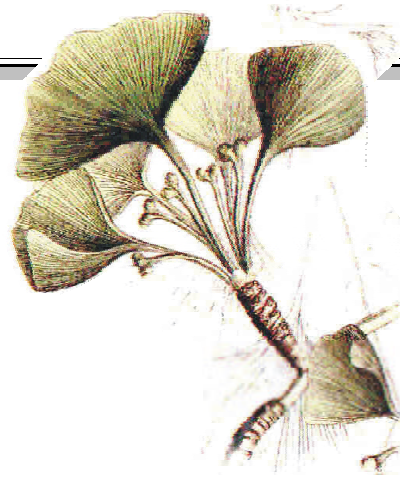


**DIE BIOSYNTHESE DES VITAMIN B₆ UND DES GINKGOTOXINS
ALS BEISPIEL EINER KONVERGENZ**

- Klonierung und Expression eines sor-homologen Gens

Aus *Ginkgo biloba* L., Ginkgoaceae-



DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DES DOKTORGRADES (DR. RER. NAT.)

DER

MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT

DER

RHEINISCHEN FRIEDRICH-WILHELMS-UNIVERSITÄT BONN

VORGELEGT VON

ANDREAS GENAU

AUS WARBURG

BONN, JULI 2002

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. E. Leistner

2. Referent: HD Dr. M. Keusgen

Tag der Promotion: 24.07.2002

„Die Erhabenheit Deiner Schöpfung wollte ich den Menschen verkünden,
soweit mein beschränkter Verstand Deine Unendlichkeit begreifen konnte.“

JOHANNES KEPLER (1571-1630)

Deutscher Mathematiker und Astronom

Vorne weg ...

Ich weiß ja nicht, ob Sie's schon wußten, ...

... aber die vorliegende Arbeit habe ich als eingefleischter Westfale im Feindesland am Rhein angefertigt. In den Wirren des von Zweifeln und Frust geprägten Doktorantenlebens konnte ich feststellen, daß die Mentalität des Rheinländers an sich nicht dem entspricht, was landläufig behauptet wird. Im Gegenteil, er besticht durch seine Sturheit genauso wie durch seine Quasseligkeit, deren Inhalt man aber in der Regel kein besonderes Gewicht beimessen sollte, besonders wenn das spülwasserartige Regionalgetränk (genannt „Kölsch“!) im Spiel ist.

So mag der Nicht-Rheinländer die Situation eines Westfalen nur allzuleicht verstehen, der sich auf den langen und steinigen Weg gemacht hat, eine wissenschaftliche Arbeit anzufertigen. Da ist es hilfreich - ja unverzichtbar -, daß einem die Mitarbeiter, Freunde und Familienmitglieder unter die Arme greifen, wenn man nicht mehr aus noch ein weiß. Ich hatte das Glück, liebenswerte Menschen um mich zu haben, die mir zur rechten Zeit mit Rat und Hilfe, mit einem aufmunternden Wort oder nur mit einem kalten Bier (Pils!) zur Seite standen, wenn ich es am dringendsten brauchte. Für diese Hilfe möchte ich von Herzen „Dankeschön“ sagen. Ohne all diese auf ihre eigene Art außergewöhnlichen Menschen zu vergessen, möchte ich fünf von ihnen hervorheben, die mich in diesen viereinhalb Jahren begleitet und in besonderer Weise geprägt haben:

Sehr geehrter Herr Leistner, ich danke Ihnen, daß sie mir die Möglichkeit gegeben haben, in Ihrer Arbeitsgruppe zu forschen, daß Sie mich jederzeit mit Rat und Tat unterstützt haben und daß Sie mir ohne Vorbehalte alle Freiheiten gaben, meine Ideen zu verfolgen. Ganz besonders möchte ich Ihnen dafür danken, daß sie es mir ermöglichten, die Natur in ihrer gigantischen, detailverliebten, verschwenderischen, filigranen und zugleich monumentalen Weise kennen zu lernen und voll Ehrfurcht zu bestaunen.

Liebe Christel, ich danke Dir, daß Du mich unter Deine wissenschaftlichen „Fittiche“ genommen hast und mir gezeigt hast, wie man das macht, mit dem „Gene-fischen“. Du standest mir mit kritischem Rat immer zur Seite. Darüber hinaus erinnere ich mich gerne an die gemeinsamen Genüsse aus dem Laacher Raum. Ich hoffe, daß wir in Zukunft auch trotz zunehmender Distanz Gelegenheit finden werden, diesen gemeinsamen Freuden zu frönen.

Lieber Michael, Du hast in mir das Interesse für das geweckt, was ich während des Studiums der Pharmazie haßte wie die Pest: Botanik! Zusammen unternahmen wir Ausflüge auf die Rabenlai oder in die Eifel, um Blumen und die Natur zu bewundern. Ich habe mit Dir einen Rheinländer kennengelernt, der viele der sonst dem Westfalen eigenen Tugenden besitzt.

Lieber Pulli, ich danke Dir für unsere gemeinsame Zeit am Institut und für Deine unkonventionelle Art, die Dinge mal von einer anderen Seite zu betrachten. Oft hat mir dies geholfen, Problemen entspannter entgegen zu sehen. Ich danke Dir für die gemeinsame Musik und die Tipps und die Unterstützung beim Zusammenstellen dieser Arbeit.

Lieber Heiko, ich danke Dir für unsere gemeinsame Zeit als Lebensabschnittsgefährten! Für „Pellkartoffeln mit Frankfurter grüne Sauce“, für Apfelwein (ob kalt oder heiß mit Zimt), für Eintracht-Frankfurt-Socken, für die stundenlangen Diskussionen, in denen wir die Probleme der Welt lösten, den Hunger beseitigten und die Grenzen von Zeit und Raum überwand. Für Deinen weiteren Weg wünsche ich Dir alles Gute !

Allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmazeutische Biologie, mit denen ich im Laufe der Jahre zusammengearbeitet habe, danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und ihre Zusammenarbeit. Ohne ihre Unterstützung, auch in den kleinen Dingen des Tagesablaufs, wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ich habe in diesen Jahren viele Menschen kennen- und schätzengelert und habe mich im Hause sehr wohl gefühlt. Dafür herzlichen Dank!

