten (z.B. zum Sequenzieren). Die manuelle Methode nach Sambrook *et al.*, 1989, wurde für die kostengünstige Präparation von vielen Klonen eingesetzt (z.B. bei der Suche von korrekten Konstrukten nach Klonierungen). Für diese wurden die Zellen mit dem zu präparierenden Plasmid über Nacht in 4 ml YT-Medium mit entsprechenden Antibiotika (siehe 3.6) angezogen (für größere Plasmidmengen wurden die Kultur- und Puffervolumen entsprechend erhöht). Die Zellen wurden bei 5000 x g abzentrifugiert und in 100 µl Resuspensionspuffer aufgenommen (0,9 % (w/v) Glucose; 0,01 M EDTA; 0,025 M Tris-HCl pH 8,0). Das Öffnen der Zellen erfolgte durch fünfminütige Inkubation (auf Eis) nach Zugabe des Lysepuffers (0,2 M Natriumhydroxid; 1 % (w/v) SDS). Durch Zugabe des Neutralisationspuffers (4,75 % (v/v) Ameisensäure; 3 M Kaliumacetat) und 15 minütiger Inkubation auf Eis wurde die Zelllyse unterbunden und Zellreste ausgefällt und durch Zentrifugation (5 Minuten, 20000 x g) abgetrennt. Die DNA wurde durch Zugabe von 1 Volumen Isopropanol und zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur präzipitiert. Nach der Zentrifugation bei 20000 x g wurde das DNA-Pellet kurz gewaschen (70 % (v/v) Ethanol) und in 30 bis 100 µl Wasser aufgenommen. Die DNA wurde anschließend mit 1 µl RNase A (10 µg/ml) versetzt und 10 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Quantifizierung erfolgte photometrisch oder (bei kleineren Mengen) gelelektrophoretisch. Es wurden in der Regel Plasmidausbeuten von 10 bis 15 µg erzielt. Für besonders saubere und gut quantifizierbare DNA wurde die DNA durch eine zusätzliche Phenol/ Chloroform-Extraktion weiter gereinigt. Dazu wurde 1 Volumen Phenol/ Chloroform (pH 7,5) zu der DNA-Lösung gegeben, gründlich gemischt und anschließend zentrifugiert (5 Minuten, 20000 x g). Die wässrige Phase wurde ein bis zwei Mal mit Chloroform extrahiert, um das Phenol vollständig zu entfernen. Anschließend wurde die DNA mit 1 Volumen 5 M Ammoniumacetat und 5 Volumen Ethanol bei Raumtemperatur gefällt, abzentrifugiert und mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nach der Lösung in Wasser wurde die DNA photometrisch oder gelelektrophoretisch quantifiziert. Die gelöste DNA wurde bei - 20° C gelagert.

3.8.2 Gelelektrophorese (DNA)

Je nach gewünschtem Trennbereich (Sambrook *et al.*, 1989) wurden Agarosegele zwischen 0,6 bis 1 % (w/v) hergestellt. Als Puffer wurde TBE-Puffer (45 mM Tris-Borat, 1 mM EDTA, pH 8) verwendet. Nach dem Aufkochen und Lösen der Agarose wurde Ethidiumbromid auf eine Endkonzentration von 0,025 µg/ ml zugegeben. Bis zum Gießen wurde die Agarose bei 58° C im Wasserbad aufbewahrt. Zum Gießen der Gele und der anschließenden Gelelektrophorese wurde ein horizontales Gelelektrophoresesystem (BioRad, Hercules, USA) verwendet. Das polymerisierte Gel wurde vollständig in Puffer untergetaucht. Die Probe (DNA-Lösung) wurde mit 6 x Ladepuffer nach Sambrook *et al.* (1989) gemischt (0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 % (w/v) Xylencyanol FF, 30 % (v/v) Glycerin) und in die Geltaschen gefüllt. Pro Gel wurden 2,5 bis 5 µl Längen- und Mengenmarker (SmartLadder, Eurogentec, Liege, B) in eine weitere Tasche gegeben. Der Lauf erfolgte je nach Gellänge zwischen 90 bis 120 V (Feldstärke 4 Volt/ cm). Anschließend wurde das Gel auf dem UV-Transilluminator bei 304 nm photographisch dokumentiert (BioRad, Hercules, USA). Für die gelelektrophoretische Quantifizierung von Plasmiden wurden diese mit einem Restriktionsenzym (siehe 3.8.7) ein Mal geschnitten, um die das Laufverhalten beeinflussenden Sekundärstrukturen zu entfernen. Bei Bedarf konnte die DNA durch anschließende Gelelution oder Übertragen auf eine Nylonmatrix (sog. „Blotten“, siehe 3.8.11) weiter verwendet werden.

3.8.3 Gelelektrophorese (RNA)

Die Elektrophorese wurde unter dem Abzug bei 100 V mit 14 x 14 cm großen Formaldehyd-Agarosegelen durchgeführt. Dazu wurden 1,5 % (w/v) Agarose in Wasser aufgekocht und gelöst. Anschließend wurde 1 x MEN-Puffer (4,19 g/l MOPS-NaOH; 0,41g/l Natriumacetat; 0,372g/l EDTA pH 7) und 1,17 % (v/v) Formaldehyd zugegeben. Als Elektrophorese-Puffer diente 1 x MEN-Puffer. Für die Überprüfung der photometrischen Quantifizierung wurden Testgele mit bis zu 5 µg RNA pro Probe angefertigt. Die für das spätere Blotten vorgesehenen Gele wurden mit 10 bis 20 µg RNA pro Probe beladen. Dazu wurde das entsprechende Volumen der Proben auf jeweils 15 µl verdünnt und mit 25 µl Probenpuffer (4 µl 10 x MEN; 6 µl 37 % (v/v) Formaldehyd; 20 µl Formamid; 1 µl 10 mg/ml Ethidiumbromid; 0,5 µl 1 mg/ml Bromphenolblau) für 10 Minuten bei 56° C denaturiert. Zum Beladen der Geltaschen wurden diese nicht mit Elektrophoresepuffer geflutet. Erst nach Einwandern der Probe in das Gel (nach ca. 5 bis 10 Minuten Elektrophorese) wurde der Puffer aufgefüllt und das Gel vollständig geflutet. Die Elektrophorese dauerte etwa 3 Stunden. Das Gel wurde anschließend photographisch dokumentiert und dem Blot-Verfahren (siehe 3.8.10) unterworfen.

3.8.4 Elution von DNA aus Agarose-Gelen

Für dieses Verfahren wurde ein kommerzielles System (QiaQuick Gelextraction Kit, Qiagen, Hilden, D) eingesetzt. Zur Elution von DNA aus Agarosegelen wurde das DNA-enhaltene Gelstück geschmolzen wobei die Schmelztemperatur durch spezielle Puffer auf 50° C gesenkt wurde. Die DNA wurde bei entsprechenden Pufferbedingungen an eine Silicamatrix gebunden. Nach dem Entfernen der Agarose und dem Waschen erfolgte die Elution unter salzarmen Bedingungen.

3.8.5 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung erfolgte nach der Sanger-Coulson-Methode (Sanger *et al.*, 1977) und wurde durch die Firma AGOWA (Berlin, D) durchgeführt. Dazu wurden 5 µg saubere DNA (Plasmid oder PCR-Fragment, mit kommerziellen Systemen isoliert, bzw. aufgereinigt) im Vakuum-Konzentrator (Eppendorf, Hamburg, D) lyophilisiert und zu AGOWA geschickt. Die Ergebnisse wurden per Email übermittelt. Die Analyse der Daten erfolgte mit dem DNAStar -Softwarepaket (DNAStar, Madison, USA).

3.8.6 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Bei der photometrischen Quantifizierung von RNA und DNA wird das Absorptionsspektrum der Nukleinsäuren zwischen 200 und 300 nm vermessen. Das Absorptionsmaximum bei 260 nm erlaubt mittels der folgenden Faktoren die Berechnung der Nukleinsäurekonzentration:

1 OD 260 nm von RNA = 40 µg/ml

1 OD 260 nm von DNA = 50 µg/ml

Durch die Vermessung über den ganzen Wellenlängenbereich lassen sich Hinweise auf Verunreinigungen (z.B. Phenol) durch Veränderungen im Spektrum erkennen. Die Messung erfolgte unter Verwendung von Quarzküvetten in einem herkömmlichen Zweistrahlphotometer (Uvikon 942, Kontron Instruments, Watford, GB). Sofern kein Hinweis auf Kontaminationen aus dem Spektrogramm erkennbar war, wurde die Berechnung des Nukleinsäuregehaltes und der Proteinkontamination über den OD_{260}/OD_{280} – Quotienten vorgenommen.

3.8.7 Restriktion und Ligation von DNA

Für die Überprüfung von Vektoren wurden im Regelfall < 1 µg DNA in 20 bis 50 µl Volumen unter Verwendung des geeigneten (und vom Hersteller mitgelieferten) Puffers für mindestens 2 Stunden bei der optimalen Temperatur (37° C für die meisten Enzyme)

geschnitten. Die anschließende Analyse erfolgte über die Gelelektrophorese. Im Falle der Weiterverwendung der geschnittenen DNA für Klonierungen wurde die DNA-Menge und das Volumen des Ansatzes entsprechend erhöht. Im Fall, daß die DNA mit zwei verschiedenen Enzymen zu schneiden war, wurde anhand der Unterlagen des Herstellers versucht, einen Puffer zu finden, in dem beide Enzyme mindestens 75 % Aktivität aufwiesen. War dies nicht möglich, so wurde die DNA nacheinander unter den jeweils optimalen Bedingungen geschnitten und dazwischen aufgereinigt (z.B. über ethanolische Fällung oder Gelelektion – siehe 3.8.4). Die Ligation erfolgte in der Regel über Nacht, wobei das kürzere, in den Vektor zu integrierende Fragment in mindestens fünffachem Überschuß zugegeben wurde. Die Berechnung der einzusetzenden DNA-Mengen erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Masse Fragment [ng]} = 5 \times \text{Masse Vektor [ng]} \times \frac{\text{Länge Fragment [bp]}}{\text{Länge Vektor [bp]}}$$

Die Ligation von DNA mit glatten Enden erfolgte bei 4° C; bei überstehenden Enden wurden 12 bis 14 °C gewählt.

3.8.8 Isolation genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*

Bei der Isolation genomischer DNA wurden über mehrere Aufreinigungsschritte störende Proteine und andere Zellbestandteile entfernt. Kommerziell verfügbare Systeme erreichen eine besondere Sauberkeit der genomischen DNA durch den Einsatz von Silicasäulchen. Die Isolation mußte besonders schonend erfolgen (kein heftiges Mischen oder Pipettieren) da die makromolekulare, genomische DNA leicht bricht. Für die Isolation wurden vier Methoden angewandt:

1. Schnellprotokoll („Shorty“) nach der Methode der Arabidopsis Knockout Facility, University of Wisconsin, USA (<http://www.biotech.wisc.edu/NewServicesAndResearch/Arabidopsis/FindingYourPlantIndex.html>): Diese Methode wurde für die PCR beim Durchmustern der *Arabidopsis thaliana*-Population (für 150 bis 200 mg Gewebe) verwendet.

