

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und sonstige Materialien

L-Adenin Hemisulfat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Agar	Roth (Karlsruhe)
Agarose (SeaCem)	BMA (Rockland, USA)
$\epsilon$ -Amino-n-caproic acid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth (Karlsruhe)
L-Arginin-HCl	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Bacto Proteose Peptone Nr.3	Difco (Sparks, USA)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Calciumchlorid-2 hydrat	Riedel-deHaien (Seelze)
Casein Hydrolysat (Bactotrypton)	Roth (Karlsruhe)
Chromatographie Papier Chr 1 MM und 3MM	Whatman (Maidstone, GB)
Coomassie Brillant Blue R250	Serva (Heidelberg)
Cumarsäure (4-Hydroxy-zimtsäure)	Merck (Darmstadt)
Dimethyl Pyrocarbonat (DMPC)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth (Karlsruhe)
dNTP Mix (je 2 mM)	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)
EDTA	Merck (Darmstadt)
Eisessig	Merck (Darmstadt)
Elektroporationsküvetten, 1mm, 2mm	Biorad (München)
Essigsäure	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Fertiglösung für Proteintest nach Bradford	Biorad (München)
Formaldehyd	Roth (Karlsruhe)
Formamid	Roth (Karlsruhe)
Glucose-Monohydrat	Merck (Darmstadt)
Glycerol	Roth (Dramstadt)
Gossypol	Sigma (Deisenhofen)
HABP Nitrocellulose-Filter	Millipore (Eschborn)
Hefeextrakt	Difco (Sparks, USA)
Hepes	Roth (Karlsruhe)
Heringssperma-DNA	Sigma-Aldrich (Steinheim)
L-Histidin-HCl Monohydrat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
BioMax Light Film	Kodak
L-Isoleucin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Kaliumphosphat	Merck (Darmstadt)
Kaliumdiphosphat-Trihydrat	Merck (Darmstadt)
L-Leucin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Lithiumacetat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Luminol (3-Aminophthalhydrazid)	Merck (Karlsruhe)
L-Lysin-HCl	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Magermilchpulver (Frema Reform)	Finck (Herrenberg)

Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck (Darmstadt)
Maleinsäure	Merck (Darmstadt)
Maltose	Merck (Darmstadt)
2-Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt)
Methanol	Merck (Darmstadt)
L-Methionin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
MOPS (3'Morpholinopropansulfonsäure)	Merck (Darmstadt)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Natriumcitrat	Roth (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva (Heidelberg)
Natriumhydrogencarbonat	Roth (Karlsruhe)
Di-Natriumhydrogencarbonat	Roth (Karlsruhe)
Natriumphosphat-Monohydrat	Roth (Karlsruhe)
Neubauer Zählkammer	Roth (Karlsruhe)
L-Phenylalanin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Polyethylenglycol 4000 (PEG)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Protran BA 85 Nitrocellulose- Membran (0,45 µm Porengröße)	Schleicher & Schüll (Dassel)
Roti-Block	Roth (Karlsruhe)
Rotiphorese Gel 30 (30% Acrylamid mit 0,8 % Bisacrylamid, 37,5 :1	Roth (Karlsruhe)
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth (Karlsruhe)
L-Threonin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tris	AppliChem (Darmstadt)
Trypton	Roth (Karlsruhe)
L-Tryptophan	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat (Tween 20)	Sigma (Deisenhofen)
L-Tyrosin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
L-Valin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Wasserstoffperoxid 30%	Roth (Karlsruhe)
X-Gal	Roth (Karlsruhe)
Yeast Nitrogen Base (ohne Aminosäuren)	Difco (Sparks, USA)

### 2.1.2 Antibiotika

Ampicillin, Natriumsalz	Roth (Karlsruhe)
Kanamycinsulfat	AppliChem (Darmstadt)
Chloramphenicol Succinat, Natriumsalz	Sigma (Deisenhofen)
G418 Sulfat (Geneticin)	Calbiochem-Novabiochem

### 2.1.3 Kits für die Molekularbiologie

QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN (Hilden)

QIAGEN PCR Cloning Kit	QIAGEN (Hilden)
QIAGEN Plasmid Mini Kit	QIAGEN (Hilden)
QIAGEN Plasmid Midi Kit	QIAGEN (Hilden)
QIAGEN RNeasy Mini Kit	QIAGEN (Hilden)
Wizard genomic DNA purification Kit	Promega (Mannheim)

#### 2.1.4 Enzyme für die Molekularbiologie

Restriktionsenzyme	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen) New England Biolabs (Frankfurt)
Alkalische Phosphatase (CIAP)	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)
Ex-Taq Polymerase	TaKaRa (Gennevilliers, Frankreich)
Klenow Fragment	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)
M-MLV RT (H-)	Promega (Mannheim)
T4 DNA Ligase	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)
Taq DNA Polymerase	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)

#### 2.1.5 Antikörper

Kaninchenserum gegen <i>D. discoideum</i> CNB	A. Aichem, Konstanz
Kaninchenserum gegen Kälber CNB	Dr. T. Kuno, Kobe University, School of Medicine, Japan
Peroxidase-gekoppeltes Ziege-Anti-Kaninchen-Serum	Dianova (Hamburg)

#### 2.1.6 Proteine

Gereinigtes, rekombinant exprimiertes *D. discoideum* Calcineurin B (A. Aichem)

#### 2.1.7 Standards für Agarose- und Proteingele

Mass Ruler DNA-Ladder Mix	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)
Protein MW Marker	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)
Prestained Protein MW Marker	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)

## 2.1.8 Organismen

### Bakterienstämme

Tab.1: Bakterienstämme

Stamm	Relevanter Genotyp/ Eigenschaften	Referenz
<i>E. coli</i> DH5α	<i>recA1</i> , φ80 <i>lacZ</i> ΔM15	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> XL1 blue	<i>end A1</i> , <i>hsdR17</i> , ( $r_{k-}$ , $m_{k+}$ ), <i>supE44</i> , <i>thi</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , Δ <i>lac</i> , F' [ <i>pro A</i> <sup>+</sup> <i>B</i> <sup>+</sup> , <i>lacI</i> <sup>f</sup> , <i>lacZ</i> ΔM15, Tn 10 (Tet <sup>R</sup> )]	Bullock, Ferandez & Short, 1987
<i>E. coli</i> JCB486	F <sup>-</sup> , <i>ara14</i> , <i>leub6</i> , <i>tonA31</i> , <i>leu41</i> , <i>tsxt8</i> , <i>supE44</i> , <i>galK2</i> , <i>galT22</i> , <i>his64</i> , <i>dcm6</i> , <i>dam13Tn9</i> , <i>rpsL136</i> , <i>xyl5</i> , <i>ntl1</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR2</i> , <i>mcrB</i> , <i>mcr</i> ; keine Methylierung der DNA	Laborkollektion Hengge
<i>Klebsiella</i> <i>planticola</i>		Laborkollektion Mutzel