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VIII
TABELLENVERZEICHNIS	X
1 EINLEITUNG	1
1.1 Die Vitamere der B₆-Gruppe	1
1.2 Biosyntheseweg der Pyridoxin-Vitamere	3
Biosynthese des 4-(Phosphohydroxy)-L-threonins in <i>Escherichia coli</i>	4
Biosynthese von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphates in <i>Escherichia coli</i>	6
Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat.....	6
1.3 4'-Methylpyridoxin, ein Strukturanalogon von Vitamin B₆ in <i>Ginkgo biloba</i> L.	8
1.4 Biosynthese des Vitamin B₆ in <i>Ginkgo biloba</i>	11
Aufgabenstellung und Ziel dieser Arbeit.....	13
2 MATERIAL UND METHODEN	15
2.1 Chemikalien, Lösungen, Verbrauchsmaterialien	15
2.1.1 ORGANISCHE UND ANORGANISCHE CHEMIKALIEN.....	15
2.1.1.1 Oligonukleotide („Primer“).....	16
2.1.1.2 Plasmide und Vektoren.....	18
2.1.1.3 Enzyme, Größenstandards und Reagenziensätze.....	20
2.1.2 MATERIAL FÜR CHROMATOGRAPHIE, FILTRATION UND BLOTTING SOWIE PLASTIKWARE.....	21
2.1.3 LÖSUNGEN, KULTURMEDIEN.....	22
2.1.3.1 Lösungen für Arbeiten mit DNA.....	22
2.1.3.2 Lösungen für Arbeiten mit RNA.....	24
2.1.3.3 Lösungen für chemisches / proteinchemisches Arbeiten.....	25
2.1.3.4 Kulturmedien/Lösungen für die Arbeit mit Mikroorganismen.....	28
2.1.3.5 Kulturmedien/Lösungen für die Arbeit mit Zellkulturen von <i>Ginkgo biloba</i>	29
2.2 Laboreinrichtung	32
2.2.1 REINSTWASSERAUFBEREITUNG.....	32
2.2.2 STERILISATIONSMETHODEN.....	32
2.2.3 REINRAUMBEDINGUNGEN/LAMINAR AIRFLOW.....	32
2.2.4 SONSTIGE GERÄTE UND EINRICHTUNGEN.....	33
2.3 Biologisches Material	34
2.3.1 MIKROORGANISMEN.....	34
2.3.1.1 Kultivierung und Konservierung von Mikroorganismen.....	35
<i>Escherichia coli</i>	35
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
2.3.1.2 Messung der Zellzahl von Mikroorganismen.....	36
2.3.2 PFLANZLICHE ZELLKULTUREN VON <i>GINKGO BILOBA</i>	37
2.3.2.1 Anlegen und Erhalten von pflanzlichen Zellkulturen.....	37
Auflegen von Pflanzenteilen zur Erzeugung von Kallus-Kulturen.....	38
Anlegen und Erhaltung von Zellsuspensionskulturen.....	38
2.4 Methoden der Molekularbiologie	39
2.4.1 ISOLIERUNG VON GENOMISCHER DNA.....	39
2.4.1.1 Isolierung von genomischer DNA aus Bakterien.....	39

2.4.1.2	Isolierung von genomischer DNA aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
2.4.1.3	Isolierung von genomischer DNA aus pflanzlichem Gewebe.....	41
2.4.2	ISOLIERUNG PLASMID-DNA AUS <i>E. COLI</i>	42
2.4.2.1	Isolierung Plasmid-DNA im Kleinmaßstab (bis 10 µg).....	42
2.4.2.2	Isolierung Plasmid-DNA im Großmaßstab (10 µg-200 µg).....	43
2.4.3	ISOLIERUNG VON MESSENGER-RNA [POLY(A+)RNA] AUS PFLANZLICHEM GEWEBE.....	43
2.4.4	REINIGUNG, KONZENTRIERUNG UND QUANTIFIZIERUNG VON NUKLEINSÄUREN.....	44
	Reinigung von Nukleinsäuren.....	44
	Konzentrierung von Nukleinsäuren.....	45
	Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	45
2.4.5	AGAROSE-GELELEKTROPHORESE.....	46
2.4.5.1	Native Agarose-Gelelektrophorese.....	46
2.4.5.2	Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese.....	47
2.4.5.3	Dokumentation der Gelelektrophorese.....	48
2.4.5.4	Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	48
2.4.6	HYDROLYSE VON DNA DURCH TYP-II-RESTRIKTIONSENDONUCLEASEN.....	49
2.4.7	KLONIERUNG VON DNA.....	50
2.4.7.1	Ligation.....	50
2.4.7.2	Klonierung von <i>Taq</i> -generierten PCR-Produkten in T-Überhangvektoren.....	51
	TOPO TA [®] -Cloning Kit (Invitrogen).....	51
	pGem-T-easy-Cloning-Kit (Promega).....	52
	Erzeugung eines T-Überhangvektors.....	52
2.4.8	TRANSFORMATION VON BAKTERIEN MIT PLASMID-DNA.....	53
	Erzielen der Transformationskompetenz nach Inoue et al.....	53
	Transformation mittels Hitzeschockverfahren.....	54
	Kontrolle des Transformationsergebnisses.....	55
2.4.9	TRANSFORMATION VON <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> MIT PLASMID-DNA.....	55
	Erzielen der Transformationskompetenz.....	55
	Transformation der Hefe-Zellen.....	56
	Kontrolle der Transformationsergebnisses.....	56
2.4.10	DIE POLYMERASE-KETTEN-REAKTION (PCR).....	57
	Reaktionsbedingungen und technische Voraussetzungen der PCR.....	57
	Zusammensetzung des Reaktionsgemisches.....	58
2.4.11	DIE REVERSE TRANSKRIPTIONS-PCR (RT-PCR).....	59
	Reverse Transkription.....	60
	Polymerase-Ketten-Reaktion.....	62
	Eintopfreaktion.....	62
2.4.12	RAPID AMPLIFICATION OF cDNA ENDS (RACE).....	62
2.4.12.1	3'-RACE-PCR.....	63
	Reverse Transkription.....	63
	PCR-Reaktion 1.....	64
	PCR Reaktion 2 (Nested PCR).....	65
2.4.12.2	5'-RACE- / SMART-RACE-PCR.....	65
	PCR-Reaktion 1.....	67
	PCR Reaktion 2 (Nested PCR).....	67
2.4.13	BESTIMMUNG DER BASENFOLGE VON DNA DURCH AUTOMATISCHE SEQUENZIERUNG.....	68
	Sequenzierreaktion.....	69
	Trennung und Detektion.....	70
	Auswertung der Sequenzergebnisse.....	71
2.4.14	HYBRIDISIERUNG MIT RNA ALS ZIELMOLEKÜL.....	71
2.4.14.1	Herstellung von markierten Sonden.....	72
	PCR-gestützte Markierung von Sonden.....	72
2.4.14.2	Transfer von RNA auf Nylon-Membranen, Northern Blot.....	72