Das Pflanzengewebe wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert und anschließend mit 550 µl „Shorty“-Puffer (0,2 M Tris-HCl, pH 9,0, 0,4 M LiCl, 25 mM EDTA, 1 % (w/v) SDS) und 550 µl Phenol/ Chloroform (1:1, pH 7,5) extrahiert. Nach der Phasentrennung durch Zentrifugation wurde der Überstand erneut mit 1 Volumen Phenol (pH 7,5) extrahiert. Nach der Phasentrennung wurde der Überstand mit 1 Volumen Isopropanol versetzt und die DNA für 10 Minuten gefällt. Nach der Zentrifugation (10 Minuten, 20000 x g) wurde das DNA-Pellet getrocknet und anschließend in 500 µl TNE-Puffer (0,01 M Tris-HCl, pH 8, 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA, pH 8) gelöst. Nach Zugabe von 2 µg RNase A und Inkubation für 10 Minuten bei 37° C wurde die Lösung erneut einer Phenolextraktion mit anschließender Isopropanol-Fällung unterworfen. Das DNA-Pellet wurde mit 80 % (v/v) Ethanol gewaschen und vor dem Lösen in 500 µl Wasser gründlich getrocknet. Von der so isolierten DNA wurden 1 bis 2 µl für einen PCR-Ansatz (25 µl Volumen) verwendet.

2. Einfaches Protokoll („Simple Prep“) nach der Methode der Arabidopsis Knockout Facility, University of Wisconsin, USA (<http://www.biotech.wisc.edu/NewServicesAndResearch/Arabidopsis/FindingYourPlantIndex.html>). Dieses Protokoll wurde für die anschließende PCR bei Einzelpflanzen (für < 100 mg Gewebe) eingesetzt.

Das Pflanzengewebe wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert und anschließend mit 500 µl „Shorty“-Puffer (Zusammensetzung: siehe 1.) versetzt. Nach dem Mischen wurde die Lösung 5 Minuten bei 20000 x g zentrifugiert und 350 µl vom Überstand abgenommen und zu 350 µl vorgelegtes Isopropanol gegeben. Nach zehnmütigem Mischen wurde die DNA abzentrifugiert und der Überstand gründlich entfernt. Die DNA wurde in 100 µl Wasser gelöst. Von der so isolierten DNA wurden 2 µl für einen PCR-Ansatz (25 µl Volumen) verwendet.

3. DNeasy Plant Mini Kit (Fa. Qiagen, Hilden, D), das für die Isolation besonders sauberer genomischer DNA in geringen Mengen (zum Sequenzieren oder schwierige PCRs, für < 100 mg Gewebe) verwendet wurde.

Das Pflanzengewebe wurde gemäß dem System beiliegendem Protokoll verarbeitet. Die Zellen wurden mechanisch und chemisch aufgeschlossen und Zellbestandteile wie Proteine, Polysaccharide, etc. ausgefällt und abgetrennt. Die genomische DNA wurde an eine Silicamembran gebunden, gewaschen und mit bis zu 400 µl Wasser eluiert.

4. CTAB-Protokoll, das für die Isolation von großen Mengen genomischer DNA in guter Qualität (für 1 bis 5 g Gewebe) verwendet wurde:

5 g Pflanzengewebe wurden gründlich in flüssigem Stickstoff gemörsert und bei 65° C mit CTAB-Puffer, pH 8 (140 mM Sorbitol, 220 mM Tris-HCl, pH 8, 22 mM EDTA, 800 mM NaCl, 1 % Sarkosyl, 0,8 % CTAB) inkubiert. Nach der Zugabe von 10 ml Chloroform wurden die Phasen durch Zentrifugation getrennt und die DNA aus der wässrigen Phase durch Zugabe von 17 ml Isopropanol auf Eis ausgefällt. Die DNA wurde abzentrifugiert und in 4 ml TE-Puffer pH 8 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) gelöst. Nach zehnteiliger Inkubation mit 10 µg RNase A bei Raumtemperatur wurde 400 µl Natriumacetat (3 M, pH 5,2) zugegeben und anschließend eine Extraktion mit ½ Volumen Phenol/ Chloroform durchgeführt. Nach einer weiteren Extraktion mit Chloroform wurde die DNA mit 2 Volumen Ethanol auf Eis gefällt, bei 20000 x g abzentrifugiert und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die DNA in 500 µl Wasser gelöst und quantifiziert.

3.8.9 RNA- und mRNA-Isolation aus *Arabidopsis thaliana*

Bei der Isolation von RNA muß diese vor dem Abbau durch die aufgrund fehlender Quartärstrukturen besonders stabilen und ubiquitären RNasen geschützt werden. Wasser und Lösungen wurden, soweit möglich, über Nacht mit 0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt. Dieses bindet kovalent an primäre und sekundäre Amine und inaktiviert die enzymatisch wichtigen Histidin-Seitenketten der RNasen. Da DEPC auch die Purinbasen der RNA durch Carboxethylierung kovalent modifizieren kann, wurde es vor der Verwendung der damit behandelten Lösungen durch Autoklavieren zerstört. Puffersubstanzen mit primären oder sekundären Aminen (z.B. Tris) wurden nicht mit DEPC behandelt, sondern wurden mit RNase-freiem Wasser angesetzt. Für die weitgehende Aufreinigung der RNA wird zusätzlich eine Lithiumchloridfällung verwendet, die sich als RNA-spezifische Fällungsmethode eignet (Barlow *et al.*, 1963; http://www.ambion.com/techlib/tb/tb_160.html).

1. Isolation von RNA (Gesamt-RNA):

Mit der Methode modifiziert nach Kay *et al.* (1987) wurden RNA-Ausbeuten zwischen 20 µg/ g Frischgewicht (aus Wurzeln) bis zu 300 µg/ g Frischgewicht (aus Blüten) erzielt. Für jede Probe wurden 5 ml Z6-Puffer (20 mM MES-NaOH, pH 7, 20 mM EDTA, 8 M Guanidinium-HCl) und 5 ml Phenol/ Chloroform (1:1, pH 6,5) vorgelegt. Dazu wurden rund 3 g frisch geerntetes und schockgefrorenes Pflanzengewebe zermörsert und noch gefroren in das vorgelegte Puffer/Lösungsmittelgemisch gegeben. Nach dem Mischen für 10 Minuten wurden die Phasen bei 2500 x g getrennt und der Überstand mit 1/20 Volumen 1 M Essigsäure und 0,7 Volumen Ethanol versetzt.

Nach der Zentrifugation bei 20000 x g wurde das Pellet mit 3 M Natriumacetatlösung gewaschen und in 1 ml Wasser gelöst. Anschließend wurde 8 M Lithiumchloridlösung zugegeben bis eine Endkonzentration von 2 M erreicht war. Nach 30 Minuten bei -20° C wurde die RNA 10 Minuten bei 25000 x g und 4° C abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit

70% Ethanol gewaschen und anschließend in Wasser aufgenommen und photometrisch und gelelektrophoretisch quali- und quantifiziert.

2. Isolation von mRNA:

Zur Isolation der mRNA, die etwa nur 1% des Gesamt-RNA darstellt, wurde das polyAtract-System (Promega, Mannheim, D) verwendet. Hierzu wurde die zuvor extrahierte Gesamt-RNA verwendet. Dies bedient sich des charakteristischen 3'-Endes der mRNA. An diesem Ende werden biotinylierte Thymin-Oligomere gebunden, die sich wiederum an Streptavidin-tragende, paramagnetische Partikel (sogenannte PMPs) anlagern. Über einen Magneten wurden diese Partikel mit der anhaftenden mRNA fixiert und von der übrigen RNA getrennt. Nach dem Waschen wurde die mRNA durch Wasser eluiert. Das mRNA-haltige Eluat wurde aufgrund der geringen mRNA-Mengen nicht quantifiziert, sondern bis zur Verwendung bei -20°C verwahrt.

3.8.10 RNA-Blot („Northern-Blot“)

Eine Gelelektrophorese-Kammer wurde mit 10 x SSC-Puffer als Transferlösung gefüllt (87,65 g/l Natriumchlorid; 44,1 g/l Natriumcitrat pH 7,0). Als Docht wurde ein etwa 15 x 23 cm großes Filterpapier verwendet, dessen Enden in die gefüllten Pufferkammern reichten. Das Gel wurde mit der Oberseite nach unten auf das Filterpapier gelegt. Auf das Gel wurden nacheinander ein gleichgroßes, mit Wasser angefeuchtetes Membranstück und zwei angefeuchtete Filterpapiere aufgelegt. Parafilmstreifen an den Gelkanten dienten als seitliche Abdichtung. Den Abschluß bildete ein Stapel Papierhandtücher, der mit einer Platte und mit einem Gewicht (ca. 200 g) beschwert wurde. Am nächsten Tag wurde die Membran freigelegt und samt des darunter befindlichen Gels umgedreht. Mit einem schwarzen Kugelschreiber wurden die Taschen des Geles auf der Membran markiert um sie später sicher den Signalen zuordnen zu können. Die Membran wurde mit UV-Licht behandelt (UV Stratalinker1800, Stratagene, La Jolla, USA), anschließend luftgetrocknet und photographisch dokumentiert. Das Gel wurde im UV-Licht auf Vollständigkeit des Transfers überprüft und anschließend verworfen. Die Membran wurde bis zur Verwendung zwischen Filterpapieren trocken aufbewahrt.

3.8.11 DNA-Blot (“Southern Blot”)

Der Aufbau und die Durchführung entspricht dem Verfahren des Northern Blots wobei hier jedoch DNA aus DNA-Elektrophoresegelelen auf die Membran transferiert wird. Als Transferlösung wurde hier 0,4 M NaOH-Lösung verwendet.

3.8.12 Hybridisierung mit radioaktiv-markierter Sonde

Eine Micro Bio-Spin Säule (BioRad, Hercules, USA) wurde wiederholt mit einer Sephadex 50-Suspension (Sephadex 50 in 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7) gefüllt und bis zur Trockenheit zentrifugiert ($1000 \times g$ / 3 Minuten). Für die Sonde wurden etwa 100 ng DNA in einem Volumen von 50 μl (mit TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7) für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und zu dem Reaktionsansatz (Rediprime II, Amersham, Amersham, GB) gegeben. Im Isotopenlabor wurden 5 μl [$\alpha\text{-P}^{32}$]-dCTP zugegeben (50 μCi , Hartmann Analytics, Braunschweig, D). Der Ansatz wurde 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Die markierte Sonde wurde auf die vorbereitete Sephadex-Säule gegeben und nach Zugabe von 50 bis 100 μl Wasser 3 Minuten bei $1000 \times g$ zentrifugiert. Das Eluat mit der Sonde wurde mit dem Detektor (QC2000, Bioscan, Washington, USA) auf erfolgreiche Markierung überprüft. In der Regel betrug die gemessene Radioaktivität der Sonden um die 500×10^6 dpm. Vor der Zugabe der Sonde zu dem heißen Prähybridisierungsansatz wurde sie 5 Minuten bei 95°C denaturiert.

Die Membran wurde 2 Minuten in 2 x SSC gewaschen und anschließend in eine Hybridisierungsröhre eingeführt. Hierbei wurde auf möglichst geringe Überlappung der

Membran geachtet. Die Oberseite der Membran (probentragende Seite) war nach innen orientiert so daß der Hybridisierungspuffer diese Seite ungehindert erreichte. Die Röhre wurde mit 15 ml heißem Hybridisierungspuffer gefüllt (250 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,3; 7 % (w/v) SDS; 1 mM EDTA; 1 % (w/v) BSA). Zu dem Ansatz wurde 100 µg/ml denaturierte Heringsperma-DNA zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen gegeben. Anschließend wurden die Membran 5 bis 7 Stunden lang unter Rollen der Röhre bei 65° C (stringente Bedingungen für homologe Proben) prähybridisiert.

Die Hybridisierung wurde gestartet indem die radioaktiv markierte und bei 95° C zuvor denaturierte Sonde direkt in den Hybridisierungspuffer gegeben wurde. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65° C im Rollerofen. Zum Waschen wurde der Waschpuffer (2 x SSC; 0,1 % (w/v) SDS) auf 60° C erwärmt. Der radioaktive Hybridisierungspuffer wurde abdekantiert und gegen den heißen Waschpuffer ersetzt. Die Membran wurde zwei bis drei Mal für jeweils 15 bis 25 Minuten bei rund 60° C gewaschen und der Waschfortschritt mit dem Geiger-Müller-Zählrohr verfolgt (Überprüfen der Radioaktivität des Waschpuffers und der Membran nach den einzelnen Waschschritten). Die Membran wurde anschließend in Folie verpackt.