### *D. discoideum* Zelllinien

Tab.2: *D. discoideum* Zelllinien

Zelllinie	Relevante Eigenschaften	Referenz
Ax2	Derivat vom Freilandisolat NC4, enthält zwei rezessive Mutationen, die es zum axenischen Wachstum befähigen	Watts & Ashworth, 1970
pDex-RH-GFP	Zelllinie, die GFP exprimierendes Plasmid pDex-GFP enthält	Westphal et al., 1997

### *S. cerevisiae* Stämme

Tab. 3: *Saccharomyces cerevisiae* Stämme

Stamm	Relevanter Genotyp/Eigenschaften	Referenz
INVSc1	<i>MATa</i> , <i>his3</i> Δ1, <i>leu2</i> , <i>trp1-289</i> , <i>ura3-52</i>	Invitrogen

### 2.1.9 cDNA Banken

*D. discoideum*  $\lambda_{YES}$  Phagen cDNA Banken von überlassen von Sije Lu  
vegetativen und sich entwickelnden Zellen (Houston, USA)  
(konvertiert zu Plasmid cDNA Banken)

### 2.1.10 Oligonukleotide („Primer“)

Alle synthetischen Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (München) oder der Firma Biotex (Berlin) hergestellt.

CNB - 3' rev BamH I	CGC GGA TCC CTC TTG ATT AAC AAT CAT ATG AAT G Primer für Amplifikation von Calcineurin B
oFUM101	GGG AAG CTT CCC AAT CCG AGA TTT TAG CTC Primer für Amplifikation von Calcineurin B
oFUM107	CCG AAG ACA ACA ACC CTT ATT TTT GCA ACC Primer für Amplifikation von Calcineurin B
oFUM108	CC GTC TTC TTC TGA CCA ATT TAC GCT AAG TTT T Primer für Amplifikation von Calcineurin B
oFUM135	ATG GTT GGT ATG GGT CAA AAG Primer für Amplifikation von Actin 15
oFUM136	TTA GAA ACA TTT TCT ATG AAC AAT TG Primer für Amplifikation von Actin 15
oFUM174	CGG TTG TTG CTC AAA TAC ACC Primer für Amplifikation von <i>ecmB</i>
oFUM175	TAT GGC AAC AGC CAG TTG AG Primer für Amplifikation von <i>ecmB</i>
oFUM208	TGA TCA CAT GTC TGT TAT TAA TTT CAC A Primer für Amplifikation der Tryptophan-Kassette aus pAS-2
oFUM209	TGA TCA CCT TTC TTA GCA TTT TTG ACG AA Primer für Amplifikation der Tryptophan-Kassette aus pAS-2
oFUM211	CCG GAT CCA AGC TTA AAG AAC AAT TAG AAC AAA TGA Primer für <i>cnb400</i>
oFUM212	CCG TCG ACT CAC CTT CAA TAA TAG TTT TAT CAA CA Primer für <i>cnb400</i>
oFUM213	CCC TGC AGA AAG AAC AAT TAG AAC AAA TGA Primer für <i>cnb500</i>

oFUM214	CCG TCG ACT TCT GAC CAA TTT ACG CTA AGT TTT Primer für <i>cnb500</i>
oFUM231	CCT GAT CAC ATG TCT GTT ATT AA TAA CAC AGG TAG TTC T Primer für Mutations-PCR (+Stopp) von Tryptophan-Kassette
oFUM246	ATC CAT ATG ATG CCG GTG TTC AAG Primer für <i>aar</i> -Gen
oFUM247	TTG ATG AGA GCA GCA CAA CCT TCA Primer für <i>aar</i> -Gen
oFUM248	ATG GCC CGT ACA AAA CAA ACC GC Primer für <i>hstH3</i> (Histon3)
oFUM249	TTA TGA TCT TTC ACC TCT GAT ACG TCT G Primer für <i>hstH3</i> (Histon3)

### 2.1.11 Plasmide und Konstrukte

Tab.3: Plasmide

Plasmid	Relevante Eigenschaften	Referenz
pDrive	Klonierungsvektor für <i>E. coli</i> , Amp <sup>R</sup>	QIAGEN, Hilden
pUC19	Klonierungsvektor für <i>E. coli</i> , Amp <sup>R</sup>	Yanisch-Perron, 1985
pDNeoll	Überexpressionsvektor für <i>D. discoideum</i> , Witke et al., 1987 Aktin 6 Promotor, Amp <sup>R</sup> , G418 <sup>R</sup>	
pYES2	Expressionsvektor für <i>S. cerevisiae</i> , GAL1 Invitrogen Promotor, Amp <sup>R</sup> , <i>URA3</i>	
pACT2	Expressionsvektor für <i>S. cerevisiae</i> , ADH1 BD Sciences, Promotor, GAL4 AD tag, Amp <sup>R</sup> , <i>LEU2</i>	Heidelberg
pAS2	Expressionsvektor für <i>S. cerevisiae</i> , ADH1 BD Sciences, Promotor, GAL4 BD tag, Amp <sup>R</sup> , <i>TRP1</i>	Heidelberg
pAS2-CNB (Hefe)	<i>cnb</i> aus <i>S. cerevisiae</i> in pAS2	A. Aichem
pDNeoll.cnb800-27-TAA	<i>cnbA</i> mit zusätzlichem Stoppkodon in pDNeoll	A. Aichem
pBsR479	Blas <sup>R</sup> Kassette	Putz & Zeng, 1998
pBW104	<i>cnbA</i> -cDNA in pDrive	B. Weissenmeyer
pBW108	<i>cnbA</i> -cDNA in pDrive mit 5' UTR	B. Weissenmayer
pBW116	<i>cnbA</i> -cDNA in pDrive mit 5' und 3' UTR	B. Weissenmayer
pKB03	pYES2 mit <i>cnbA</i> -cDNA und 5'UTR	diese Arbeit
pKB04	pYES2 mit <i>cnbA</i> -cDNA und 5'UTR + TAA	diese Arbeit

pKB05	pUC18 mit 437 bp Fragment von <i>cnbA</i>	diese Arbeit
pKB06	pKB05 mit 538 bp Fragment von <i>cnbA</i>	diese Arbeit
pKB07	pDNeoll mit 975 bp <i>BamHI/PstI</i> -Fragment von KB06	diese Arbeit
pKB09	pDrive mit <i>trp1</i> -Kassette von pAS2	diese Arbeit
pKB10	pACT2 mit cDNA von <i>cnbA</i>	diese Arbeit
pKB11	pKB03 mit <i>trp1</i> -Kassette aus pKB09	diese Arbeit
pKB14	pKB04 mit <i>trp1</i> -Kassette aus pKB09	diese Arbeit
pKB15	pDrive mit <i>trp1</i> -Kassette + Stoppkodon	diese Arbeit
pKB16	pKB03 mit <i>trp1</i> -Kassette aus pKB15	diese Arbeit
pKB17	pKB04 mit <i>trp1</i> -Kassette aus pKB15	diese Arbeit
pKB19	pBW116 mit BsR-Kassette aus pBsR479	diese Arbeit

---

### 2.1.12 Medien für *E. coli*

#### **LB-Medium**

Bactotrypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
H <sub>2</sub> O bidest	ad 1 l

Der pH wurde auf 7,3 eingestellt. Das Medium wurde 20 min bei 120°C autoklaviert. Für Agarplatten wurden je Liter 20 g Agar hinzugegeben.