Trennung der RNA.....	72
Transfer („Northern-Blot“).....	73
2.4.14.3 Prehybridisierung/Hybridisierung.....	73
2.4.14.4 Detektion.....	74
2.5 Methoden der Proteinchemie	76
2.5.1 PROTEINQUANTIFIZIERUNG NACH BRADFORD.....	76
2.5.2 DENATURIERENDE PROTEINACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE – SDS-PAGE.....	76
Probenvorbereitung.....	77
Elektrophorese.....	77
Detektion.....	78
2.5.3 GEWINNUNG EINES REKOMBINANTEN FUSIONSPROTEINS MIT DEM pMAL-SYSTEM (NEW ENGLAND BIOLABS).....	78
2.5.3.1 Der Proteingewinnung vorgeschaltete Schritte.....	78
Transformation des Zielplasmids.....	78
Induktion der Proteinproduktion.....	79
Induktionskontrolle.....	80
2.5.3.2 Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie an einer Amylose-Matrix.....	80
Faktor Xa-Hydrolyse des Fusionsproteins mit der Protease Faktor Xa.....	81
2.5.4 GEWINNUNG EINES REKOMBINANTEN PROTEINS MIT DEM pQE ₃₀ -HEFE-SYSTEM (QIAGEN).....	82
2.5.4.1 Der Proteingewinnung vorgeschaltete Schritte.....	82
Transformation mit dem Zielplasmid.....	82
Induktion der Proteinproduktion.....	82
Induktionskontrolle.....	83
2.5.5 WESTERN-TRANSFER VON PROTEINEN UND NACHWEIS SPEZIFISCHER PROTEINSTRUKTUREN MIT ANTIKÖRPERN (ELISA).....	83
3 ERGEBNISSE	85
3.1 Vergleich der sor-ähnlichen Gene und Proteine im System	85
3.1.1 SEQUENZANALYSE AUF AMINOSÄUREEBENE.....	85
3.1.2 SYNTHESE DER DEGENERIERTEN PRIMER.....	87
3.2 Klonierung eines sor-homologen Gens aus <i>Ginkgo biloba</i>	88
3.2.1 NACHWEIS EINER sor-HOMOLOGEN SEQUENZ IM GENOM VON <i>GINKGO BILOBA</i>	90
3.2.2 NACHWEIS DER EXPRESSION.....	91
3.2.2.1 RT-PCR – Einschrittreaktion zum Nachweis der Genexpression.....	91
3.2.2.2 Northern Blot zum Nachweis der Genexpression.....	92
3.2.3 RACE-PCR.....	92
3.2.3.1 Qualität der mRNA für die RACE-PCR.....	93
3.2.3.2 3'-RACE-PCR zur Klonierung des 3'-Endes der sor-cDNA.....	94
3.2.3.3 5'-RACE-PCR zur Klonierung des 5'-Endes der sor-cDNA.....	95
3.2.3.4 Gesamt-cDNA des sor-ähnlichen Gens aus <i>Ginkgo biloba</i> und offener Leserahmen (ORF) des Gens.....	97
3.2.4 KLONIERUNG DES OFFENEN LESERAHMENS DES sor-HOMOLOGEN GENS AUS <i>GINKGO BILOBA</i>	100
3.3 Heterologe Expression des sor-ähnlichen Gens aus <i>Ginkgo biloba</i>	101
3.3.1 PROKARYONTISCHE EXPRESSION IN <i>ESCHERICHIA COLI</i> MIT DEM pMAL™ PROTEIN FUSION AND PURIFICATION SYSTEM.....	102
3.3.1.1 Klonierungsstrategie.....	102
3.3.1.2 Expressionsergebnisse und Proteinreinigung.....	103
3.3.2 EUKARYONTISCHE EXPRESSION IN <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	105
3.3.2.1 Das pQE-30-Hefe-System.....	105
3.3.2.2 Klonierungsstrategie.....	105
3.3.2.3 Expressionsergebnisse.....	106
3.4 Komplementierungsversuche mit <i>Cercospora nicotianae</i>	107

3.4.1	KOMPLEMENTIERUNG VON <i>SOR</i> -DEFIZIENTEN <i>CERCOSPORA NICOTIANAE</i> -MUTANTEN MIT DEM <i>SOR</i> -HOMOLOGEN GEN AUS <i>GINKGO BILOBA</i>	107
3.4.1.1	Klonierungsstrategie.....	108
3.4.1.2	Ergebnisse der Komplementierungsversuche (Dr. M. Ehrenshaft, Persönliche Mitteilung).....	108
4	DISKUSSION	111
4.1	Überlegungen zur Biosynthese von Vitamin B₆ in <i>Ginkgo biloba</i>	111
4.1.1	DIE GENE DER <i>SOR</i> (<i>PDX1</i>)- UND <i>SNO</i> (<i>PDX2</i>)-FAMILIE.....	111
4.1.2	EVIDENZEN FÜR ZWEI UNABHÄNGIGE BIOSYNTHESEWEGE DES VITAMIN B ₆ IN DER NATUR.....	113
4.2	<i>Sor</i>-homologe Sequenz aus <i>Ginkgo biloba</i>	115
4.3	Funktionsnachweis des <i>Sor</i>-Proteins: Zellfreies System nach Fiehe (1999) und Komplementierungsversuche mit <i>Cercospora nicotianae</i>	116
4.3.1	KOMPLEMENTATION VON <i>CERCOSPORA NICOTIANAE</i> -MUTANTEN.....	117
4.3.2	ZELLFREIES SYSTEM NACH FIEHE (1999).....	118
4.4	Welches Biosynthesystem benutzt <i>Ginkgo biloba</i>?	119
4.4.1	HYPOTHESEN ZUR VITAMIN B ₆ -BIOSYNTHESE IN <i>GINKGO BILOBA</i>	121
4.4.1.1	Ergebnisse verschiedener Tracer-Experimenten	121
4.4.1.2	ATP zum Molekülaufbau – Pyridoxin-Biosynthese analog der Histidin-Biosynthese.....	125
4.4.1.3	Pentose oder Pentulose als Vorstufe – Pyridoxin-Biosynthese analog der Purinbiosynthese... ..	125
4.5	Ausblick	128
4.5.1	VERSUCHSPLANUNG AUF GENETISCHER EBENE.....	128
4.5.2	VERSUCHSPLANUNG AUF BIOCHEMISCHER EBENE.....	129
	Enzymatischer Zugang.....	129
	Tracer Studien.....	130
5	ZUSAMMENFASSUNG	133
6	LITERATUR	135
7	ANHANG	143
7.1	Datenerhebungen im Rahmen der Klonierung des <i>sor</i>-homologen Gens aus <i>Ginkgo biloba</i>	143
7.1.1	PRIMERDIAGRAMM.....	143
7.1.2	CODON GEBRAUCH RELEVANTER ORGANISMEN.....	144
7.1.3	<i>SOR</i> -cDNA AUS <i>GINKGO BILOBA</i>	145
7.1.4	VORKOMMEN <i>SOR/SNO</i> - UND <i>PDXA/J</i> -HOMOLOGER SEQUENZEN IN DEN PHYLA (ABTEILUNGEN) UND ORDNUNGSTYPEN.....	149
7.2	Karten der verwendeten Vektoren	152
7.2.1	KARTEN DER KLONIERUNGS- UND SEQUENZIERUNGSPASMIDE.....	152
7.2.1.1	pBluescript® II SK(-) und pBlueT.....	152
7.2.1.2	pGem3Zf(+) [®]	152
7.2.1.3	pCR®2.1-TOPO.....	152
7.2.1.4	pGem-Teasy®.....	152
7.2.2	EXPRESSIONSPASMIDE.....	152
7.2.2.1	pBargpe1.....	152
7.2.2.2	pMal-c2 [®]	152
7.2.2.3	pQE30Yeast [®] 30.....	153