Die anschließende Detektion erfolgte über das Auflegen eines Röntgenfilmes (X-OMAT, KODAK, Rochester, USA) für 1 bis 3 Tage, wobei zur Orientierung eine Ecke des Films abgeschnitten wurde. Die Exposition erfolgte bei -80° C in einer mit einem Phosphorverstärkerschirm ausgestatteten Filmkassette. Die Entwicklung des Films erfolgte in der Dunkelkammer. Der Film wurde bis zu 3 Minuten in der Entwicklerlösung (Fa. KODAK, Rochester, USA) entwickelt, kurz gewässert und anschließend für bis zu 15 Minuten im Fixierer fixiert. Nach dem Wässern wurde der Film luftgetrocknet. Die in der Regel gut sichtbaren Umrisse der Membran und die Lage der Geltaschen erlaubte die sichere Zuordnung der Signale auf der Membran und damit auf dem Gel. Alternativ stand die Detektion mit einer ³²P-Phosphorimager-Platte zur Verfügung (siehe 3.8.30).

3.8.13 Hybridisierung mit Digoxigenin-markierter Sonde

Mit der zu markierenden DNA wurde mit dem PCR-Programm „MADISON“ eine PCR mit *Taq*-Polymerase durchgeführt. In Abweichung zum üblichen Protokoll wurde ein spezieller Mix der vier Nukleotide eingesetzt, bei dem dTTP durch eine Mischung aus DIG-dUTP/dTTP (1:20) ersetzt wurde. Paralell wurde ein zweiter Ansatz mit dem normalen dNTP-Mix durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch auf erfolgreiche Sondenmarkierung überprüft.

Die Prähybridisierung der Membran erfolgte für mindestens 3 Stunden bei 50° C im Hybridisierungspuffer (50 % (v/v) Formamid, 5 X SSC, 50 mM NaPO₄, pH 2, 2 % (w/v) Blocking Reagenz (Roche, Basel, CH), 7 % (w/v) SDS, 0,1 % (v/v) N-Laurylsarkosin). Die über PCR markierte Sonde wurde vor der Zugabe 5 Minuten bei 95° C denaturiert. Nach der Hybridisierung über Nacht wurde der Hybridisierungspuffer gesammelt und für die spätere Verwendung bei -20° C gelagert. Die Membran wurde kurz in Puffer 1 gewaschen (100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5, 0,3 % (v/v) Tween 20) und anschließend eine Stunde in der Block-Lösung bei Raumtemperatur geschwenkt (1 % (w/v) Blocking Reagenz, 100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5). Anschließend wurden 4 µl Anti-DIG-Antikörper (Roche, Basel, CH) zugegeben und für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Membran für jeweils 20 Minuten in Puffer 1 wurde die Membran kurz in Puffer 3 geschwenkt (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 9,5) und anschließend in Folie eingeschlagen. Auf die Membranoberseite wurde eine 1 : 200 Verdünnung von CDP-Star (Roche, Basel, CH) in Puffer 3 angesetzt (ca. 0,5 ml pro 100 cm² Membranfläche) und auf der Membran verteilt. Nach etwa 15 Minuten Entwicklung im Dunklen wurde ein Röntgenfilm aufgelegt. In der Regel genügten bereits Expositionen zwischen 20 Sekunden und 5 Minuten für eine deutliche Belichtung. Die Filmentwicklung erfolgte analog zu der bereits beschriebenen

Methode (siehe 3.8.12). Zur Wiederverwendung einer DIG-markierten Sonde wurde diese 10 Minuten bei 68° C denaturiert und anschließend nach Abgießen des Prähybridisierungspuffers zu der Membran gegeben. Die Sonden wurden bis zu 4 Mal verwendet ohne daß sie qualitative oder quantitative Einbußen zeigten.

3.8.14 Polymerasekettenreaktion („PCR“)

PCR fand in vielen Bereichen des Projektes Anwendung:

- Durchmustern der T-DNA transformierten *Arabidopsis thaliana*-Population zum Identifizieren der *psd1*- und *psd2*-Mutanten
- Durchmustern der F1- und F2-Generation nach Kreuzung der Einzelmutanten zur Isolation der *psd1/psd2*-Doppelmutante
- DIG-Sondenmarkierung für die nicht-radioaktive Hybridisierung
- Präparation von DNA für die Sequenzierung des T-DNA-Überganges bei den *psd1*- und *psd2*-Mutanten
- *PSD3*-Klonierung

Je nach Ziel der PCR kamen vier verschiedene Polymerasen zum Einsatz:

1. Taq-Polymerase (Gibco BRL, Gaithersburg, USA)

Diese, relativ schnelle und robuste, jedoch ungenaue Polymerase wurde (samt mitgeliefertem Puffer) für die schnelle Überprüfung von Konstrukten, für das Erzeugen von ungepaarten Nukleotidüberhängen („Tailing“, siehe 3.8.16) oder für die DIG-Sondenmarkierung (siehe 3.8.13) verwendet. Diese Polymerase wurde bereits beim Ansetzen der PCR Reaktionen zugegeben.

2. Pfu-Polymerase (Stratagene, La Jolla, USA)

Diese langsame, aber nahezu fehlerfrei arbeitende Polymerase wurde für Klonierungen verwendet, bei denen fehlerfreie Amplifikation erforderlich war. Diese Polymerase wurde bereits beim Ansetzen der PCR Reaktionen zugegeben.

3. ExTaq-Polymerase (TaKaRa, Otsu, J)

Diese schnelle, jedoch teure Polymerase wurde für anspruchsvolle PCRs mit schwierigen Templates verwendet (z.B. beim Durchmustern der *Arabidopsis*-Populationen zur Identifikation der Mutanten). Diese Polymerase wurde stets erst dann zu dem Ansatz gegeben, wenn dieser bereits die Denaturierungstemperatur des ersten Schrittes erreicht hatte („Hot Start“).

4. Advantage Polymerase (Clontech, Palo Alto, USA)

Diese Polymerase ist ein kommerziell erhältlicher Mix aus *Taq*- und *Pfu*-ähnlichen Polymerasen und wurde für die RACE (siehe 3.8.15) eingesetzt, bei der eine hohe Geschwindigkeit und Genauigkeit bei gleichzeitig schwierigem Template erforderlich waren. Diese Polymerase aktiviert sich selbsttätig erst beim Erreichen der Denaturierungstemperatur und wurde daher bereits beim Zusammengeben der PCR-Komponenten zugesetzt.

PCR-Ansatz

Die Volumen der PCR-Ansätze betragen zwischen 25 µl (für hohe Probenzahlen wie beim Durchmustern) bis 100 µl (für große Produktmengen wie zum Sequenzieren). Der Standardansatz orientierte sich an dem Protokoll der *Arabidopsis* Knockout Facility, University of Wisconsin, USA (<http://www.biotech.wisc.edu/NewServicesAndResearch/Arabidopsis/GuidelinesIndex.html>).

- 1 x Puffer (inkl. 2,5 mM MgCl₂)
- 200 µM je dNTP (Stammlösung: 2,5 mM)
- 0,25 µM je Oligonukleotid („Primer“)
- 0,4 bis 100 ng zu amplifizierende DNA („Template“)
- 0,05 u Polymerase/ µl Volumen des PCR-Ansatzes

Für den bei Verwendung der ExTaq-Polymerase erforderlichen „Hot Start“ wurde die Polymerase mit 1 x Puffer verdünnt und erst zugegeben, nachdem die Proben bereits in der Maschine standen und die Denaturierungstemperatur des ersten Schrittes erreicht worden war. Das Standard-PCR-Programm „MADISON“ lief wie folgt ab:

1.	96° C	300 sec	
2.	94° C	15 sec	} 36 Zyklen
3.	65° C	30 sec	
4.	72° C	120 sec	
5.	72° C	240 sec	
6.	4° C	Pause	

Dieses PCR-Programm wurde für die PCR mit genomischer *Arabidopsis* - DNA und ExTaq-Polymerase entwickelt. Mit dem Programm konnten spezifische PCR-Produkte aus genomischer DNA zwischen 2 bis 4,5 kb sicher amplifiziert werden. Das Programm wurde auch für andere Anwendungen (ausgenommen RACE) verwendet, wobei der erste, sehr lange Denaturierungsschritt gegebenenfalls stark verkürzt oder ganz weggelassen wurde (bei Verwendung von einfacheren Templates wie Plasmiden oder PCR-Fragmenten). Bei Bedarf wurde auch die Zyklenzahl auf 30 Zyklen verringert.

Bei schlechter oder fehlender Amplifikation wurde die Temperatur des 3. Schrittes innerhalb eines Bereiches zwischen 55° und 65° C variiert. In einigen Fällen war aufgrund größerer Produkte die Variation der Elongationszeit (4. Schritt) erforderlich wobei üblicherweise 1 Minute pro Kilobase des zu erwartenden PCR-Produktes angesetzt wurde. Beim Design der Ologonukleotide spielten neben Lage und dem Einbau von Schnittstellen auch eine zueinander passende Schmelztemperatur eine Rolle. Die Berechnung der Schmelztemperatur erfolgte nach der Formel

$$T_m = 4 * (G_n + C_n) + 2 * (A_n + T_n)$$

wobei T_m = Schmelztemperatur des Oligonukleotids

und X_n = Zahl der verschiedenen Nukleotide Guanin, Cytosin, Adenin und Thymin im Oligonukleotid darstellen.

Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Reaktionen erfolgte mit dem QiaQuick PCR Purification – Kit (Qiagen, Hilden, D). Analog zu den bereits beschriebenen Plasmid-Aufreinigungssystemen wurde der PCR-Ansatz mit dem mitgeliefertem Puffer versetzt und die DNA an eine Silica-Säule gebunden. Nach dem Waschen wurde sie mit Wasser eluiert.

3.8.15 3' und 5'-RACE

Die RACE entspricht einer PCR unter speziellen Bedingungen, bei der Einzelstrang-cDNA als Vorlage („Template“) verwendet wird. Sie dient dazu, bisher bekannte, aber unvollständige cDNAs zu vervollständigen. Als Oligonukleotide werden ein genspezifisches und ein für eine zuvor in die cDNA eingeführte, universelle Sequenz spezifisches Oligonukleotid verwendet. Die Lage des genspezifischen Oligonukleotids wird so gewählt, daß es vor dem Ende der bisher längsten cDNA-Sequenz liegt. Auf diese Weise wird aus dem Gemisch der Einzelstrang-cDNAs nur der noch fehlende Teilbereich der gesuchten cDNA amplifiziert. Um die cDNA dann vollständig zu erhalten, kann mit den

neuen Sequenzdaten ein neues Oligonukleotidpaar erstellt werden, daß die Amplifikation der vollständigen cDNA ermöglicht. Die RACE wurde zur Vervollständigung, bzw. Überprüfung der mit anhand der genomischen Sequenzdaten isolierten cDNA von *PSD3* aus *Arabidopsis thaliana* eingesetzt. Zur Herstellung der cDNA wurden ca. 250 ng pflanzliche mRNA gemäß Protokoll des verwendeten cDNA-Synthese-Systems (SMART RACE cDNA Amplification Kit, Clontech, La Jolla, USA) eingesetzt. Für die 5'- und 3'-RACE (Advantage 2 PCR Kit, Clontech, La Jolla, USA) wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

94° C	30 sec	}	5 Zyklen
72° C	180 sec		
94° C	30 sec	}	5 Zyklen
70° C	30 sec		
72° C	180 sec	}	25 Zyklen
94° C	30 sec		
68° C	30 sec	}	
72° C	180 sec		
4° C	Pause		

Ein Aliquot der Reaktion wurde anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Southern Blot und stringenter, nicht-radioaktiver Hybridisierung (siehe 3.8.11 und 3.8.13) überprüft. Aus dem restlichen Ansatz wurden nach erneuter Gelelektrophorese die korrekten Fragmente aus dem Agarosegel eluiert, mit *Pfu*-Polymerase und nach Zwischenklonierung in den TA-Vektor (siehe 3.8.16) amplifiziert. Anschließend wurden die Fragmente sequenziert. Die vollständige *PSD3*-cDNA wurde über PCR und mit den anhand der RACE-Fragmente entwickelten, neuen Primer aus der für die RACE hergestellten cDNA amplifiziert und im TA-Vektor zwischenkloniert.