Für die Herstellung elektrokompeter Zellen von *E. coli* Stämmen wurde LB-Medium verwendet, das kein NaCl enthielt und als LBon bezeichnet wurde.

#### **Soc-Medium**

Trypton	20 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	1,16 g
CaCl <sub>2</sub>	0,74 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	4,94 g
Glucose	7,92 g
H <sub>2</sub> O bidest	ad 1 l

### 2.1.13 Medien und Puffer für *D. discoideum*

#### ***Ax-Medium (nach Watts und Ashworth, 1970)***

Pepton	14,3 g
Hefeextrakt	7,15 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	1,28 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,486 g
Maltose	18,0 g
H <sub>2</sub> O bidest	ad 1 l

Der pH wurde auf 6,7 eingestellt. Das Medium wurde 20 min bei 120°C autoklaviert.

#### ***Sørensen Phosphat Puffer (SP-Puffer)***

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,997 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	0,715 g
H <sub>2</sub> O bidest	ad 1 l

Der pH wurde mit 17 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> auf 6,0 eingestellt.

#### ***SM-Medium***

Glucose	10 g
Bactopepton	10 g
Hefeextrakt	1 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O	1.3 g
H <sub>2</sub> O bidest	ad 1 l

### 2.1.14 Medien für *S. cerevisiae*

#### ***YPD-Vollmedium***

Pepton	20 g
Hefeextrakt	10 g
Glucose	20 g
H <sub>2</sub> O bidest	ad 1 l

Die Glucose wurde nach dem Autoklavieren zugegeben.



***SD-Minimalmedium***

Yeast Nitrogen Base	6,7 g	10 x Aminosäuregemisch:	
10 x Aminosäuregemisch	100 ml	L-Isoleucin	300 mg
Glucose	20 g	L-Valin	1500 mg
H <sub>2</sub> O bidest	ad 1 l	L-Adenin Hemisulfat	200 mg
		L-Arginin-HCl	200 mg
		L-Histidin-HCl Monohydrat	200 mg
		L-Leucin	1000 mg
		L-Lysin-HCl	300 mg
		L-Methionin	200 mg
		L-Phenylalanin	500 mg
		L-Threonin	2000 mg
		L-Tryptophan	200 mg
		L-Tyrosin	300 mg
		L-Uracil	200 mg
		H <sub>2</sub> O bidest	ad 1 l

Der pH wurde auf 5,7 eingestellt. Das Aminosäuregemisch ohne die selektionierenden Aminosäuren und die Glucose wurden sterilfiltriert nach dem Autoklavieren zugegeben. Um die Proteinexpression zu induzieren wurden statt Glucose 14 g Galaktose und 6 g Raffinose eingesetzt.

**2.1.15 Puffer für biochemische Methoden**

***2 x Gel Probenpuffer für Proteingele (2 x GSB)***

1 x upper gel buffer	300 ml
0,1 % Bromphenolblau in EtOH	15 ml
Glycerol	150 ml
SDS	30 g
H <sub>2</sub> O bidest	ad 1 l

Vor Gebrauch wurde 2 % 2-Mercaptoethanol zugeben.

**4 x lower gel buffer (pH 8,8)**

Tris-HCl	182 g
SDS	4 g
H <sub>2</sub> O bidest	ad 1 l

**4 x upper gel buffer (pH 6,8)**

Tris-HCl	61 g
SDS	4 g
H <sub>2</sub> O bidest	ad 1 l

**10 x running buffer**

Tris-HCl	30,3 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
H <sub>2</sub> O bidest	ad 1 l

Aus der Stammlösung wurde mit H<sub>2</sub>O bidest 1 x Puffer hergestellt.

**Anode 1 (pH 10,4)**

Tris	36,34 g
Methanol	200 ml
H <sub>2</sub> O bidest	ad 1 l

**Anode 2 (pH 10,4)**

Tris	2,3 g
Methanol	200 ml
H <sub>2</sub> O bidest	ad 1 l

**Kathode (pH 9,4)**

Tris	3,02 g
ε-Amino-n-caproic acid	5,2 g
Methanol	200 ml
H <sub>2</sub> O bidest	ad 1 l

**Coomassie Entfärber**

Methanol	300 ml
Essigsäure	100 ml
H <sub>2</sub> O bidest	600 ml

**TBS I (pH 7,4)**

Tris	1,212 g
NaCl	8,766 g
Tween 20	500 µl
H <sub>2</sub> O bidest	ad 1 l

**ECL I**

Lösung A: 0,5 M Luminol (3-Aminophtalhydrazid) in DMSO (Stickstoff begast)

Lösung B: 0,18 M p-Cumarsäure in DMSO

Lösung C : 1 M Tris-HCl, pH 8,5

450 ml H<sub>2</sub>O bidest und 50 ml Lösung C mit Stickstoff entgasen. Dann unter Rühren tropfenweise 2,5 ml Lösung A und 1,11 ml Lösung B zugeben.