7.3 Herstellerangaben	153
7.3.1 HERSTELLERANGABEN – DNA-EXTRAKTION AUS AGAROSE-GEL.....	153
7.3.2 HERSTELLERANGABEN – WIZARD-PLUS® PLASMID ISOLIERUNG, PROMEGA.....	153
7.3.3 HERSTELLERANGABEN – TOPO TA CLONING®, INVITROGEN.....	153
7.3.4 HERSTELLERANGABEN – pGEMT-EASY® CLONING, PROMEGA.....	153
7.3.5 HERSTELLERANGABEN – QUICKPREP® MICRO mRNA PURIFICATION KIT, PHARMACIA BIOTECH.....	153
7.3.6 HERSTELLERANGABEN – READY TO GO RT-PCR BEADS, PHARMACIA BIOTECH.....	154

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ac	Acetat
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxydisulfid
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
CCD	conserved domain database (Datenbank für konservierte Proteinsequenzen)
cfu	colony forming units = Kolonie bildende Einheiten
Cl	Chlorid
Da	Dalton (entspricht 1/12 Masse von ¹² C)
dNTP	2-Desoxynukleotide
ddNTP	2,3-Didesoxynukleotide
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig (Internet: www.dsmz.de)
DNA	2-Desoxyribonukleinsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EMBL	European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg
fmol	Femtomol
g	Erdbeschleunigung
K	Kalium
kb	Kilobasen = 1.000 Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton = 1.000 Dalton
lm	Lumen [1 lm = 1 cd (Candela) • 1sr (Steradian)]
lx	Lux, Einheit der Lichtstärke (1 lx = 1 lm/m ²)
M	Molarität in g/Mol
MBP	Maltose-Bindeprotein
MeOH	Methanol

Na	Natrium
NCBI	National Center of Biological Information
nm	Nanometer
ORF	engl.: <u>o</u> pen <u>r</u> eadin <u>g</u> <u>f</u> rame, dt.: offener Leserahmen
Pfam	Namenssuffix einer Proteinfamilie
Pi	Phosphat
PEG	Polyethylenglycol
PVDF	Polyvinylidenfluorid
q.s.	quantum satis, die nötige Menge
RNA	Ribonukeinsäure
rpm	rounds per minute = Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
?T	Schmelztemperatur von Oligonukleotiden in °C
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
TE	Tris/EDTA-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane
üN	über Nacht
üN-Kultur	Übernachtkultur
V	Volt
VT	Volumenteile

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.1 Die Vitamere der B₆-Gruppe sind durch den „Salvage Pathway“ ineinander überführbar S.2
- Abbildung 1.2 PLP-Substratbindung in PLP-abhängigen Enzymenreaktionen S.3
- Abbildung 1.3 Vergleich der Biosynthesewege von 4-Phosphohydroxy-L-threonin und 3-Phospho-L-Serin in *Escherichia coli* S.5
- Abbildung 1.4 Biosyntheseweg von Pyridoxin-5'-Phosphates in *Escherichia coli* S.7
- Abbildung 1.5 4'-O-Methylpyridoxin und 4'-O-Methylpyridoxin-5'-Phosphat (Ginkgotoxin) S.9
- Abbildung 2.1 Ablaufschema der 3'-RACE-PCR S.64
- Abbildung 2.2 Ablaufschema der 5'-SMART-RACE-PCR S.66
- Abbildung 2.3 Aufwärtsgerichteter Kapillartransfer für Nukleinsäuren aus Agarose-Gelen (nach *Sambrook et al., 1989*) S.73
- Abbildung 3.1 Vergleich *sor*-homologer Proteine aus Eukaryonten und einem Prokaryonten S.86
- Abbildung 3.2 Strategie zum Nachweis und zur Klonierung eines *sor*-homologen Gens aus *Ginkgo biloba* S.89
- Abbildung 3.3 Agarose-Gelelektrophorese der 3'-RACE-PCR-Versuche S.94
- Abbildung 3.4 Agarose-Gelelektrophorese der 5'-RACE-PCR-Reaktionen S.96
- Abbildung 3.5 Relative Lage der durch die beschriebenen PCR-Methoden erhaltenen DNA-Amplifikate S.97
- Abbildung 3.6 Kartierung der möglichen Leserahmen in der *sor*-homologen cDNA von *Ginkgo biloba* S.98
- Abbildung 3.7 Vergleich *sor*-homologer Proteine aus Eukaryonten und einem Prokaryonten (Ergänzung) S.99
- Abbildung 3.8 Klonierungsschema der Konstrukte für das pMal-System S.102
- Abbildung 3.9 SDS-PAGE der Induktionskontrolle. S.103
- Abbildung 3.10 Reinigung des Fusionsproteins S.104
- Abbildung 3.11 Klonierungsschema der Konstrukte für das pQE₃₀-Y-System S.105
- Abbildung 3.12 SDS-PAGE der Induktionskontrolle. S.106
- Abbildung 3.13 Klonierungsstrategie der Komplementierungskonstrukte S.108
- Abbildung 4.1 Ergebnisse der Tracer-Studien verschiedener Arbeitsgruppen an *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Ginkgo biloba* (Teil 1) S.122
- Abbildung 4.2 Ergebnisse der Tracer-Studien verschiedener Arbeitsgruppen an *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Ginkgo biloba* (Teil 2) S.123