3.8.16 TA-Vektor Klonierung und Tailing

Gemäß Protokoll des verwendeten pGEM-Teasy-Systemes (Promega, Mannheim, D) wurden 1 bis 3 µl des PCR-Ansatzes (direkt nach dem PCR-Lauf, Amplifikation mit Taq- oder ExTaq-Polymerase) für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem Vektor, 1 x Puffer und 5 u Ligase ligiert und anschließend in *E. coli* transformiert (siehe 3.8.18).

PCR-Ansätze die mit *Pfu*-Polymerase durchgeführt wurden, wurden zuerst aufgereinigt und anschließend dem „Tailing“ unterworfen um der DNA die für die TA-Vektor-Klonierung notwendigen Adeninreste anzufügen. Dazu wurde das PCR Produkt in 10 µl Volumen mit 5 u Taq-Polymerase, 5 mM MgCl₂, 1 x Puffer und 0,2 mM dATP versetzt und für 15 bis 30 Minuten bei 70° C inkubiert. Anschließend wurde ein Aliquot davon zur Ligation eingesetzt.

3.8.17 Klonierungsstrategien für Expressionskonstrukte in *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Arabidopsis thaliana*

Die cDNAs der *atPSD1*, *atPSD2* und *atPSD3* wurden über PCR mit *Pfu*-Polymerase amplifiziert und zwischenkloniert. Für *atPSD1* konnte ein vollständiger EST bezogen werden (siehe 4). Für *atPSD2* und *atPSD3*, für die keine ESTs vorlagen, wurden zuvor die Lage der Start-, bzw. Stopcodons mittels RACE und Sequenzvergleichen mit anderen PSDs ermittelt (siehe dazu unter 4). *atPSD2* wurde mit den Oligonukleotiden PD97 und PD98 aus Einzelstrang-cDNA amplifiziert und mit dem Vektor pGEM-Teasy ligiert. *atPSD3* wurde mit PD288 und PD246 amplifiziert und mit dem über *sphI* und *HindIII* geöffneten pQE30-Vektor ligiert. Nach der Bestätigung der fehlerfreien Amplifikation mittels Sequenzierung, dienten diese Konstrukte als Vorlagen für eine Reihe weiterer PCRs, bei denen mit verschiedenen Oligonukleotiden die für die Konstrukte erforderlichen Schnittstellen in die amplifizierten cDNAs eingebaut wurden. Wenn möglich, wurde die cDNA direkt herausgeschnitten und mit dem entsprechenden Vektor ligiert. Teilweise waren erneute Zwischenklonierungen in pGEM-Teasy erforderlich. Weitere Konstrukte

wurden unter Verwendung des C-terminalen Bereiches einer *PSD*-cDNA aus *Physcomitrella patens* hergestellt (Von Orlow, 2000). Diese rund 2000 bp lange cDNA (*ppPSD1*, Klon 7) weist auf Proteinebene den typischen, C-terminalen Aufbau der PSD auf (siehe dazu unter 4). Eine der kleinsten bekannten *PSDs*, die *PSD* von *Escherichia coli*, ist zu diesem Bereich ortholog, so daß die grundsätzliche Funktionsfähigkeit dieses verkürzten *ppPSD*-Klons anzunehmen war. Die Konstrukte wurde über Restriktionsanalysen oder Sequenzierung überprüft.

Tabelle 8: Übersicht über die Klonierungsstrategien für die während des Projektes hergestellten und getesteten Konstrukte

Nr.	cDNA	Donor (cDNA)		Empfänger (Vektor)		Konstrukt Name	Anmerkung
		Plasmid	Enzym	Vektor	Enzym		
1	<i>atPSD3</i>	pGEM-Teasy	<i>SphI</i> <i>HindIII</i>	pYes2	<i>SphI</i> <i>HindIII</i>	pYes2-PSD3	Schnittstellen über PCR-Primer
2	<i>atPSD3</i>	(PCR)	- -	pEZR-KLN	<i>EcoRI</i> <i>BamHI</i>	pEZR-P3	Schnittstellen über PCR-Primer
3	<i>atPSD3</i>	pGEM-Teasy	<i>SpeI</i> <i>EcoRI</i>	pDR196	<i>SpeI</i> <i>EcoRI</i>	pDR196-PSD3	Schnittstellen über PCR-Primer
4	<i>atPSD2</i>	(PCR)	<i>EcoRI</i> <i>BclI</i>	pEZR-KLN	<i>EcoRI</i> <i>BamHI</i>	pEZR-P2	DNACloningService Hamburg
5	<i>atPSD1</i>	(PCR)	<i>KpnI</i> <i>BclI</i>	pEZR-KLN	<i>KpnI</i> <i>BamHI</i>	pEZR-P1	DNACloningService Hamburg
6	<i>atPSD1</i>	(PCR)	<i>SacI</i> <i>PstI</i>	pQE-100	<i>SacI</i> <i>PstI</i>	pQE-PSD1-EC	DNACloningService Hamburg, <i>E. coli</i> -homologer C-Terminus
7	<i>atPSD1</i>	pBluescript II	<i>SmaI</i> -	pDR196	<i>SmaI</i> -	pDR196-PSD1	-
8	<i>atPSD1</i>	pBluescript II	<i>SacI</i> <i>XhoI</i>	pYes2	<i>SacI</i> <i>XhoI</i>	pYes2-PSD1	-
9	<i>ppPSD</i>	pBluescript II	<i>BamHI</i> <i>XhoI</i>	pQE30	<i>BamHI</i> <i>XhoI</i>	ppPSD1/7	<i>E. coli</i> -homologer C-Terminus
10	<i>ppPSD</i>	pBluescript II	<i>NotI</i> <i>SpeI</i> <i>SpeI</i>	pYes2	<i>NotI</i> <i>SpeI</i> -	pYes2-ppPSD1/7	<i>E. coli</i> -homologer C-Terminus
11	<i>ppPSD</i>	pBluescript II	-	-	-	ppPSD1, Klon 7c	Leseraster-Korrektur, <i>E. coli</i> -homologer C-Terminus

Tabelle 8, Nr. 1: Das Konstrukt pYes2-PSD3 wurde für die Expression und Komplementation in *Saccharomyces cerevisiae* hergestellt. Die komplette cDNA der *atPSD3* wurde mit den Oligonukleotiden PD248 und PD249 und *Pfu*-Polymerase amplifiziert, wobei die Schnittstellen *SphI* und *HindIII* eingebaut wurden. Nach einer Zwischenklonierung in den TA-Vektor wurde *atPSD3* herausgeschnitten und mit dem entsprechend geschnittenen Vektor ligiert.

Tabelle 8, Nr. 2: Das Konstrukt pEZR-P3 wurde für die Lokalisierung des *atPSD3*-GFP-Fusionsproteins verwendet. Die mit den Oligonukleotiden PD244 und PD243 amplifizierte cDNA der *atPSD3* wurde nach der Restriktion über die eingeführten Schnittstellen *EcoRI* und *BamHI* geschnitten, wobei eine partielle *BamHI*-Restriktion erforderlich war. Anschließend wurde mit dem entsprechend geschnittenen pEZR-Vektor ligiert.

Tabelle 8, Nr. 3: Das Konstrukt pDR196-PSD3 wurde für die Expression und Komplementation in *Saccharomyces cerevisiae* hergestellt. Die komplette cDNA der *atPSD3* wurde aus dem für Konstrukt pYes2-PSD3 hergestellten TA-Vektor-Konstrukt (mit PD248 und PD249 amplifiziert und mit pGEM-Teasy ligiert) über die vektoreigenen Schnittstellen *SpeI* und *EcoRI* herausgeschnitten und mit dem entsprechend geschnittenen Vektor ligiert.

Tabelle 8, Nr. 4: Das Konstrukt pEZR-P1 wurde für die GFP-Fusionsprotein-Expression in *Arabidopsis thaliana* verwendet und durch die Firma DNACloningService (Hamburg, D) hergestellt. Dazu wurde die *atPSD1*-cDNA mit den Oligonukleotiden ZP1F und ZP1R amplifiziert und an den eingebauten Schnittstellen *KpnI* und *BclI* geschnitten und mit dem über *KpnI* und *BamHI* geöffnete pEZR-K-LN-Vektor ligiert. Das fertige Konstrukt wurde mittels Sequenzierung überprüft.

Tabelle 8, Nr. 5: Das Konstrukt pEZR-P2 wurde für die GFP-Fusionsprotein-Expression in *Arabidopsis thaliana* verwendet und durch die Firma DNACloningService (Hamburg, D) hergestellt. Dazu wurde die *atPSD2*-cDNA mit den Oligonukleotiden ZP2F und ZP2R amplifiziert und an den eingebauten Schnittstellen *EcoRI* und *BclI* geschnitten und mit dem über *EcoRI* und *BamHI* geöffnete pEZR-K-LN-Vektor ligiert. Das fertige Konstrukt wurde mittels Sequenzierung überprüft.

Tabelle 8, Nr. 6: Das Konstrukt pQE-PSD1-EC wurde zur Proteinexpression in *Escherichia coli* verwendet und durch die Firma DNACloningService (Hamburg, D) hergestellt. Dazu wurde der zu *Escherichia coli* PSD orthologe Sequenzbereich der *atPSD1*-cDNA mit den Oligonukleotiden QP1ECF und QP1R amplifiziert und an den eingebauten Schnittstellen *SacI* und *PstI* geschnitten und mit dem entsprechend geöffnetem pQE100-Vektor ligiert. Das fertige Konstrukt wurde mittels Sequenzierung überprüft.

Tabelle 8, Nr. 7: Das Konstrukt pDR196-PSD1 wurde für die Expression in *Saccharomyces cerevisiae* eingesetzt. Bei diesem Konstrukt wurde *atPSD1* mit *SmaI* herausgeschnitten und über die *SmaI*-Schnittstelle in den Vektor kloniert. Da diese Klonierung ungerichtet erfolgte, wurde beim Durchmustern der erhaltenen Klone mit zwei Restriktionsenzymen gearbeitet um die Orientierung über die Fragmentierung festzustellen.

Tabelle 8, Nr. 8: Das Konstrukt pYes2-PSD1 wurde für die Expression in *Saccharomyces cerevisiae* eingesetzt. Bei diesem Konstrukt wurde *atPSD1* mit *SacI* und *XhoI* herausgeschnitten und über diese Schnittstelle mit dem Vektor ligiert.

Tabelle 8, Nr. 9: Das Konstrukt ppPSD1/7 wurde zur Proteinexpression des zur *Escherichia coli* orthologen Sequenzbereiches der PSD aus *Physcomitrella patens* in *Escherichia coli* verwendet. Das C-terminale Ende der ppPSD wurde mit *BamHI* und *XhoI* herausgeschnitten und mit dem analog geöffneten Vektor ligiert.

Tabelle 8, Nr. 10: Das Konstrukt pYes2-ppPSD1/7 wurde für die Expression und Komplementation des zur *Escherichia coli* orthologen Sequenzbereiches der PSD aus *Physcomitrella patens* in *Saccharomyces cerevisiae* hergestellt. Das C-terminale Ende der ppPSD wurde mit *NotI* und *SpeI* herausgeschnitten und mit dem analog geöffneten Vektor ligiert.