**ECL II**

Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30%

Zugabe von 6 µl ECL II zu 1 ml ECL I

**Lysepuffer für *D. discoideum* Zellen**

Tris pH8,5	10 mM
KCl	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM
Nonidet	0,45 %
Tween20	0,45 %

**Lysepuffer für Hefezellen**

NaCl	100 mM
Tris pH 8,0	10 mM
EDTA	1mM
SDS	0,1%

### 2.1.16 Puffer für molekularbiologische Methoden

#### **50 x TAE**

Tris	121 g
Eisessig	28,55 ml
EDTA	9,31 g
H <sub>2</sub> O bidest	ad 1 l

#### **5x Probenpuffer für DNA Gele**

EDTA	55,84 g
Tris	3,03 g
Glycerin	250 ml
Bromphenolblau	500 µl

#### **10 x RNA Laufpuffer**

MOPS	0,4 M
Natrium-Acetat	0,5 M
EDTA	0,01 M

mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und mit DMPC behandelt

#### **RNA Formaldehyd Ladepuffer**

EDTA, pH 8,0	1mM
Bromphenolblau	0,25% (w/v)
Xylen Cyanol	0,25% (w/v)
Glycerol	50%

autoklaviert und in Aliquots bei -20°C eingefroren

#### **20 x SSC**

NaCl	3 M
Natriumcitrat	0.3 M

pH 7.0, mit 0,2% DMPC behandelt

#### **Waschpuffer**

Maleinsäure	100 mM
NaCl	150 mM

pH 7.5 mit 6 N NaOH eingestellt, dann Zugabe von 0.3% Tween 20

**Blockpuffer**

Waschpuffer mit 1% blocking reagent

**Detektionspuffer**

Tris-HCl, pH 9.5      100 mM  
NaCl                    100 mM  
pH 9.5

**"High-SDS" Hybridisierungs-Puffer**

SDS                              3,5 g  
deionisiertes Formamid      25 ml  
20 x SSC                        12,5 ml  
10% blocking reagent        10 ml  
Na-Phosphatpuffer, pH 7.0   2,5 ml  
N-Lauroylsarcosin            0,05 g

**Träger-DNA**

Heringsperma-DNA      200 mg  
TE-Puffer, pH 8,0        100 ml

Die Lösung wurde 2-3 h gerührt, bis sich die DNA vollständig gelöst hatte und dann in Aliquots bei -20°C eingefroren.

**1 x Te/LiAc**

Tris-HCl                    10 mM  
EDTA                        1 mM  
Lithiumacetat            100 mM  
Der pH wurde auf 7,5 eingestellt.

**2.1.17 Medienzusätze**

Die Medienzusätze wurden, wenn erforderlich in folgenden Konzentrationen zugegeben:

Ampicillin                100 µg/ml  
Kanamycin                25 µg/ml  
G418                        20 mg/ml oder 100 µg/ml

Blasticidin	10 µg/ml
X-Gal	20 µg/ml

## 2.2 Zellbiologische Methoden

### 2.2.1 Anzucht von *E. coli*

Alle *E. coli* Stämme und Transformanten wurden mit 150 rpm in LB-Medium oder auf LB-Agarplatten bei 37°C angezogen. Zellen wurden in LB mit 15% (v/v) Glycerol oder mit 7% (v/v) DMSO bei -70°C gelagert.

### 2.2.2 Präparation elektrokompetenter *E. coli* Zellen

Eine *E. coli* Übernachtskultur wurde 1:100 in 250 ml LBon-Medium verdünnt und bei einer Temperatur von 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 angezogen. Die Zellen wurden mit einem GSA-Rotor bei 6000 rpm für 5 min pelletiert. Das Pellet wurde zweimal mit 30 ml MQ-H<sub>2</sub>O gewaschen (für SG 13009 dreimal) und jeweils mit einem SS34-Rotor bei 10 000 rpm 10 min lang pelletiert. Das Pellet wurde nun in 30 ml einer kalten 10%igen Glycerol Lösung resuspendiert und abermals bei 10000 rpm für 10 min pelletiert. Das erhaltene Pellet wurde in 6 ml der 10%igen Glycerollösung resuspendiert und in Aliquots von 100 µl bei -70°C gelagert.

### 2.2.3 Anzucht von *D. discoideum* Wildtyp AX2 und Lagerung der Sporen

Die Zellkulturen wurden wöchentlich aus frischen Vorkulturen mit einer Zelldichte von  $1 \times 10^4$  Zellen/ml angeimpft und bis zu einer Zelldichte von  $1-5 \times 10^6$  Z/ml angezogen. Alle Kulturen wurden im Dunkeln bei 22°C mit 150 rpm auf einem Orbitalschüttler geschüttelt. Vorkulturen wurden aus Sporen angeimpft.

Für die Lagerung der Sporen wurde mit einer sterilen Impföse die Fruchtkörper von jeweils einer halben Agarplatte abgeerntet, in 1 ml SP-Puffer aufgenommen und bei -70°C gelagert.

#### **2.2.4 Anzucht von *D. discoideum* Transformanten**

Die Transformanten wurden wie der Wildtyp AX2 axenisch, aber mit 100 µg/ml Ampicillin und 20 µg/ml G418 oder 10 µg/ml Blastocidin S angezogen.

Nach der Transformation (siehe 2.4.10) wurden die Zellen über Nacht bei 22°C in AX-Medium ohne Antibiotika im Dunkeln inkubiert. Dann wurde das AX-Kulturmedium gegen AX-Medium mit Ampicillin und G418 bzw. Blastocidin S ausgetauscht. Alle drei bis vier Tage wurde das Medium gewechselt. Nach 1-2 Wochen konnten Transformanten isoliert werden.

Die isolierten Klone wurden zunächst in 96-er Mikrotiterplatten in je 100 µl AX-Medium mit Antibiotika pro Loch übertragen. Die Zellen wurden in 11 Schritten je 1:2 verdünnt. Die Mikrotiterplatten wurden in einer feuchten Kammer bei 22°C im Dunkeln bis zu einer Trübung des Bodens inkubiert. Die Transformanten im letzten Loch galten als monoklonale Transformanten. Diese Zellen wurden in einer Ø 5 cm Petrischale mit 4 ml AX-Medium und Antibiotika überführt und erneut bis zu einer Trübung des Bodens in einer feuchten Kammer inkubiert. 3 ml dieser Zellkulturen wurden in einem Kolben mit 30 ml AX-Medium und Antibiotika überführt und bei 150 rpm und 22°C im Dunkeln bis zu einer Zelldichte von  $1-5 \times 10^6$  Zellen/ml angezogen.

Vegetative transformierte *Dictyostelium* Zellen wurden mit 8% (v/v) DMSO bei -70°C gelagert. Sporen von Transformanten wurden in 1 ml SP-Puffer ebenfalls bei -70°C gelagert.

#### **2.2.5 Differenzierung von *D. discoideum* Zellen**

Zum Einleiten der Differenzierung wurden Zellen der jeweiligen Hauptkultur sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 5 ml eiskaltem SP-Puffer resuspendiert und der Waschvorgang zweimal wiederholt. Anschließend wurden die Zellen auf  $2 \times 10^7$  Z/ml eingestellt. Dieser Zeitpunkt wird im Folgenden als  $t_0$  bezeichnet. Die Zeitpunkte der späteren Differenzierungsstadien wurden dementsprechend als  $t_x$  bezeichnet, wobei  $x$  die Anzahl der Stunden nach dem Entfernen des Mediums bezeichnet. 5 ml der Zellsuspension wurden auf Ø 9 cm SP-Platten und 1 ml auf Ø 5 cm SP-Platten gegeben. Fand die Differenzierung auf HAPB Nitrocellulose Membranen statt, wurde 1 ml Zellsuspension auf einen Membran ausgebracht, die auf drei mit SP-Puffer getränkten Filtern lag. Nach einer halben Stunde wurde der Überstand abgesaugt und die Platten für 1-3 Tage bei 22°C

inkubiert.