Abbildung 4.3 Ergebnisse der Tracer-Studien verschiedener Arbeitsgruppen an
Escherichia coli, *Saccharomyces cerevisiae* und *Ginkgo biloba*
(Teil 3) S.124

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	Vorkommen des <i>pdx1</i> -Gens und der aus <i>Escherichia coli</i> bekannten Gene <i>pdxA</i> und <i>pdxJ</i> in Organismen deren Genom partiell oder komplett ^a sequenziert ist	S. 12
Tabelle 2.1	Bezugsquellen wichtiger Chemikalien	S. 15
Tabelle 2.2	Desoxyoligonukleotide („Primer“)	S. 16
Tabelle 2.3	Klonierungs- und Sequenzierungsplasmide	S. 18
Tabelle 2.4	Expressionsplasmide	S. 19
Tabelle 2.5	eigene Klonierungs- und Sequenzierungskonstrukte	S. 19
Tabelle 2.6	eigene Expressionskonstrukte	S. 19
Tabelle 2.7	Enzyme, Größenstandards und Reagenziensätze	S. 20
Tabelle 2.8	Material für Chromatographie, Filtration und Blotting	S. 21
Tabelle 2.9	Lösungen für Arbeiten mit DNA	S. 22
Tabelle 2.10	Lösungen für die Arbeit mit RNA	S. 24
Tabelle 2.11	Puffer für chemisches/proteinchemisches Arbeiten	S. 26
Tabelle 2.12	Medien/Lösungen für die Arbeit mit Mikroorganismen	S. 28
Tabelle 2.13	Antibiotikazusätze zur Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	S. 29
Tabelle 2.14	Kulturmedien / Lösungen für die Arbeit mit Zellkulturen von <i>Ginkgo biloba</i> L.	S. 30
Tabelle 2.15	Mikroorganismen	S. 34
Tabelle 2.16	rekombinante Mikroorganismen	S. 35
Tabelle 2.17	Pflanzliche Zellkulturen aus <i>Ginkgo biloba</i>	S. 37
Tabelle 2.18	Nukleinsäure-Absorptionskoeffizienten A_{260}	S. 45
Tabelle 2.19	Zusammensetzung von Restriktionsansätzen	S. 49
Tabelle 2.20	Zusammensetzung der Ligationsansätze	S. 50
Tabelle 2.21	Zusammensetzung eines Standard-PCR-Reaktionsgemisches	S. 58
Tabelle 2.22	Temperaturschema einer Standard-PCR-Reaktion	S. 59
Tabelle 2.23	Mögliche Reaktionsansätze zur Reversen Transkription	S. 61
Tabelle 2.24	Zusammensetzung einer Sequenzierreaktion	S. 69
Tabelle 3.1	Paarweise Berechnung der Identität/Divergenz der in Abbildung 3.1 verglichenen <i>sor</i> -homologen Proteinsequenzen	S. 87
Tabelle 3.2	Paarweise Berechnung der Identität/Divergenz der in Abbildung 3.1 verglichenen <i>sor</i> -homologen Proteinsequenzen	S. 100
Tabelle 7.1	Vorkommen der <i>sor(pdx1)</i> -, <i>sno(pdx2)</i> - bzw <i>pdxA/pdxJ</i> -homologer Sequenzen in den Genomen von Organismen aus verschiedenen Phyla	S. 149

1 EINLEITUNG

Obwohl Vitamin B₆ eine essentielle Komponente des Stoffwechsels aller Lebewesen ist, ist seine Biosynthese nur im Enterobakterium *Escherichia coli* gut studiert. Über die Biosynthese des Vitamin in anderen Bakterien sowie Organismen der übrigen Phyla herrscht größtenteils Unklarheit.

1.1 Die Vitamere der B₆-Gruppe

Vitamin B₆ spielt eine zentrale Rolle im Stoffwechsel aller Organismen. Wie die Stoffe Thiamin (Vitamin B₁), Riboflavin (Vitamin B₂), Cyanocobalamin (Vitamin B₁₂), Pantothersäure, Nikotinsäure (-amid) und Folsäure gehört es zum Vitamin B-Komplex. Chemisch betrachtet verbergen sich hinter der Bezeichnung sechs ähnliche Stoffe mit einem Pyridin-Grundgerüst und verschiedenen funktionellen Gruppen (siehe *Abbildung 1.1*): Pyridoxin (PN), Pyridoxal (PL), Pyridoxamin (PM), sowie deren 5'-Phosphorsäureester (PNP, PLP, PMP). Die Nomenklatur der einzelnen als „Vitamere“ bezeichneten Stoffe war lange Zeit nicht eindeutig und führte seit der Entdeckung der Leitsubstanz Pyridoxin im Zusammenhang mit der Untersuchung des Vitamin B₂-Mangelsyndroms Pellagra in den 30er Jahren des letzten Jahrhunderts immer wieder zu Verwirrung. Als erster Stoff der Gruppe wurde Pyridoxin (PN) als 4,5-Di(hydroxymethyl)-2-methylpyridin-3-ol beschrieben. Aufgrund der prominenten alkoholischen Gruppe am 4'-Kohlenstoffatom empfahl die IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) den Namen Pyridoxol, revidierte diesen jedoch später, als es zu Verwechslungen mit dem analogen Aldehyd Pyridoxal kam.

Schon 1939 gelang einer japanischen und einer deutschen Arbeitsgruppe die chemische Synthese des Pyridoxins durch Abbau des Isochinolins 3-Methoxy-2-methylisochinolin. Seither wurden zahlreiche weitere Synthesewege erarbeitet. *Islar (1988)* gibt einen Überblick über diese Verfahren und beschreibt die heute gebräuchliche Methode zur großtechnischen Produktion von Pyridoxin: Auf der Basis einer Diels-Alder-Kondensation von Oxazolen mit Malein- oder Fumarsäurederivaten wird nach weiteren Modifikationen des Moleküls Pyridoxin erhalten. Auf diese Weise werden jährlich ca. 1700 t der Vitamere produziert (*Römpp [Begr.], 1995*).