Tabelle 8, Nr. 11: Das Konstrukt ppPSD1, Klon 7c, wurde für die Expression und Komplementation des zur *Escherichia coli* orthologen Sequenzbereiches der PSD aus

Physcomitrella patens in *Escherichia coli* hergestellt. Hier wurde eine notwendige Korrektur des Leserasters vorgenommen, in dem das zwischen den beiden Spel-Schnittstellen liegende Fragment (783 bp) herausgeschnitten und das Konstrukt religiert wurde.

3.8.18 Transformation von *Escherichia coli*

Ein Aliquot der bei -80° C gelagerten, kompetenten Zellen wurde auf Eis aufgetaut, mit ca. 1,5 µg DNA versetzt und für 30 Minuten auf Eis gelagert. Zur Transformation wurden die Zellen für 90 Sekunden bei 42° C gelagert ehe sie für weitere 3 Minuten auf Eis gekühlt wurden. Nach der Zugabe von 1 ml LB-Medium wurden die Zellen bei 37° C für eine Stunde geschwenkt und anschließend auf antibiotikahaltigen Platten ausplattiert und für eine Nacht bei 37° C kultiviert. Bei Bedarf wurde für die Blau-Weiß-Selektion vor dem Ausplattieren 50 µg X-Gal und 20 µg IPTG auf den Platten verteilt.

3.8.19 Kultur und Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Kultur

Die Kultur erfolgte in der Regel bei 28° C auf festen oder in flüssigen Medien. Flüssigkulturen wurden aus Einzelkolonien von festen Medien angezogen. Als Vollmedium wurde YPD verwendet, die Selektion fand auf Uracil-freiem Glucosemedium statt. Teilweise kamen experimentelle Selektionsmedien zum Einsatz bei denen statt Glucose Galactose oder Lactat verwendet wurde.

Herstellung kompetenter Hefezellen

200 ml Vollmedium wurde aus Vorkulturen inokuliert (1:40) und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (5 min/ 1500 x g), mit Lösung A (1 M Sorbitol, 10 mM Bicine-KOH, pH 8,35, 3 % (v/v) Ethylenglykol) gewaschen und in 2 ml Lösung A resuspendiert und in 200 µl Aliquots bei - 80° C gelagert.

Transformation

Auf die gefrorenen Zellen wurden 5 µl 1 M Histamin, 50 µg Heringsperma-DNA und ca. 1 µg zu transformierender DNA in 10 µl Volumen gegeben. Nach 5 Minuten unter leichtem Schwenken bei 37° C wurde 1 ml Lösung B (40 % (w/v) Polyethylenglykol, 200 mM Bicine-KOH, pH 8,35) gegeben und der Ansatz eine Stunde bei 30° C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, mit Puffer C (10 mM Bicine-KOH, pH 8,35, 0,15 M NaCl) gewaschen und in 100 µl Puffer C resuspendiert und auf Selektionsmedien ausplattiert.

3.8.20 Physiologische Charakterisierung transformierter *S. cerevisiae*-Linien

Mit diesen Experimenten wurde das Wachstumsverhalten von wildtypartigen und *psd2*-defizienten Hefelinien untersucht, die mit verschiedenen Konstrukten transformiert worden waren. Dabei wurde das Wachstum bei verschiedenen Temperaturen auf glucosehaltigen, ethanolamin- und cholin-freien Medien nach Storey *et al.* (2001) und auf Milchsäure-Medien nach Birner *et al.* (2001) untersucht. Da die Expression des Hefevektors pYes2 durch Glukose inhibiert wird, wurde das Experiment auch mit Galaktose-Medien durchgeführt. Galaktose aktiviert den Vektor; führte jedoch im Allgemeinen bei den hier verwendeten Hefe-Linien zu einem verlangsamten Wachstum. Der Hefevektor pDR196 ist dahingegen konstitutiv exprimierend.

Für den Wachstumstest auf Milchsäure wurden einzelne Kolonien auf den Milchsäureplatten ausgestrichen und bei 28° C inkubiert. Die Platten wurden innerhalb der folgenden vier Tage täglich visuell auf Wachstumsunterschiede überprüft.

Für den Wachstumstest in glucose-, bzw. galaktosehaltigen Selektionsmedien wurden 50 ml des Mediums aus Vorkulturen der zu testenden Linien inokuliert. Die Zellen wurden, sofern sie zuvor nicht mit dem gleichen Zucker angezogen worden waren, zuvor abzentrifugiert und kurz mit sterilem Wasser gewaschen. Die anfängliche optische Dichte wurde auf 0,02 OD₆₀₀ eingestellt. Die Kulturen wurden bei 37° C angezogen. Während der

Kultur wurde im Abstand von mehreren Stunden die optische Dichte der Kulturen bei 600 nm (Referenz: reines Nährmedium) gemessen.

3.8.21 Proteinüberexpression in *E. coli*

Zur gezielten Proteinüberexpression in *Escherichia coli* wurden induzierbare Expressionsvektoren verwendet, die das exprimierte Protein zusätzlich mit einem Ende aus Histidinmolekülen fusionieren (pQE-Vektoren, Qiagen, Hilden, D). Für die Expression werden die Konstrukte in M15-Zellen verwendet, die das Repressorplasmid pRep4 tragen. Der dort kodierte lac-Repressor blockiert weitgehend die Proteinexpression des eingeschleusten Plasmides. Erst durch die Zugabe von IPTG (Isopropylthio- β -D-Galactosid), das den Repressor bindet, wird die Proteinexpression gestartet. Die Kultur wurde aus einer Vorkultur 1:100 inokuliert und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4 kultiviert. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von IPTG (1:1000 einer 1 M Stammlösung) und die Zellen wurden weiter bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8 kultiviert.

3.8.22 Aufreinigung Histidin-markierter Proteine mittels Nickelsäulen-chromatographie

Für die Anreicherung und Aufreinigung des überexprimierten, Histidin-markierten Proteins kann es über das Histidinende an Nickel-Nitriloessigsäure-Agarosematrix gebunden und gewaschen werden. Die Aufreinigung erfolgte hier unter nativen Bedingungen bei denen das Protein funktionell erhalten bleiben sollte. Die Elution erfolgte mit hohen Imidazol-Konzentrationen, die die Nickel-Histidin-Bindung schwächen. Als alternative Methode wurde nach Müller und Frentzen (2001) die Elution mit EDTA-haltigen Puffern getestet, bei denen der starke Komplexbildner das Protein samt dem Nickelion verdrängt. Diese Methode erforderte eine anschließende Regeneration der Säule.

Die transformierten Zelllinien wurden wie zuvor beschrieben angezogen und die Proteinexpression durch IPTG-Zugabe induziert (siehe 3.8.21). Der Proteinextrakt wurde nach 3.8.26 hergestellt, wobei mit tritonhaltigem Extraktionspuffer (100 mM K_xH_xPO₄Puffer, pH 7; 0,1 bis 1 % Triton) gearbeitet wurde. Nach dem Abzentrifugieren (6000 x g, 20 Minuten) wurde der Überstand auf die mit Säulenpuffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 7,4; 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 10 % Glycerol, 2 % Triton X-100; pH 8) equilibrierte Säule gegeben. Nach dem mehrmaligen Waschen (50 mM NaH₂PO₄, pH 7,4; 300 mM NaCl, 30 mM Imidazol, 10 % Glycerol, 2 % Triton X-100; pH 8) wurde mit Elutionspuffer eluiert (50 mM NaH₂PO₄, pH 7,4; 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, 10 % Glycerol, 2 % Triton X-100; pH 8). Für die komplette Elution nach Müller und Frentzen (2001) wurde alternativ auch EDTA-Puffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 7,4; 300 mM NaCl, 100 mM EDTA, 10 % Glycerol, 2 % Triton X-100; pH 8) verwendet. Einzelne Wasch- und Elutionsschritte wurden anschließend über Proteingele (siehe 3.8.24) und über PSD-Enzymtests (siehe 3.8.26) untersucht. Bei totaler Elution mit EDTA-Puffer wurde das Eluat vor dem Enzymtest in 10000 Da Dialysshläuchen mit 2 Liter Dialysepuffer (100 mM K_xH_xPO₄Puffer, pH 7; 1 % Triton, 10 % Glycerol) zur Senkung des EDTA-Gehaltes dialysiert.

3.8.23 Proteinbestimmung nach Bradford

Für die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) wurde für jede Messreihe wurde eine Eichgerade mit einer BSA-Stammlösung (1 μ g/ μ l) angefertigt. Da Triton X-100 bereits in geringen Mengen zu Störungen bei der Bestimmung führte, wurde die Proteinextraktion bis zur Quantifizierung ohne Tritonzugabe durchgeführt. Das Protein wurde in 800 μ l Wasser mit dem Reagenz (BioRad Protein Assay, BioRad, Hercules, USA) versetzt und nach 15 min bei 595 nm (Referenz: Wasser + Reagenz) vermessen. Die Berechnung des Proteingehaltes erfolgte über die Geradengleichung der Eichreihe.

3.8.24 Protein-Gelelektrophorese

Bei der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese nach Ornstein (1964), Davis (1964) und Lämmli (1970) werden die durch chemische (SDS, β -Mercaptoethanol) und thermische (Erhitzen auf 95 °C) Maßnahmen denaturierten Proteine nach ihrer Masse aufgetrennt.

12 % Trenngel

- 40 ml Acrylamidlösung (30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid)
- 25 ml Trenngelpuffer (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)
- 1 ml 10 % SDS
- 33,4 ml Wasser
- 40 μ l TEMED (1,2-Bis-Dimethylaminoethan)
- 600 μ l Ammoniumpersulfat (100 mg/ml)

4 % Sammelgel

- 5,32 ml Acrylamidlösung (30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid)
- 10 ml Sammelgelpuffer (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8)
- 0,4 ml 10 % SDS
- 24 ml Wasser
- 20 μ l TEMED (1,2-Bis-Dimethylaminoethan)
- 400 μ l Ammoniumpersulfat (100 mg/ml)

Das Proteingel wurde in der vertikalen Proteingelkammer (BioRad, Hercules, USA) fixiert und mit Laufpuffer (125 mM Tris, 960 mM Glycin, 0,5 % (w/v) SDS) geflutet. Die Proteinextrakte (entweder mittels Ultraschall aufgebrochene Zellen oder Eluate während der Proteinaufreinigung) wurden mit 4 x Ladepuffer, pH 6,8 (125 mM Tris, 4 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerol, 20 μ g/ml Bromphenolblau, 10 % (v/v) β -Mercaptoethanol) versetzt. Nach der Denaturierung bei 95 °C wurde kurz zentrifugiert und der Überstand in die zuvor mit Puffer gespülten Geltaschen gefüllt. Der Gellauf erfolgte bei 40 mA. Nach der Trennung wurde das Trenngel entweder für den Protein-Blot verwendet oder gefärbt. Dazu wurde es in Coomassiefärbelösung (0,1 % Coomassie Brillant Blau R-250, 20 % Methanol, 0,5 % Essigsäure) und anschließend in Entfärbelösung (5 % Glycerol, 7,5 % Essigsäure) aufgekocht.

3.8.25 Protein-Blot („Western Blot“) und Immunodetektion

Analog zum „Northern“ und „Southern Blot“ (siehe 3.8.10 und 3.8.11) werden hier Proteine aus dem Proteingel auf eine Membran transferiert. Hier wandern die positiv geladenen Proteine jedoch in einem Gleichstromfeld. Als Membran wurde eine Nitrocellulose-Matrix (Millipore, Billerica, USA) verwendet. Der Transfer erfolgte in der Blot-Apparatur (BioRad, Hercules, USA) zwischen 6 Filterpapierstreifen, die in Towbin-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol, 0,1 % SDS) getränkt waren. Nach 60 Minuten Transfer bei 15 V wurde die Membran der Immunodetektion (siehe 3.8.25) unterworfen.