### **2.2.6 Differenzierung von Chimären**

AX2 Wildtyp- und Mutanten-Zellen wurden in AX Medium kultiviert, zwei Mal in SP-Puffer gewaschen und auf  $2 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt. Die Zellen wurden dann in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt und auf jeweils 1 ml auf HABP-Filtern ausgebracht. Die Filter wurden im Dunkeln bei 22°C inkubiert.

### **2.2.7 Plaque Assay mit *Dictyostelium* Transformanten**

Es wurden je 200 (oder 100) Zellen aus Kulturen auf NA-Platten oder 1/3 SM-Platten pipettiert. Die Agar-Platten wurden wie folgt vorbereitet: 1,5 ml SP Puffer und 100 µl einer bakteriellen Übernachtskultur (NA für *E. coli* B/r oder 1/3 SM für *Klebsiella planticola*) wurden auf die Agar-Platten pipettiert. Die Mischung aus Puffer, Bakterien und Dictyostelien wurde durch horizontales Schwenken der Platten in Form einer Acht (30-40 mal) homogen verteilt. Danach trockneten die geöffneten Platten ca. 2 Stunden unter der Sterilbank. Die Inkubation erfolgte bei 22°C im Dunkeln. Nach 3-4 Tagen wurden jeden Tag die Plaques gezählt.

### **2.2.8 Analyse der Fruchtkörpergröße und der Sporen-Lebensfähigkeit**

Wildtyp- und Mutanten-Zellen wurden in AX Medium kultiviert, zwei Mal in SP-Puffer gewaschen und auf  $4 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Jeweils 100 µl der Zellsuspensionen wurden in mit 200 µl SP-Agar gefüllte Löcher einer 96 Mikrotiterplatte gefüllt. Nachdem die Organismen sich entwickelt hatten, wurden die Fruchtkörper abgenommen, in SP-Puffer resuspendiert und bei -70°C eingefroren. Nach einem Tag wurden die Sporen auf 1/3 SM Agar mit *Klebsiella planticola* ausgebracht, für drei Tage bei 22°C inkubiert und dann die Anzahl der Plaques gezählt.

### **2.2.9 Messung von Stiellängen**

Stiele wurden mit einem Spatel platt auf die Oberfläche gedrückt und davon mit einem Nikon SMZ8000 Mikroskop und mit einer Nikon DN100 Digitalkamera



Aufnahmen angefertigt. Diese Fotos wurden stark vergrößert, die Stiellängen darauf mit einem Lineal ausgemessen und über die Vergrößerungsfaktoren wurde dann die reale Stiellänge ermittelt.

### **2.2.10 Präparation der Schnitte für die Mikroskopie**

Der Kulturschalen-Boden (inkl. „Filter“) wurde mit Fixativ I getränkt (2-3ml 2,5% Glutaraldehyd (GA) in 0,1M Na/K-Phosphat-Puffer (PB 100) pH7,0). In der abgedeckelten und zusätzlich feucht gestellten Kulturschale (Kulturschale in „feuchter Kammer“) wirkte das Fixativ 3d bei RT als Lösung und Dampf auf die Präparate ein.

Durch Aufsetzen von Tropfen einer 3%igen wässrigen und 40°C warmen low melting-Agarose wurden die noch immer senkrecht stehenden „Stiele mit Fruchtkörpern“ unter Binokular-Beobachtung in ausgewählten Bezirken der Schale vorsichtig mit gelierender Agarose umwallt und schließlich vollständig u. unversehrt mit dieser benetzt. Die einhüllende Agarose wurde bei 0°C weiter verfestigt. Agaroseblöckchen mit ausgewählten Präparaten wurden mit einem feinen Spatel von der Kulturschale abgehoben und mit Fixativ II (2% Paraformaldehyd, 2,5% GA, 0,2% Tannin in PB100 pH7,0) für 2,5h bei RT nachfixiert. Nach Auswaschen des Fixativs mit PB100 pH7,0 (3x20 min) wurden die Präparate 12h bei RT nachträglich mit Osmium fixiert (1% Osmiumtetroxyd in PB50 pH7,0) und anschließend mit PB50 pH7,0 mehrfach gewaschen.

Zur Einbettung in Kunstharz wurden sie zunächst dehydratisiert (Äthanol-Reihe) und nach Einwirkung von Propylenoxyd (2h) und 50%igem ERL (Epoxid-Harz) in Propylenoxyd (12h) in reines ERL überführt (Spurr, 1969). Die Polymerisation des ERL erfolgte bei 60°C für 2d.

Mit dem Ultramikrotom erzeugte 1µm dicke Serien-Semidünnschnitte der Präparate wurden mit einer Azur II und Methylenblau enthaltenden Farblösung\* für 2 min bei 60°C gefärbt (Richardson et al., 1960). Die Schnitte wurden mit einem Leitz Ortholux II- Mikroskop (mit Gelbgrünfilter u. Blaufilter CB 16,5 im Strahlengang) unter Verwendung einer Nikon Digital-Kamera Cool PIX 990 fotografiert.

\*Azur II (1% in H<sub>2</sub>O) und Methylenblau (1% in 1% Borax); gleiche Volumen-Anteile frisch vermischt u. filtriert

### **2.2.11 Anzucht von *S. cerevisiae***

Alle Stämme und Transformanten wurden mit 150 rpm in YPD- bzw. dem jeweiligen Selektionsmedium oder auf Agarplatten bei 28°C angezogen. Das Selektionsmedium "Synthetic Dropout" (SD) enthält neben Stickstoff- und Kohlenstoffquelle einen definierten Aminosäure/Nukleotid-Mix. Für die Selektion wird die Aminosäure weggelassen, die die Transformanten durch Erwerb des Plasmids selbst synthetisieren können. Zur Lagerung von Stämmen und Klonen wurden Kulturen mit 25% Glycerin bei -70°C eingefroren.

## **2.3 Biochemische Methoden**

### **2.3.1 Herstellung von Zellextrakten für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

#### ***D. discoideum* Zellextrakte**

##### Zellextrakte aus Flüssigkultur

1 ml der jeweiligen Kultur wurden mit einer Eppendorftischzentrifuge mit 2000 rpm für 2 min sedimentiert. Anschließend wurden die Zellen mit SP-Puffer auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt. Die Suspension wurde mit der entsprechenden Menge heißem 2 x GSB, 2 % 2-Mercaptoethanol versetzt und für 5 min gekocht. Anschließend wurden die Proben für 5 min auf Eis gestellt und danach 5 min mit 14500 rpm in einer Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert.