Nur Pflanzen und Mikroorganismen sind in der Lage, die Vitamere der B₆-Gruppe *in vivo* zu synthetisieren. Für tierische Organismen haben die Verbindungen Vitamincha-

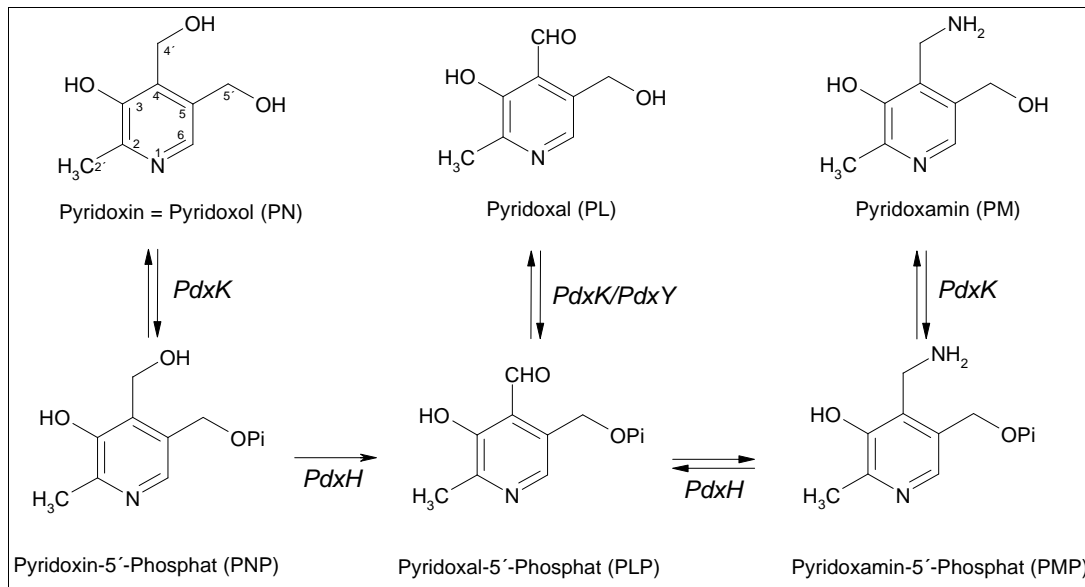


Abbildung 1.1 Die Vitamere der B₆-Gruppe sind durch den „Salvage Pathway“ ineinander überführbar

Die Pyridoxinkinase *PdxK* vermag in *Escherichia coli* alle drei unphosphorylierten Vitamere (PN, PL, PM) an Position 5' zu phosphorylieren. Das Isoenzym *PdxY* ist in dem Bakterium spezifisch für Pyridoxal. Durch die Oxidoreduktase *PdxH* (Pyridoxamin-5'-Phosphat: O₂-Oxydoreduktase [EC 1.4.3.5]) können Pyridoxin-5'-Phosphat (PNP) und Pyridoxamin-5'-phosphat (PMP) in Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP) überführt werden. Diese Oxidation gelingt nicht mit den unphosphorylierten Produkten PN, PL und PM (*Notheis, 1995*). Verschiedene Autoren vermuten, daß der Salvage-Pathway in zahlreichen Organismen – auch solchen, die nicht zur Vitamins B₆-Biosynthese befähigt sind – existiert (*Mittenhuber, 2001*).

rakter. Allen Organismen gemeinsam ist jedoch die Fähigkeit, die Vitamere über den sogenannten *Salvage-Pathway* ineinander zu überführen (vgl. *Abbildung 1.1, Seite 2*). Über die Enzyme *PdxK/PdxY* und *PdxH* ist es ihnen möglich, die physiologisch aktiven Formen Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP) und Pyridoxamin-5'-Phosphat (PMP) unabhängig von der aufgenommenen Struktur zu erzeugen (*Wada und Snell, 1961*). Als Coenzyme sind sie beteiligt an zahlreichen Stoffwechselreaktionen, vor allem an solchen des Aminosäurestoffwechsels wie z. B. Decarboxylierungen, Transaminierungen, H₂O-/H₂S-Abspaltungen, Aminosäurespaltungen, etc. Ihre Funktionen entfalten sie immer über die Bildung einer Schiffsbasis der Aldehyd- oder Amino-Funktion am 4'-C-Atom des Vitamins mit dem α-Kohlenstoffatom des Substrates. *Hayashi (1995)* gibt einen Überblick über die Reaktionen und den Mechanismus PLP-abhängiger Enzyme. In allen Fällen dieser Reaktionskatalyse wird eine Bindung des α-Kohlenstoffatoms labilisiert (vgl. *Abbildung 1.2, Seite 3*) und in der Folge vom Enzym geöffnet. Die Schiffsbasis wird anschließend hydrolysiert (*Stryer 1996*).

1.2 Biosyntheseweg der Pyridoxin-Vitamere

Obwohl seit dem Ende der 30er Jahre des 20. Jahrhunderts eine Möglichkeit der chemischen Synthese des Pyridoxins bekannt ist, ist bis heute nicht vollständig geklärt, wie die Natur diese Strukturen erhält. Gründe hierfür sind u. a. das relativ geringe Molekulargewicht sowie die damit verbundene einfache Struktur. Da die Vitamere der B₆-Gruppe klassische Vertreter des Primärstoffwechsels darstellen (*Leistner [1993], vgl. auch Kapitel 1.3, Seite 8*), sollte sich ihr Aufbau auf Metabolite zurückführen lassen, die ebenfalls ein geringes Molekulargewicht besitzen und gleichzeitig in zahlreichen anderen Stoffwechselwegen zugegen sind. Da die Untersuchung von Biosynthesewegen zu Beginn der Forschung an den B₆-Vitaminen zu einem großen Teil auf der Isolierung von Intermediaten eines Stoffwechselweges fußte, wirkte sich dieses Handicap besonders nachteilig aus. Auch die in der Biosyntheseforschung üblichen Einbauexperimente mit Isotopenmarkierten Vorstufen können in diesem Fall problematisch sein. Durch die Abwanderung des markierten Substrates in benachbarte Stoffwechselwege entsteht entweder eine mit Detektionsproblemen verbundene Verdünnung der Nuklidmarkierung in der zu analysierenden Verbindung oder - je nach Markierungsart des Substrates - das Risiko, einen falschen Metaboliten zu verfolgen.