Zur Detektion wird ein Antikörper eingesetzt, der an einer spezifischen Stelle des Proteins bindet (hier gegen das durch den pQE-Vektor angehangene Proteinende aus Histidin). Ein zweiter Antikörper, der an alkalische Phosphatase gebunden ist, bindet hochaffin an den ersten Antikörper. Die anschließende Detektion nutzt die Phosphatase zum eigentlichen, optischen Nachweis. Diese setzt aus einem Substrat/Chromogengemisch aus 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphat (BCIP) und Nitro Blue Tetrazolium Chlorid (NBT) ein blaues Präzipitat frei, das die vom 1. Antikörper detektierte Proteinbande anzeigt. Die Membran wurde mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur in TBS-Block-Lösung gewaschen (10 mM Tris, pH 7,4; 0,9 % NaCl, 1 % BSA) und anschließend der 1. Antikörper zugegeben (1:1000 von 0,2 mg/ml Stammlösung). Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Membran mit Wasser abgespült und drei Mal für jeweils 10 bis 15 Minuten in TBSTXS-Puffer (10 mM Tris, pH 7,4; 0,9 % NaCl, 0,1 % Triton X-100, 0,05 % SDS, 0,1 % BSA) gewaschen. Nach zehnminütiger Inkubation in TBS-Block-Lösung wurde der 2.

Antikörper (1:2000 von 1 mg/ml Stammlösung) zugegeben und eine Stunde inkubiert. Die drei Waschschrte wurden wie zuvor wiederholt. Zur Farbentwicklung wurde eine Tablette BCIP/NBT in 10 ml Wasser gelöst und zu der Membran gegeben. Die Farbentwicklung wurde durch Wässerung gestoppt.

3.8.26 PSD-Enzymtest mit *E. coli*

Der hier durchgeführte Test, modifiziert nach Dowhan *et al.* (1974) wurde 1,2,-dioleoyl-L-3-Phosphatidyl-L-[3-¹⁴C]serin der Fa. Amersham/Pharmacia (Buckinghamshire, GB) mit einer spezifischen Radioaktivität von 1,85 bis 2,29 GBq/mmol als Substrat verwendet.

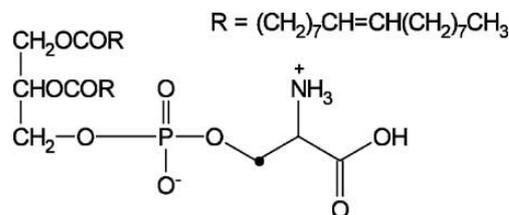


Abb. 7: **1,2,-dioleoyl-L-3-Phosphatidyl-L-[3-¹⁴C]serin**. Bei dem markierten (●) Kohlenstoffatom handelt es sich um ¹⁴C.

Bei dem so markierten Substrat wird in Abweichung zu dem bisher üblichen Enzymtest (Dowhan *et al.*, 1974) bei der durch die Phosphatidylserin Decarboxylase katalysierten Reaktion



nicht das Produkt Kohlendioxid, sondern stattdessen Phosphatidylethanolamin radioaktiv markiert. Durch eine an den Enzymtest anschließende Lipidextraktion und dünnschichtchromatographische Auftrennung der Lipide läßt sich die Verteilung der Radioaktivität zwischen dem Edukt und dem Produkt über das Auflegen eines Röntgenfilmes oder über den Phosphor Imager untersuchen. Das Substrat wird unter Zugabe eines Detergenz (Triton X-100) solubilisiert und damit dem Enzym zugänglich gemacht. Durch die Zugabe von nicht-radioaktivem Phosphatidylserin (zehnfacher Überschuß) wurden substratersetzende Oxidationsprozesse, die sonst während der Solubilisierung ablaufen und die in zusätzlichen, radioaktiven Banden resultieren, minimiert. Die zu untersuchende Phosphatidylserin Decarboxylase wird über eine Proteinextraktion unter nativen Bedingungen gewonnen.

Die Zellen wurden wie bereits beschrieben angezogen und induziert (siehe Proteinexpression unter 3.8.21). Die Zellen wurden abzentrifugiert und in 100 mM K_xH_xPO₄ Puffer, pH 7 gewaschen und in einem geringen Volumen resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen durch 3 x 10 sec. Ultraschallbehandlung (auf Eis) lysiert. Je nach experimenteller Planung wurde eine Proteinaufreinigung über eine Ni-NTA-Säule (siehe 3.8.22) oder direkt der Enzymtest durchgeführt. Der Proteingehalt des Proteinextraktes, bzw. des zu testenden Eluates wurde nach Bradford (siehe 3.8.23) bestimmt und das einzusetzende Volumen berechnet (zwischen 0,01 bis 80 µg je nach Experiment).

Je Ansatz wurden 0,05 µCi (130 ng) des Substrates 1,2,-dioleoyl-L-3-Phosphatidyl-L-[3-¹⁴C]serin mit 1,3 µg Posphatidylserin gemischt und in Glasröhrchen vorgelegt. Das Lösungsmittel wurde im Stickstoffstrom vollständig entfernt. Nach der Zugabe von 50 bis 100 µl 50 mM Tris-HCl / 0,1 % (v/v) Triton X-100 wurde das Substrat durch eine zehnminütige Behandlung mit Ultraschall solubilisiert. Der Test wurde bei 30° C im Wasserbad durchgeführt. Dazu wurde der Proteinextrakt zu dem Substrat gegeben, kurz gemischt und für 30 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von ½ Volumen 0,2 M H₃PO₄/1 M KCl und 1 Volumen Chloroform/Methanol (2:1) gestoppt. Nach der Phasentrennung durch kurze Zentrifugation wurde die untere Phase abgenommen und

aufbewahrt. Die obere Phase wurde erneut mit Chloroform/Methanol (2:1) extrahiert und die unteren Phasen vereinigt. Das Lösungsmittel wurde im N₂-Strom vollständig entfernt und die Lipide in 50 µl Chloroform/Methanol (2:1) aufgenommen. Anschließend wurde eine eindimensionale Dünnschichtchromatographie (nach Dörmann *et al.*, 1995, oder Hawrot und Kennedy, 1975; siehe 3.8.29) mit anschließender Detektion über einen Röntgenfilm (Exposition bei Raumtemperatur ohne Verstärkerschirm für ca. 3 Tage) durchgeführt.

3.8.27 PSD-Enzymtest mit *A. thaliana*

Die Grundlagen des PSD-Enzymtestes wurden bereits beschrieben (siehe 3.8.26). Das Verfahren zur Proteinextraktion und zum Test bei pflanzlicher PSD orientierte sich an der Arbeit von Marshall und Kates (1973). Von den zu testenden Linien wurden Blätter geerntet (ca. 0,5 g Gewebe je Testansatz), bei 4° C mit Sand und Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7) gemörsert und anschließend bei 1200 x g für eine Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 100000 x g für 1 Stunde (4° C) erneut zentrifugiert und das Pellet in bis zu 500 µl Tris-HCl-Puffer resuspendiert. Zur Quantifizierung der Proteine (siehe 1.2.18) wurde eine 1:10 Verdünnung verwendet. Für den Enzymtest nach Marshall und Kates (1973) wurden 1 mg Gesamtprotein in bis zu 200 µl Volumen eingesetzt. Je Ansatz wurden 0,05 µCi (130 ng) des Substrates 1,2,-dioleoyl-L-3-Phosphatidyl-L-[3-¹⁴C]serin mit 1,3 µg Phosphatidylserin gemischt und in Glasröhrchen vorgelegt. Das Lösungsmittel wurde im Stickstoffstrom vollständig entfernt. Nach der Zugabe von 50 bis 100 µl 50 mM Tris-HCl / 0,1 % (v/v) Triton X-100 wurde das Substrat durch eine zehnmütige Behandlung mit Ultraschall solubilisiert. Der Test wurde bei 30° C im Wasserbad durchgeführt. Dazu wurde der Proteinextrakt zu dem Substrat gegeben, kurz gemischt und je nach Versuchsplanung zwischen 5 bis 60 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von ½ Volumen 0,2 M H₃PO₄/ 1 M KCl und 1 Volumen Chloroform/ Methanol (2:1) gestoppt. Nach der Phasentrennung durch kurze Zentrifugation wurde die untere Phase abgenommen und aufbewahrt. Die obere Phase wurde erneut mit Chloroform/Methanol (2:1) extrahiert und die unteren Phasen vereinigt. Das Lösungsmittel wurde im N₂-Strom vollständig entfernt und die Lipide in 50µl Chloroform/ Methanol (2:1) aufgenommen. Anschließend wurde eine eindimensionale Dünnschichtchromatographie (nach Hawrot und Kennedy, 1975; siehe 3.8.29) mit anschließender Detektion über den Phosphorimager durchgeführt.

3.8.28 Lipidextraktion von *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Arabidopsis thaliana*

Für die Lipidextraktion von Zellkulturen von *Escherichia coli* wurden die Zellen abzentrifugiert (3 min bei 6000 x g) und das Volumen des Zellpellets abgeschätzt. Nach der Zugabe von 1 Volumen Methanol/ Chloroform (1:1) und ½ Volumen 1 M KCl/ 0,2 M H₃PO₄ wurde gründlich gemischt und die Phasen anschließend bei 20000 x g zentrifugiert. Die untere, lipidhaltige Phase wurde entfernt und für die weitere Verwendung aufbewahrt. Die Lipidextraktion von Hefe wurde analog zu der aus *E. coli* durchgeführt. Aufgrund der festen Zellwand war jedoch ein weitaus gründlicherer Zellaufschluß erforderlich. Dazu wurde das Zellpellet in flüssigen Stickstoff gefroren, in ½ Volumen 1 M KCl/ 0,2 M H₃PO₄ resuspendiert, erneut eingefroren und anschließend nach Zugabe von 1 Volumen Methanol/ Chloroform (1:1) und Glasperlen gründlich gemischt. Die nach der Zentrifugation bei 20000 x g erhaltene Interphase und wässrige Phase wurde erneut eingefroren und nach dem Auftauen mit 1 Volumen Methanol/ Chloroform (1:1) noch einmal extrahiert. Die lipidhaltigen Lösungsmittelphasen wurden für die weitere Verarbeitung vereinigt.

Für die Extraktion von Lipiden aus *A. thaliana* wurde das zu extrahierende Gewebe nach dem Ernten umgehend in flüssigem Stickstoff gefroren und tiefgefroren gemörsert. Das

Extraktionsmittel (1 Volumen Methanol/ Chloroform/ Ameisensäure (1:1:0,1) und ½ Volumen 1 M KCl/ 0,2 M H₃PO₄) wurde vorgelegt, wobei ca. 100 µl Lösungsmittel je 100 mg Gewebe angesetzt wurden. Das Gewebepulver wurde in das vorgelegte Extraktionsmittel überführt und gründlich gemischt. Nach der Zentrifugation bei 20000 x g wurden die Phasen getrennt. Bei großen Probenmengen wie für die zweidimensionale DC wurde der Überstand erneut mit 1 Volumen Methanol/ Chloroform/ Ameisensäure (1:1:0,1) extrahiert und die Lipidphasen vereinigt.