##### Zellextrakte von differenzierenden Zellen

Jeweils 1 ml der gewaschenen Zellen wurden auf einen angefeuchteten HABP Filter ausgebracht. Zu den gewünschten Entwicklungszeiten wurden die Zellen eines Filters mit 5 ml kaltem SP-Puffer durch Vortexen abgewaschen, in einem Eppendorfgefäß sedimentiert, in 200 µl SP-Puffer aufgenommen und mit 200 µl heißem 2 x GSB, 2% 2-Mercaptoethanol für 10 min gekocht.

#### ***S. cerevisiae* Zellextrakte**

12 ml der jeweiligen Kultur ( $OD_{600}=3$ ) wurden mit 3000 rpm für 5 min

sedimentiert. Anschließend wurden die Zellen mit SP-Puffer gewaschen und in 100 µl SP-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde mit 100 µl heißem 2 x GSB, 2 % 2-Mercaptoethanol versetzt und für 10 min gekocht. Anschließend wurden die Proben für 5 min auf Eis gestellt.

### **2.3.2 Proteinbestimmungen**

Proteinbestimmungen wurden wie bei Bradford (1976) beschrieben durchgeführt.

### **2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

SDS-Polyacrylamid Gelelektrophoresen wurden nach der Methode von Laemmli (1970) mit 15%-igen Gelen, die 0,1% SDS enthielten durchgeführt. Als Proteinstandard wurde der vorgefärbte „HMW“ Proteinstandard von MBI Fermentas eingesetzt.

### **2.3.4 Coomassie Blue Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen**

Proteinbanden in SDS-Polyacrylamidgelen wurden mit Coomassie Blue R250 für 30 min angefärbt. Anschließend wurden die Gele in Coomassie Entfärber mehrmals entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren.

### **2.3.5 Western Blot**

Die auf SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennten Proteine wurden nach der „Semi-dry“ Methode von Kyhse-Andersen (1984) elektrophoretisch auf Nitrocellulose-Membranen übertragen. Der Transfer erfolgte über 30 min bei 15 V.

### **2.3.6 Immunfärbung von Western Blots**

Die Membranen wurden nach dem Blotten 2 x 10 min in TBS I gewaschen und anschließend in Roti-Block Lösung (1:10 in H<sub>2</sub>O bidest) 1h bei RT abgesättigt. Dann wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit einer 1:5000 verdünnten Antikörperlösung gegen CNB inkubiert. Anschließend wurde 3 x 10 min mit TBS I und 5 x 10 min in TBS I mit 5% Magermilchpulver (Frema Reform) gewaschen.

Die darauf folgende einstündige Inkubation (RT) mit 1:5000 verdünnten, Peroxidase gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen sekundären IgG Antikörpern erfolgte jeweils in TBS I mit 5% Magermilchpulver. Vor der ECL Detektion wurde der Blot 3 x 10 min in TBS I mit 5% Magermilchpulver, 2 x 10 min in TBS I und 2 x 10 min in 10 mM Tris-HCl, pH 7,4 gewaschen. Je Membran wurden 1 ml ECL I Lösung mit 6 µl ECL II Lösung gemischt. Die Membran wurde für 1 min mit der Mischung inkubiert und die Lumineszenz auf einem Röntgenfilm dokumentiert.

### 2.3.7 *Saccharomyces* Colony-Blot

Zellen wurden auf Agarplatten mit Galaktose angeimpft und zwei Tage bei 28°C inkubiert. Auf die Agarplatten wurden dann BA85 Nitrocellulosefilter gelegt und deren Position mit einer Nadel markiert. Der Filter wurde abgezogen und 1 h bei RT auf mit Lysepuffer getränktem Filterpapier inkubiert. Darauf folgte das Abschwemmen der Zellreste mit TBS I. Weiterhin wurden die Filter wie ein klassischer Western Blot behandelt (siehe 3.5 und 3.6).

### 2.3.8 Berechnung der CNB-Konzentration in einer Zelle

Für die Bestimmung der CNB-Konzentration wurde eine CNB Verdünnungsreihe und Gesamtprotein aus  $5 \times 10^5$  Zellen auf Nitrocellulose geblottet. Nach Detektion mit Antikörpern gegen *Dictyostelium* CNB wurde über den Vergleich der CNB Banden des Zellextrakts mit den Banden der bekannten CNB Konzentrationen die Konzentration im aufgetragenen Extrakt ermittelt. Daraus wurde die CNB Konzentration in einer *Dictyostelium*zelle berechnet.

#### 1. Volumen einer *Dictyostelium* Zelle mit Radius von 10µm

$$\begin{aligned} V &= \frac{4}{3} r^3 \pi = \frac{4}{3} \cdot 10^{-15} m^3 \cdot 3,14 \\ &= 4,2 \cdot 10^{-6} \mu l = \underline{\underline{4,2 pl}} \end{aligned}$$

#### 2. Abschätzung der CNB-Masse pro Zelle mittels Western Blot

Es wurden 10 µl eines WT-Proteinextraktes mit  $5 \times 10^7$  Zellen/ml und zum Vergleich 10 µl verschiedener Extrakte bekannter CNB Konzentration

aufgetragen.

Bandenstärke des WT-Extrakts zwischen 1 ng/μl und 300 pg/μl ≈ 500 pg/μl.

Also sind in  $5 \times 10^4$  Zellen 500 pg CNB und in einer Zelle  $1 \times 10^{-2}$  pg CNB.

### 3. Berechnung der Stoffmenge an CNB pro Zelle

Molekulargewicht von CNB: 20 kD = 20 pg/fmol

= 20 fg/amol

= 0,02 pg/amol

Stoffmenge pro Zelle:

$$\begin{aligned}n &= \frac{m}{M} \\&= \frac{0,01 \text{ pg}}{0,02 \text{ pg/ amol}} \\&= 0,5 \text{ amol} \\&= 5 \cdot 10^{-19} \text{ mol}\end{aligned}$$

### 4. CNB-Konzentration in einer Zelle

$$c = \frac{n}{V} = \frac{5 \cdot 10^{-19} \text{ mol}}{4,2 \cdot 10^{-12} \text{ l}}$$

$$\approx 10^{-7} \text{ M}$$

$$= 0,1 \mu\text{M}$$

## **2.4 Molekularbiologische Methoden**

### **2.4.1 Standardmethoden**

Enzymatische Verdauung von DNA mit Restriktionsendonukleasen, Dephosphorylierungen von DNA 5' Enden mit "Calf" alkalischer Phosphatase, Ligationen von DNA-Fragmenten mit der T4 DNA Ligase, Ethanol Fällungen von DNA, Agarose Gelelektrophoresen zur Auftrennung von DNA-Fragmenten und Transformationen von *E. coli* Zellen mittels Elektroporation wurden nach Standardmethoden durchgeführt (Sambrook, Fritsch & Maniatis, 1989). Die Isolation von Plasmid DNA aus *E. coli* Zellen wurde mit dem "QIAGEN Mini Kit" der Firma QIAGEN (Hilden) nach den Angaben des Herstellers isoliert. Für große

Mengen wurde die Plasmid-DNA mit dem "QIAGEN Plasmid Midi Kit" der Firma QIAGEN (Hilden) nach den Angaben des Herstellers isoliert.