Erst der Einsatz molekularbiologischer Methoden in Kombination mit herkömmlichen Analysetechniken führte im Laufe der Zeit zu einem umfangreichen Verständnis des Biosyntheseweges des Vitamin-B₆-Komplexes im Enterobakterium *Escherichia coli*. Es kann davon ausgegangen werden, daß der Biosyntheseweg im aeroben sowie anaeroben Stoffwechselzustand bis auf wenige mechanistische Fragestellungen verstanden wird. *Abbildung 1.4, Seite 7*, faßt den Stand der Forschung zur Biosynthese des Vitamin B₆-Komplexes in *Escherichia coli* zusammen, wie er sich zu Beginn der vorliegenden Arbeit darstellte:

Dempsey erzeugte als erster in großer Zahl Mutanten des Enterobakteriums *Escherichia coli*, die eine Vitamin B₆-Auxotrophie besaßen. In Abhängigkeit von den Nährstoffen, die diese Auxotrophie supplementierten, ließen sich alle der über 250 Mutanten in fünf Gruppen klassifizieren (*Dempsey, 1969*). Einbaustudien mit nuklidmarkierten Vorstufen (durch Spenser und Hill) seit den achziger Jahren sowie geneti-

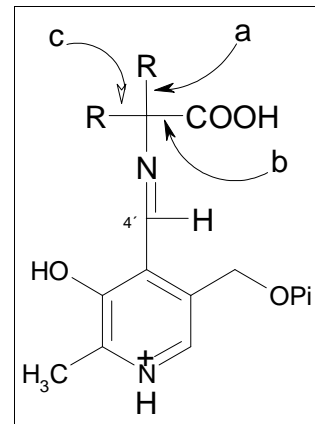


Abbildung 1.2 PLP-Substratbindung in PLP-abhängigen Enzymreaktionen

PLP labilisiert je nach Reaktion eine der gekennzeichneten Bindungen des α -Kohlenstoffatoms im Substrat: **a** bei Aminotransferasen., **b** bei Decarboxylasen oder **c** bei Aldolasen. Die Abbildung wurde Stryer (1996), S. 667, Abb 25.5 entnommen.

sche Studien an den von Dempsey erzeugten Mutanten (Winkler und Mitarbeiter sowie Leistner und Mitarbeiter) führten zu einem eingehenderen Verständnis der einzelnen Biosyntheseschritte.

Die Studien zeigten, daß der Ringbildung des Pyridoxin-Grundgerüsts zwei Vorstufen zugrunde liegen: Die „rechte Seite“ des Moleküls - die Atome N-1, C-6, C-5, und C-5' (in *Abbildung 1.4, Seite 7*, blau dargestellt) - stammt aus der nicht proteino-genen Aminosäure 4-Phosphohydroxy-L-threonin (*Hill und Spenser, 1986, 1996; Drewke, 1993*). Die „linke Seite“ - die Atome C-2', C-2, C-3, C-4, und C-4' (in *Abbildung 1.4, Seite 7*, rot dargestellt) - entsteht aus der Pentose 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat. Diese wird über einen von *Rohmer (1996)* entdeckten alternativen Weg zur Bildung von Isopreneinheiten zur Verfügung gestellt wird.

Biosynthese des 4-(Phosphohydroxy)-L-threonins in Escherichia coli

Die Biosynthese der Vorstufe 4-Phosphohydroxy-L-threonin geht von der im Calvin-Zyklus gebildeten Aldose Erythrose-4-Phosphat aus (siehe *Abbildung 1.3, Seite 5*). Diese wird durch die NAD⁺-abhängige Erythrose-4-Phosphat-Dehydrogenase (*Epd*) zur entsprechenden Säure oxidiert. Zaoh und Winkler gelang es, das Enzym zu reinigen und zu charakterisieren (*Zaoh et al., 1998*). Yang und Winkler klonierten das schon als *gapB* bekannte, später in *epd* umbenannte, zugehörige Gen. Die Gensequenz besitzt große Homologie zur Sequenz der aus dem Serinstoffwechsel bekannten Dehydrogenase *gapA*, die Glycerinaldehyd-3-phosphat oxidiert. *Epd*, das zur Pyridoxin-5'-Phosphat-Synthese benötigt wird, kann durch das Enzym *GapA* des Serinstoffwechsel ersetzt werden (*Yang et al., 1998b, vgl. Abbildung 1.3, Seite 5*).

Im Folgeschritt der 4-Phosphohydroxy-L-threonin-Synthese wird 4-Phosphoerythronat durch das ebenfalls NAD⁺-abhängige Enzym Erythronat-4-phosphat-Dehydrogenase (*PdxB*) am α -Kohlenstoffatom zum Keton oxidiert. *Schoenlein et al. (1989)* gelang die Klonierung des zugrundeliegenden Gens. Die Gensequenz besitzt ebenfalls große Homologie zu der der Dehydrogenase *SerA*, die im Serin-Biosyntheseweg analog Pyruvat bildet. Die bis dahin nur auf Sequenzvergleichen beruhende Datenlage konnte von Leistner und Mitarbeitern durch Komplementierungsstudien an *pdxB*- und *pdxC*-Mutanten von *Escherichia coli* untermauert werden: Die Experimente zeigten, daß beide Gene zum untersuchten Biosyntheseweg gehören (*Drewke et al., 1993*).

Im folgenden Schritt der 4-Phosphohydroxy-L-threonin-Bildung wird die zuvor durch *PdxB* erhaltene α -Ketosäure durch eine 4-Phosphohydroxy-L-threonin: α -Ketoglutarat-Transaminase (*PdxC/SerC*) transaminiert (*Abbildung 1.3*). Das für das Enzym *PdxC* kodierende Gen *pdxC* war im Gegensatz zu den zuvor besprochenen Genen *epd* und *pdxB* identisch mit *serC* des *Serin-Stoffwechsels*. Werden in *E. coli* in den beiden ersten Stufen der parallelen Synthesewege zwei homologe, aber unterschiedliche Gene

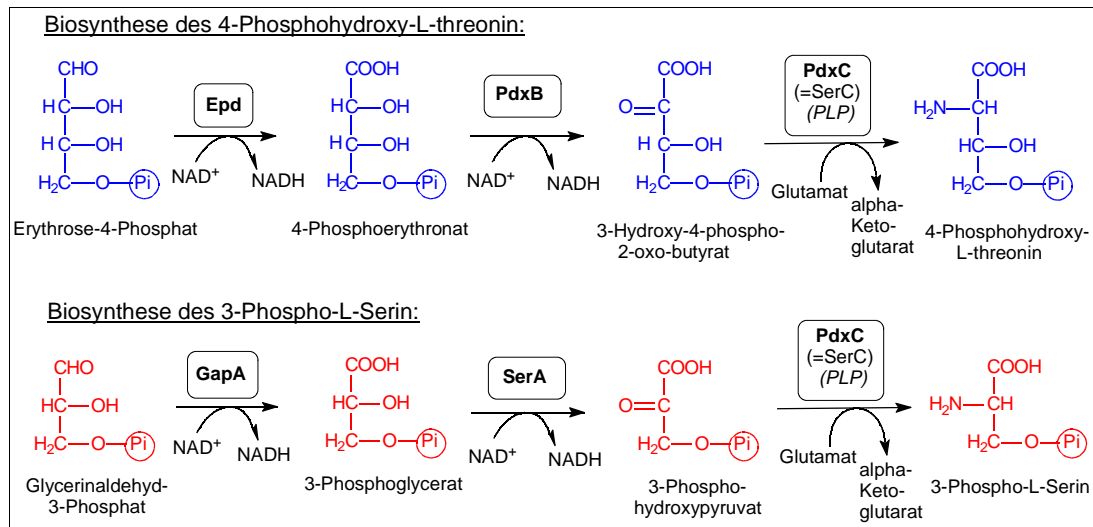


Abbildung 1.3 Vergleich der Biosynthesewege von 4-Phosphohydroxy-L-threonin und 3-Phospho-L-Serin in *Escherichia coli*