3.8.29 Eindimensionale Dünnschichtchromatographie von Phospholipiden

Die Chromatographie erfolgte in geeigneten Glastanks, die zur besseren Equilibrierung mit 20 x 20 cm großen Filterpapierstücken versehen waren. Es wurden fertig beschichtete Glasplatten (J.T. Baker, Philipsburg, USA) verwendet (mit Konzentrierungszone). Die extrahierten Lipide (siehe 3.8.28) wurden – je nach Menge – mit Kapillaren in 1 bis 1,5 cm langen Streifen in der Konzentrierungszone aufgetragen. Für die Auftrennung der polaren Lipide kamen zwei verschiedene Systeme zum Einsatz:

1. Methode nach Dörmann et al. (1995)

Die DC-Platte wurde kurz in 0,15 M (NH₄)₂SO₄ getaucht und für mindestens zwei Tage bei Raumtemperatur getrocknet. Vor der Verwendung wurde sie für 2 ½ Stunden auf 120° C erhitzt. Nach dem Probenauftrag erfolgte die Trennung der Lipide durch einstündigen Lauf in Aceton/Toluol/Wasser (91:30:8). Diese Methode wurde in späteren Versuchen durch folgendes Protokoll ersetzt:

2. Methode nach Hawrot und Kennedy (1975)

Nach dem Auftrag auf die unbehandelte DC-Platte erfolgte die Trennung der Lipide durch einstündigen Lauf in Chloroform/Methanol/Wasser (65:25:4). Die Platten wurden anschließend getrocknet und je nach weiterer Verwendung behandelt:

- Vollständige Jodfärbung: Für die vollständige und dauerhafte Jodfärbung aller Lipide wurden die Platten in einer mit Jodkristallen gefüllten Chromatographiekammer für 5 bis 10 Minuten gefärbt.
- Flüchtige Jodfärbung (Färbung für wenige Minuten)
- Nachweisreaktionen für einzelne Lipiden, bzw Lipidklassen (siehe 3.8.36)

3.8.30 Autoradiographie mit dem Phosphorimager

Diese Methode dient der besonders sensiblen und schnellen Detektion von Radioaktivität und stellt eine Alternative zu dem üblichen Nachweis mit Röntgenfilmen dar. Der Nachweis erfolgt über eine wiederverwendbare Platte, die anstelle des Films auf die Probe (z.B. DC-Platte) aufgelegt wird. Die DC-Platten wurden dazu nach dem Trocknen nicht mit Jod behandelt. Die Exposition der Phosphorimager-Platte erfolgte in der Regel über Nacht (ca. 16 Stunden). Nach dem Auslesen der Platte (BAS1500, Fuji, Otsu, J) wurde das erhaltene Bild zurechtgeschnitten und die Probenbezeichnungen zugeordnet. Für die Quantifizierung der schwarz dargestellten Banden wurde das Programm „TINA“ (Raytest, Straubenhardt, D) verwendet. Damit wurden geometrische Formen gleicher Größe verwendet, die als „Regionen“ über die Banden gelegt wurden. Die darin eingeschlossene Schwärzung (Pixeldichte) diente als Maß der photo-stimulierten Lumineszenz („PSL“) und damit als Maß der Radioaktivität. Die Hintergrundkorrektur erfolgte über eine weitere Region außerhalb des radioaktiv erzeugten Bandenabbildes. Durch das Gruppieren der Regionen konnte die prozentuale Verteilung der eingesetzten Radioaktivität auf die einzelnen Banden ermittelt werden. Diese Methode wurde nicht für die absolute Quantifizierung eingesetzt.

3.8.31 Quantitative Analyse mit dem Szintillationszähler

Zur genauen Quantifizierung des Substrates 1,2,-dioleoyl-L-3-Phosphatidyl-L-[3-¹⁴C]serin wurde 1 µl in 4 ml im Szintillationsgefäß vorgelegten Szintillationscocktail (ReadySafe™, Beckmann-Coulter, Fullerton, USA) pipettiert, gründlich gemischt und nach 30 Minuten Standzeit für 3 Minuten im Szintillationszähler (LS6500 Multi-Purpose Szintillator, Beckmann-Coulter, Fullerton, USA) vermessen. Zur Bestimmung des absoluten Umsatzes beim Enzymtest pflanzlicher PSD wurden die nach verschiedenen Zeiten abgestoppten Reaktionen und ihre über DC aufgetrennten Produkte mit dem Szintillationszähler quantifiziert, indem sie aus der Platte ausgekratzt und samt dem Trägermaterial in den Szintillationscocktail gegeben wurden. Nach gründlichem Mischen wurden die Ansätze vermessen.

3.8.32 Anzucht und Kreuzung von *Arabidopsis thaliana*

Vor der Aussaat wurden die Samen sterilisiert. Dazu wurde eine Spatelspitze Samen unter Mischen für bis zu 15 Minuten in 5 % (v/v) Natriumhypochlorid/ 0,1 % (v/v) Triton X-100 sterilisiert. Die Samen wurden kurz abzentrifugiert und unter der Sterilbank dreimal mit sterilem Wasser gewaschen. Anschließend wurden sie in 0,1 % (w/v) steriler Agarose resuspendiert und gleichmäßig auf MS-Medienplatten (je nach Linie mit oder ohne Antibiotika) verteilt. Nach einer Nacht bei 4° C wurden sie zum Keimen für 12-14 Tage bei 22° C (16 h Tageslänge) im Phytotron verwahrt. Für das weitere Wachstum wurden Töpfe (Ø 6 cm) mit Arabidopsis-Erde (Vermiculit und Gartenerde 1:1) gefüllt. Für die gründliche Durchfeuchtung wurden die Töpfe für mindestens 15 min in mit Wasser (mit 0,15 % (v/v) Previcur, Bayer, Laverkusen, D) gefüllten Kulturschalen gestellt. Anschließend wurden die Keimlinge vorsichtig mit Pinzetten in die Erde überführt (eine Pflanze pro Topf). Die Kulturschalen wurden für das weitere Wachstum in das Gewächshaus oder (bei Verwendung der Pflanzen für physiologische Untersuchungen) in das Phytotron (Tag: 16 h, 20°C, 60 % Luftfeuchte, 120 µmol Licht; Nacht: 16°C, 75 % Luftfeuchte) gestellt. Sie blieben für bis zu 3 Tagen mit Klarsichthauben abgedeckt. Die Wässerung erfolgte täglich. Etwa 55 Tage nach der Keimung zeigten die Pflanzen deutliche Seneszenz (gelb verfärbte Blätter und Schoten, Öffnen der untersten Schoten, Einstellen der Blüte). Zu diesem Zeitpunkt wurde über die oberirdischen Pflanzenteile lichtdurchlässige Papiertüten gestülpt und unten zusammengebunden. Die Pflanzen wurden für weitere 14 Tage gewässert. Nach zwei weiteren Wochen hatten sich die Samen in den Tüten gesammelt. Die Samen wurden in Gläschen überführt, für eine Woche im Exsiccator getrocknet und anschließend bis zur Aussaat bei 4° C gelagert. Für die Kreuzung wurden von der zu befruchtenden („mütterlichen“) Pflanze alle Triebe bis auf einen entfernt. Von diesem wurden bis auf eine apikale, ungeöffneten Blütenknospe alle Schoten und Blüten abgeschnitten. Von der verbleibenden Knospe wurden alle Sepalen und Petalen mit feinen Pinzetten entfernt und das Gynoeceum freigelegt. Von einer jungen Blüte der pollenspendenden („väterlichen“) Pflanze wurden einige Stamina entnommen und der Pollen auf die Narbe getupft. Anschließend wurde die Knospe zum Schutz vor Austrocknung mit etwas Klarsichtfolie umhüllt und der Sproß markiert. Innerhalb von 4 bis 7 Tagen war der Erfolg der Kreuzung an der beginnenden Schotenbildung erkennbar.

3.8.33 Segregationsanalyse

Mit diesem Experiment sollten die isolierten T-DNA-Insertionsmutanten von *Arabidopsis thaliana* auf das Vorliegen möglicher Hintergrundmutationen durch mehrfache Inserierung der T-DNA untersucht werden. Werden die Samen der für die T-DNA heterozygoten Pflanzen auf Kanamycin-Medien zum Keimen gebracht, so ist nach dem 2. Mendel'schen Gesetz eine Aufspaltung (Segregation) im Verhältnis 1:2:1 zu erwarten. Es wurden je Linie sechs Ansätze mit je 50 Samen abgezählt und wie unter 3.8.32 beschrieben sterilisiert und auf 3 Medienplatten mit Kanamycin und 3 antibiotikafreie Medienplatten gleichmäßig

ausgebracht. Nach 10 Tagen Keimungsdauer unter den üblichen Bedingungen wurde die Keimungsrate für jede Platte ermittelt. Hierbei wurden alle grünen, vitalen Keimlinge als „Keimung“ gewertet; alle abgestorbenen, verblassten Keimlinge und unverändert gebliebene Samen als „keine Keimung“ gewertet. Die Ansätze auf dem antibiotikafreien Medium dienten der Überprüfung der normalen Keimungsrate, d.h. der Vitalität der Samen und diente dazu, Verfälschungen des Ergebnisses durch mangelnde Vitalität des Saatgutes auszuschließen.

3.8.34 Physiologische Charakterisierung der isolierten Insertionsmutanten von *Arabidopsis thaliana*

Diese Untersuchungen hatten zum Ziel, die isolierten T-DNA-Insertionsmutanten von *Arabidopsis thaliana* zu charakterisieren und eventuell vorhandene und physiologisch manifestierte Unterschiede zu Wildtyppflanzen zu erkennen und zu erfassen.

Dazu wurden 100 Samen der Mutanten und des Wildtyps wie beschrieben sterilisiert und gleichmäßig auf MS-Platten ausgebracht (siehe 3.8.32). Nach 14 Tagen Keimung wurden 70 Pflänzchen in Erde umgetopft und in der Wachstumskammer unter definierten Kulturbedingungen weiter gepflegt. Eine Woche später wurde mit der Aufnahme der Wachstumskurve begonnen. Dazu wurden 6 Pflanzen je Linie direkt über der Erde abgeschnitten und einzeln auf der Analysenwaage gewogen. Diese Messung wurde alle 3 bis 5 Tage durchgeführt. Die letzte Messung wurde am 58. Tag durchgeführt. Für die Auswertung wurden die Ergebnisse gemittelt und die Standardabweichung errechnet. Zur Bestimmung des Blühzeitpunktes nach Reeves *et al.*, 2001, wurden zum Zeitpunkt der ersten geöffneten Blüte alle Rosettenblätter der betroffenen Pflanze gezählt. Hierbei wurden nur Blätter berücksichtigt, deren Länge >0,5 cm betrug. Pro Linie wurden mindestens 8 Werte ermittelt.

3.8.35 Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie

Für die zweidimensionale Dünnschichtchromatographie nach Benning *et al.* (1995) wurden aus ca. 300 mg Blattmaterial von *Arabidopsis thaliana* Lipide extrahiert (siehe 3.8.28) und nach dem Einengen in 50 µl Chloroform/Methanol (2:1) aufgenommen. Die DC-Platten wurden vor der Verwendung für 15 min bei 120° C getrocknet. Der Probenauftrag auf der DC-Platte erfolgt an einer Ecke, jeweils 2 cm vom linken und unteren Rand entfernt. Beim Probenauftrag wurde auf eine möglichst kleine Auftragsfläche geachtet. Nach dem Lauf im ersten Laufmittelgemisch wurde die Platte vollständig getrocknet. Anschließend wurde sie um 90° gedreht in das 2. Laufmittelgemisch gestellt.

1. Laufmittel: Chloroform/Methanol/Wasser (65:25:4)

2. Laufmittel: Chloroform/Aceton/Methanol/Eisessig/Wasser (50:20:10:10:5)

Nach dem Lauf wurde die DC-Platte getrocknet. Für die Durchführung von Nachweisreaktionen wurden die Lipide nur kurz und flüchtig mit Jod angefärbt (mittels einer an den Stickstoffstrom angeschlossenen und mit Glaswolle und Jodkristallen gefüllten Pasteurpipette). Die Lipidflecken wurden mit einem weichen Bleistift markiert.