Für Klonierungen wurden die *E. coli* Stämme DH5 $\alpha$ , XL1-blue und JCB468 verwendet. DNA Sequenzanalysen wurden von der Firma Agowa (Berlin) durchgeführt.

### **2.4.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Zur Vervielfältigung von DNA-Stücken wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet. Routinemäßig wurden 500 pg DNA und je 2,5  $\mu$ M der beiden Primer eingesetzt. Die Reaktion erfolgte im Reaktionspuffer des Herstellers und in Gegenwart einer Mischung aus dNTP's, wobei die Endkonzentration jedes einzelnen dNTP 2,5 mM betrug. Das Endvolumen der Ansätze umfasste 50  $\mu$ l, wenn Ex-Taq-Polymerase oder 25  $\mu$ l, wenn Taq-Polymerase verwendet wurde. In einem programmierbaren Heizblock („Cycler“) durchlief die Probe dann ein Temperaturprogramm mit üblicherweise 30 Zyklen. Die Temperaturschritte betrugen in der Regel 45 sec bei 95°C, 45 sec bei 56°C und 3 min bei 72°C.

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ von QIAGEN (Hilden) nach den Angaben des Herstellers gereinigt.

### **2.4.3 „Whole Cell“-PCR**

*D. discoideum* Zellen wurden nach Transformation mit pKB19 wie in Kapitel 2.2.4 angezogen. Aus den kleinen Petrischalen wurde für jeden Klon 40  $\mu$ l Zellsuspension entnommen, mit 10  $\mu$ l Lysepuffer gemischt und 5 min bei 95°C gekocht. 2  $\mu$ l wurden entnommen und für eine PCR weiterverwendet. Der PCR-Ansatz hatte ein Endvolumen von 40  $\mu$ l und enthielt neben den 2  $\mu$ l Template Mastermix, Oligonukleotide in der Endkonzentration von 0,5  $\mu$ M. Die Temperaturschritte betrugen 45 sec bei 95°C, 45 sec bei 56°C und 3 min bei 72°C. 35 Zyklen wurden gefahren.

#### **2.4.4 Extraktion von DNA aus Agarosegelen**

Aus Agarosegelen wurde die DNA mit dem "QIAquick Gel Extraction Kit" der Firma QIAGEN (Hilden) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

#### **2.4.5 Quantifizierung und Reinheitsbestimmung von DNA und RNA**

Reinheit und Konzentrationen der DNA-Lösungen wurden durch Vergleich der Ethidiumbromid Fluoreszenz mit einem DNA-Standard quantifiziert.

#### **2.4.6 RNA-Isolierung aus *D. discoideum* Zellen**

Für die Extraktion von Gesamt-RNA aus *D. discoideum* Zellen mit dem RNeasy Mini Kit (QIAGEN) wurden die Zellen nach dem Waschen auf  $2 \times 10^7$  Z/ml in SP Puffer eingestellt und je 1 ml dieser Zellen für eine Probe verwendet. Für Proben von vegetativen Zellen (t0) wurden die Zellen direkt aus der gewaschenen Flüssigkultur entnommen und sedimentiert. Für Proben von differenzierenden Zellen wurden diese nach dem Waschen auf HABP Nitrocellulose-Filter ausgebracht. Nach der gewünschten Entwicklungszeit wurden die Zellen mit 5 ml SP-Puffer von den Filtern abgelöst und sedimentiert. Die RNA Extraktion wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### **2.4.7 Herstellung von Digoxigenin-markierten DNA Sonden für Northern Blots**

Die Markierung von DNA mit Digoxigenin wurde mit dem "DIG DNA Labeling Kit" von Roche (Mannheim) durchgeführt. Der Nachweis der markierten DNA erfolgt, indem Antikörper (Fab-Fragmente) gegen Digoxigenin, an die alkalische Phosphatase gekoppelt ist, an Digoxigenin binden. Durch Zugabe des Chemilumineszenz-Substrats CSPD wird ein Lichtsignal erzeugt, welches auf einem Röntgenfilm dokumentiert werden kann. Verwendet wurde jeweils gereinigtes PCR Produkt. Die *cnbA*- und *actin15*-Sonden wurden aus cDNA hergestellt, *ecmB* aus gDNA. Um die Qualität der Sonden zu testen, wurden Verdünnungen von 1 ng/ $\mu$ l bis 1 pg/ $\mu$ l in Verdünnungspuffer ("DIG DNA Labeling Kit") hergestellt. 1  $\mu$ l der jeweiligen Verdünnung wurde auf eine Nylon-Membran aufgetropft und die Membran 10 min unter UV-Licht fixiert. Alle folgenden Schritte

wurden bei RT durchgeführt. Die Membran wurde 1 min in Waschpuffer inkubiert und anschliessend 30 min in Block-Puffer abgesättigt. Der Block-Puffer wurde gegen frischen Puffer ausgetauscht, der mit 1:5000 verdünnten Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragmenten versetzt war. Nach 30 min wurde die Membran 2 x 15 min in Waschpuffer und 2-5 min in Detektionspuffer gewaschen. Für die Detektion wurde 200 µl NBT-Lösung in 10 ml Detektionspuffer verdünnt, die Membran übernacht im Dunkeln darin inkubiert und die Reaktion dann durch Waschen in TE-Puffer gestoppt.

### **2.4.8 RNA Agarose Gelelektrophorese und Northern Blot**

#### RNA Agarose Gelelektrophorese

RNA Agarosegele enthielten 0,9% Agarose, 1 x RNA Laufpuffer und 18 ml der 37%-igen Formaldehydlösung bei einem Gelvolumen von 100 ml. Die Formaldehydlösung wurde erst nach Aufkochen der Agarose-Puffer-Mischung und wieder Abkühlen auf 65°C zugegeben. 10-20 µg Gesamt-RNA wurde mit Wasser auf 15 µl Probenvolumen angeglichen und mit 6 µl 10 x RNA Ladepuffer, 10 µl 37% Formaldehyd und 25 µl deionisiertes Formamid versetzt und während 15 min bei 65°C denaturiert. Dann wurde 10 µl RNA Ladepuffer zugegeben und die Gelelektrophorese bei 100 Volt in 1 x RNA Laufpuffer durchgeführt. Um das Formaldehyd zu entfernen, wurden die Gele nach dem Lauf für 20 min in DMPC behandelten 20 x SSC Puffer geschwenkt. Der Transfer auf Nytran Nylon-Membranen erfolgte durch Kapillarität über Nacht. Als Laufpuffer wurde DMPC-behandelter 20 x SSC Puffer verwendet.