3.8.36 Nachweisreaktionen zur Identifizierung von Phospho- und Galactolipiden

Ninhydrin reagiert mit freien, primären Aminogruppen und eignet sich für den Nachweis von Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin. Die zu behandelnde DC-Platte wurde kurz mit Jod gefärbt und die sich anfärbenden Lipide mit einem weichen Bleistift markiert. Nach dem Verflüchtigen des Jods wurde die DC-Platte großflächig mit Ninhydrinlösung (0,25 % (w/v) Ninhydrin in Aceton) besprüht. Nach dem Verdunsten des Lösungsmittels wurde die Platte zur Entwicklung für ca. 5 Minuten bei 120° C gebacken. Schwefelsaure α -Naphthol-Lösung reagiert mit Oligo- und Polysacchariden und bildet einen dunkelroten bis fast schwarzen Farbstoff. Diese Reaktion eignet sich zum Nachweis von Glykolipiden wie Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) und Digalactosyldiacylglycerol (DGDG). Die zu

behandelnde DC-Platte wurde kurz mit Jod gefärbt und Lipide mit einem weichen Bleistift markiert. Nach dem Verflüchtigen des Jods wurde die DC-Platte großflächig mit α -Naphthol-Lösung (2,4 % (w/v) α -Naphthol in 10 % (v/v) H₂SO₄, 80 % (v/v) Ethanol) besprüht. Nach dem Verdunsten des Lösungsmittels wurde die Platte zur Entwicklung für ca. 10 bis 15 Minuten bei 120° C gebacken.

3.8.37 Gaschromatographie

Umwandlung in freie Fettsäuremethylester (FAME) durch saure Methanolyse

Für jedes zu analysierendes Lipid wurde ein Glasröhrchen mit 1 ml 1 N HCl (in Methanol) versehen. Als interner Standard für den Gaschromatographen wurden 5 μ g Pentadecansäure (15:0) zugegeben. Nach Auftrennung und Identifizierung der pflanzlichen Phospholipide mittels zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie (siehe 3.8.35) wurde das Trägermaterial mit den zu analysierenden Lipiden mit einer scharfen Klinge abgekratzt und über einen Trichter in die Glasröhrchen mit der vorgelegten methanolischen Salzsäure gegeben. Die Röhrchen wurden 20 min bei 80° C im Wasserbad inkubiert. Zur Bestimmung des Gesamtfettsäuremusters wurde in flüssigem Stickstoff schockgefrorenes und gemörsertes *Arabidopsis thaliana*-Blattgewebe verwendet. Eine Spatelspitze des Gewebes wurde zu der vorgelegten methanolischen Salzsäure gegeben und die verschlossenen Ansätze anschließend 40 min bei 80° C im Wasserbad inkubiert. Nach dem Abkühlen der Proben wurden je 1 ml 0,9 % (w/v) NaCl-Lösung und 1 ml Hexan zugegeben, gemischt und 3 min bei 1000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit N₂ auf ca. 100 μ l eingeeengt und in Probenröhrchen für den Gaschromatographen überführt und verschlossen.

Gaschromatographie

Die Proben wurden automatisch durch den Gaschromatographen vermessen und analysiert. Die Detektion der in leicht flüchtige Fettsäuremethylester umgewandelten Fettsäuren erfolgte über einen Flammenionisationsdetektor.

Programmeinstellungen:

Modus der Probeninjektion:	splitless		
Druck:	18,4 kPa		
Purge flow:	92,5 ml/min		
Purge time:	0,75 min		
Gas:	Helium		
Säule:	Supelco SP-2330 Capillary Column (Länge: 30 m)		
Durchmesser:	750 μ m		
Dauer eines Probenlaufes:	18,20 Minuten		
Rampenzeiten:	Stufe	Rate	Finale Temperatur
	1	25	160°
	2	10	220°
	3	25	100°

3.8.38 Transiente Transformation von *Arabidopsis thaliana* mittels Partikelbeschuß

Das Funktionsprinzip zum Einschleusen von DNA in lebende Zellen mittels Partikelbeschuß wurde 1987 erstmals vorgestellt (Sanford *et al.*, 1987; Klein *et al.*, 1987). Das Prinzip besteht darin, die zu transformierende DNA an Wolfram- oder Goldpartikel (sog. „Microcarrier“, 1 – 1,6 μ m Durchmesser) zu binden. Diese Partikel werden über ein sich im Vakuum schlagartig entfaltendes Gasvolumen stark und gerichtet beschleunigt. Die Partikel dringen in die Zellen, bzw. das zu transformierende Gewebe ein und transportieren dabei die DNA in die Zellen. Die Methode erlaubt die unter anderem die Transformation einzelner Zellorganellen wie z.B. Chloroplasten (Boynton *et al.*, 1988) oder

Hefe-Mitochondrien (Johnston *et al.*, 1988), sowie die Transformation von zahlreichen monokotylen Nutzpflanzen wie Gerste (Ritala, 1994) bei denen die herkömmliche Methode über *Agrobacterium tumefaciens* keine oder nur geringe Transformationsraten liefert. Mit dieser Methode wurden epidermale Blattzellen von *Arabidopsis thaliana* transformiert. Es wurden GFP-Fusionskonstrukte der untersuchten Gene (*PSD1*, *PSD2*, *PSD3*), sowie diverse GFP-Positivkontrollen mit bekannter Lokalisierung untersucht. Es wurden Gold-Microcarrier (1 µm) verwendet und diese gemäß Sanford *et al.* (1993) gewaschen, in 50 % (v/v) Glycerol aufgenommen und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Für die Transformation wurden je Ansatz 3 mg Microcarrier (50 µl) wie folgt vorbereitet: Unter ständigem Mischen der Microcarrier wurden

- 2,5 bis 5 µg DNA (gelöst in maximal 10 µl Wasser)
- 50 µl 2,5 M CaCl₂
- 20 µl 0,1 M Spermidin

zugegeben und diese nach weiterem Mischen und kurzem Sedimentieren für 4 Sekunden abzentrifugiert (< 4000 x g). Nach Entfernen des Überstandes wurden die Microcarrier einmal mit 70 % (v/v) und zweimal mit reinem Ethanol gewaschen ohne sie dazu zu resuspendieren. Sie wurden dann vorsichtig in 48 µl reinem Ethanol resuspendiert. Zur Transformation wurden 6 µl der Microcarrier-Resuspension schnell und mittig auf dem zuvor mit Isopropanol sterilisierten Macrocarrier verteilt. Zum gleichmäßigen Verdunsten des Ethanols ohne Agglutination der Microcarrier wurden die Macrocarrier in einem geschlossenen Gefäß über CaCl₂ erschütterungsfrei getrocknet. Um epidermale Blattzellen von *Arabidopsis thaliana* transient zu transformieren, wurden etwa 3 Wochen alte Wildtyp-Pflanzen des Ökotyps C-24 verwendet. Diese Linie zeichnet sich durch nur schwach ausgeprägte Blattnervatur aus, was für die spätere Mikroskopie vorteilhaft ist. Die Maschine (Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System, BioRad, Hercules, USA) wurde gemäß Gerätebeschreibung desinfiziert und vorbereitet. Es wurde je Transformationsansatz drei mittelgroße, glatte Rosettenblätter abgeschnitten und mittig auf der Probenebene angeordnet.

Folgende Einstellungen wurden gewählt:

Stärke der Berstscheibe:	450 psi
Abstand Macrocarrier – Probe:	6,5 cm
Unterdruck zum Zeitpunkt des Berstens:	27 inch Hg

Nach der Transformation wurde die Kammer belüftet und die Blättchen in Petrischalen überführt, die zuvor mit passenden Rundfiltern versehen worden waren. Die Filter wurden mit Wasser befeuchtet und die Blättchen vorsichtig angedrückt. Die Petrischalen wurden mit luftdurchlässigem Klebeband verschlossen und zwischen 24 bis 48 Stunden an einem dunklen Ort verwahrt.

3.8.39 Konfokale Laserscanning Mikroskopie

Diese Mikroskopie wird u.a. für die Detektion fluoreszierender Fusionsproteine (z.B. zwischen dem zu lokalisierenden Protein und dem „Grün Fluoreszierenden Protein“ GFP) auf zellulärer Ebene verwendet. Über einen Laser wird monochromatisches Licht mit der entsprechenden Wellenlänge (Absorptionsmaximum des fluoreszierenden Proteins) über einen dichroischen Spiegel auf die Probe gelenkt. Das von dem Protein emittierte, längerwellige Licht wird von dem dichroischen Spiegel hindurchgelassen und kann über einen Detektor zu digitalen Bildinformationen verarbeitet werden. In Kombination mit der konfokalen Mikroskopie ist die Fokussierung auf eine einzige Schnittebene der Probe möglich. Durch das Einsetzen zweier Lochblenden vor und nach der Probe wird das Licht auf eine Ebene der Probe fokussiert und Streulicht aus anderen Schnittebenen herausgefiltert. Durch das computergesteuerte Abtasten der Probe mit dem Laser wird

eine Vielzahl von Schnittbildern erzeugt, die anschließend zu einem dreidimensionalen Verteilungsmuster des GFP-markierten Proteins zusammengesetzt werden können. Die mittels Partikelbeschuss transformierten *Arabidopsis*-Blätter (siehe 3.8.38) wurden nach mit einem scharfen Skalpell zurechtgeschnitten. Dabei wurde der Blattstiel großzügig entfernt um die Probendicke zu verringern. Das Blatt wurde mit etwas Wasser und einem Deckglässchen auf einem Objektträger fixiert und anschließend mikroskopisch (TCS SP2, Leica, Solms, D) untersucht. Transformierte und exprimierende Zellen wurden unter UV-Licht anhand ihrer intensiven grünen Fluoreszenz identifiziert. Die Wellenlängenbereiche der Kanäle PMT1 (GFP-Fluoreszenz, grün) und PMT2 (Chloroplasten-Fluoreszenz, rot) wurden so klein wie möglich gewählt, um die Spezifität des Signals zu erhöhen. Da die untersuchten Blattepidermiszellen keine Chloroplasten enthielten, diente PMT2 und das Transmissionsbild vor allem der Orientierung beim Fokussieren der korrekten Gewebeebene. Vor Beginn der Aufnahmen wurden Kontrast und Rauschunterdrückung bei der jeweiligen Geräteeinstellung für alle drei Kanäle (PMT1, PMT2, Transmissionsbild) optimiert. Dadurch wurde die Unterscheidung von exprimierenden Transformanten und abgestorbener, ebenfalls grün fluoreszierender Zellen sicher möglich. Von den exprimierenden Zellen wurden bei 200facher Vergrößerung Aufnahmeserien durch die verschiedenen Schnittebenen aufgenommen. Je nach Lage und Dicke der exprimierenden Zelle wurde die gesamte Zelle mit 30 bis 50 Aufnahmen in der z-Achse dokumentiert. Durch die zwei- bis vierfache Abtastung einer Schnittebene wurde der Hintergrund weitgehendst reduziert. Von jedem Transformationsansatz wurden jeweils mehrere exprimierende Zellen gesucht und dokumentiert. Über die Bildbearbeitungssoftware der Anlage wurden die Bilderserien zu jeweils einer Aufnahme zusammengeführt.

Aufnahmeparameter:

Vergrößerung:	200 x
Anregung:	488 nm (Ar/He/Ne-Laser) bei 20-50 % Leistung
PMT1:	518-524 nm (GFP-Fluoreszenz, grün)
PMT2:	680-690 nm (Chloroplasten-Fluoreszenz, rot)
Lochblende:	1 Airy (Einstellung, bei der 95 % des fokussierten Lichtes den Detektor erreicht)
Geschwindigkeit der Abtastung:	400 Hz
Durchgänge (bei Serienaufnahmen):	2 - 4 x (je nach Zahl der Aufnahmen)
Filter:	RSP 500
Format:	512 x 512 px