#### Hybridisierung und Detektion

Nach dem Transfer wurde die RNA auf der Membran per *Crosslinking* (10 min unter UV-Licht) fixiert und anschließend in 30 ml "High" SDS-Hybridisierungspuffer 2-3 h bei 50°C und leichtem Schütteln vorinkubiert. Dann wurde der Puffer gegen 20 ml frischen Puffer ausgetauscht und die zuvor ermittelte Menge an Digoxigenin-markierter Sonde zugegeben. Die Sonde wurde dazu mit 100 µl 2 mg/ml Heringssperma DNA gemischt, 10 min bei 100°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Die Hybridisierung erfolgte ebenfalls bei 50°C unter leichtem Schütteln für 18-20 h.

Um unspezifisch gebundene Sonde zu entfernen, wurde die Membran



anschließend zweimal 5 min bei RT in 2 x SSC, 0.1% SDS und zweimal 15 min bei 50° C in 0.5 x SSC, 0.1% SDS gewaschen. Alle weiteren Schritte (Absättigen der Membran sowie Detektion) erfolgten bei RT wie unter "Herstellung von Digoxigenin-markierten DNA Sonden für Northern Blots" beschrieben. Um ein deutliches Signal zu erhalten, wurde der Röntgenfilm für 30 s - 1 h aufgelegt.

### **2.4.9 Transformation von *E. coli***

Für die Elektroporation von *E. coli* und *D. discoideum* wurde der „Genepulser Xcell“ der Firma Biorad (München) verwendet. 100 µl elektrokompeter *E. coli* Zellen (Herstellung 2.2.7) wurden 2 µl des durch Dialyse entsalzten Ligationsansatzes zugegeben und in eine 0,2 cm Elektroporationsküvette überführt. Gepulst wurde einmal bei 2,5 kV und 25 µF. Der Transformationsansatz wurde mit 500 µl Soc-Medium aus der Küvette gespült und für 30 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Dann wurde der Transformationsansatz auf LB-Platten mit den entsprechenden Zusätzen ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **2.4.10 Transformation von *D. discoideum* Zellen**

Für die Transformation von *D. discoideum* Zellen mittels Elektroporation wurden Kulturen mit einer Zelldichte von ca.  $5 \times 10^6$  Zellen/ml verwendet. Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem H-50 Puffer gewaschen und auf eine Dichte von  $2 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt. 0,1 ml dieser Zellsuspension wurde in eine eiskalte 0,1 cm Elektroporationsküvette pipettiert. Nach Zugabe von 5-10 µg Plasmid-DNA wurde zweimal mit je 5 Sekunden Abstand bei 25 µF und 0,85 kV mit dem „Genepulser Xcell“ der Firma Biorad (München) gepulst. Die Transformationsansätze wurden für 5 min auf Eis inkubiert und anschließend in Petrischalen (Ø 9 cm), die 10 ml AX-Medium enthielten, pipettiert. Diese Transformationsansätze wurden über Nacht bei 22°C im Dunkeln inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gegen 10 ml AX-Medium mit 100 mg/ml Ampicillin und 20 µg/ml G418 ausgetauscht. Nach 1-2 Wochen waren Transformanten sichtbar.

#### **2.4.11 Präparation von genomischer *D. discoideum* DNA**

Die Präparation von genomischer *D. discoideum* DNA wurde mit dem Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Mannheim) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Je Präparation wurde 1 ml einer  $1-5 \times 10^6$  Zellen/ml *Dictyostelium* Kultur, 2 x mit SP-Puffer gewaschen, verwendet.

#### **2.4.12 Transformation von *S. cerevisiae***

Am Vortag der Transformation wurde eine Übernachtskultur des Hefestamms in 30 ml Medium angesetzt und bei 28°C schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Kultur auf  $OD_{600}=0,2$  in 100 ml YPD-Medium verdünnt und bei 28°C inkubiert, bis eine  $OD_{600}=0,8$  erreicht wurde. Die Kultur wurde dann 10 min bei 1000 g bei 4°C abzentrifugiert; das Pellet wurde in 40 ml kaltem H<sub>2</sub>O resuspendiert und erneut 10 min bei 1000 g abzentrifugiert. Die Zellen wurden nun in 1xTE/LiAc resuspendiert; an einen weiteren Zentrifugationsschritt unter gleichen Bedingungen schloss sich ein Aufkonzentrieren der Hefezellen in 1 ml 1xTE/LiAc an. Diese transformationskompetenten Zellen wurden bis zur Verwendung auf Eis gehalten. Je Transformationsansatz wurden dann 100 µl kompetente Zellen, 1 µg Plasmid-DNA und 50 µl Heringssperma-DNA (2 mg/ml) mit 240 µl 50% PEG, 36 µl 1 M LiAc und 32 µl H<sub>2</sub>O vermischt und 30 min bei 28°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurden die Zellen 15 min bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen, die Zellen wurden dann schnell auf Eis heruntergekühlt. Nach 3 min Zentrifugieren bei 8000 rpm in einer Eppendorf-Zentrifuge wurde das Zellpellet in 100 ml 0,9% NaCl resuspendiert. Der Transformationsansatz wurde dann auf Minimalmedium-Platten ausplattiert und bei 28°C mehrere Tage inkubiert.

#### **2.4.13 Präparation von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae***

Von einer Übernachtskultur wurden 3 ml 5 min bei 2500 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl Lysepuffer resuspendiert und mit 200 µl Glaskugeln mindestens 1 min gevortext. Dann wurde 200 µl Phenol/Chloroform (1:1) zugegeben und ~ 30 s gevortext. Nach 3 min Abzentrifugieren bei 6000 rpm wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, 200 µl Chloroform

zugegeben und erneut gevortext. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 20 µl Na-Acetat und 500 µl 99% Ethanol zugegeben. Nach Inkubation bei -70°C wurde die Probe 20 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 200 µl 70% Ethanol zugegeben. Dann wurde 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen, die DNA getrocknet und in 20 µl Wasser resuspendiert. 5 µl der isolierten Plasmid-DNA wurde in *E. coli* DH5α Zellen transformiert und daraus mit dem QIAquick Mini Kit von QIAGEN präpariert (siehe 2.4.1).