Die beteiligten Enzyme sind: Erythrose-4-phosphat-Dehydrogenase (*Epd*), Erythronat-4-Phosphat-Dehydrogenase (*PdxB*), 4-Phosphohydroxy-L-threonin:α-Ketoglutarat-transaminase (*PdxC/SerC*), Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*GapA*), 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase (*SerA*), NAD⁺ und NADH sind Redoxäquivalente, PLP ist Pyridoxal-5'-Phosphat.

und damit Enzyme verwendet (vgl. *Abbildung 1.3, Seite 5*), so wird der letzte Schritt beider Aminosäuresynthesewege durch ein und dasselbe Enzym katalysiert (*Lam et al., 1990*). Die Arbeitsgruppen von Leistner und Winkler konnten anhand von Enzyminkubationen mit einem *PdxC*-Fusionsprotein (*Drewke et al., 1996; Zaoh et al., 1996*) zeigen, daß dieses Protein eine Glutamat-abhängige Transaminase ist, die – wie alle derartigen Transaminasen – Pyridoxalphosphat als Cofaktor benötigt. Dieses Ergebnis verdeutlicht, daß das aus 4-Phosphohydroxy-L-threonin gebildete B₆-Vitamin an seiner eigenen Biosynthese beteiligt sein muß. Desweiteren konnte gezeigt werden, daß *PdxC* im Serin- wie im Threonin-Stoffwechsel phosphorylierte Edukte umsetzt. Diese Feststellung implizierte, daß das im weiteren Verlauf der Biosynthese aus der Ringschluß-Reaktion durch *PdxA/PdxJ* (siehe *Abbildung 1.4, Seite 7*) gebildete Primär-Vitamin ebenfalls ein phosphoryliertes Produkt sein sollte.

Im letzten Schritt vor dem Ringschluß zum Pyridin wird das gebildete 4-Phosphohydroxy-L-threonin oxidativ decarboxyliert (vgl. *Abbildung 1.4, Seite 7*). In einer durch die NAD-abhängige 4-Phosphohydroxy-L-threonin-Dehydrogenase (*PdxA*) katalysierten Reaktion wird zunächst der zur Carbonsäure β-ständige Alkohol zum Keton 2-Amino-3-oxo-4-(phosphohydroxy)-butyrat oxidiert (*Cane et al., 1998*). Dadurch entsteht ein acides Proton am α-Kohlenstoffatom. In einer Decarboxylierung, deren Mechanismus nicht vollständig geklärt ist, entsteht 3-Phosphohydroxy-1-aminoaceton. Dieses geht eine darauffolgende Ringschlußreaktion mit 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat ein (siehe *Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat*).

Biosynthese von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphates in Escherichia coli

Die zweite, neben der Aminosäure 4-Phosphohydroxy-L-threonin, zur Bildung des Pyridin-Ringsystems benötigte Komponente ist 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (siehe *Abbildung 1.4, Seite 7*). Ihre Synthese wird katalysiert durch die Transketolase 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase (*Dxs*). Das Enzym kondensiert durch Thiaminpyrophosphat aktiviertes Pyruvat mit Glycerinaldehyd-3-phosphat (*Lois et al., 1998*). Das für das Protein kodierende Gen (*dxs*) ist in *Escherichia coli* mit den für Farnesyldiphosphat-Synthasen kodierenden Genen *ispA* und *ispB* zusammen in einem Operon lokalisiert (*Lois et al., 1998; Sprenger et al., 1997*). Diese Lokalisation bedingt, daß die Kontrolle der Expression des Gens im Zusammenhang mit dem übrigen Operon erfolgt (siehe unten und vgl. *Kapitel 4.1.2, Seite 113*). Diese in Pflanzen und Mikroorganismen – aber nicht in Tieren - vorkommende Transketolase (*Lange et al., 1998*) bildet eine hochkonservierte Genfamilie. Sie ist Teil eines von Rohmer entdeckten alternativen, von Mevalonat unabhängigen Syntheseweges für Isoprene in diesen Organismen (*Rohmer et al., 1996*).

Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat

Die Funktion des „Ringschluß-Enzyms“ *PdxJ* in *Escherichia coli* wurde von *Laber et al. (1999)* geklärt. Der Gruppe gelang es, die Funktion dieses Proteins *in vitro* nachzuweisen. Um das Produkt der *PdxA*-Reaktion zur Verfügung zu stellen, verwendeten sie ein System, das neben den Vorstufen 1-Desoxy-D-xylulose und 4-Phosphohydroxy-L-threonin auch *PdxA* und NAD beinhaltet. Sie zeigten, daß nur unter Zusatz von *PdxJ* Pyridoxin-5'-Phosphat gebildet wird. Aus dem weiteren Befund, daß beide Vorstufen nur in der phosphorylierten Form in die *PdxJ*-Reaktion eingehen und Pyridoxin-5'-Phosphat liefern, konnten sie weitere Schlußfolgerungen ziehen: Wie schon *Drewke et al. (1996)* und *Zaoh et al. (1996)* folgerten, muß das im Rahmen dieses Biosyntheseschrittes entstehende Vitamer eine Verbindung sein, die an der 5'-Position phosphoryliert ist. Mittels HPLC-Co-Chromatographie konnten Laber und Mitarbeiter diese Verbindung als Pyridoxin-5'-Phosphat identifizieren. Ferner modifizierte die Arbeitsgruppe den von *Cane et al. (1999)* postulierten Mechanismus der Ringschlußreaktion. Dieser Mechanismus kann jedoch nur als hypothetisch gelten und bedarf einer NMR-analytischen Bestätigung.

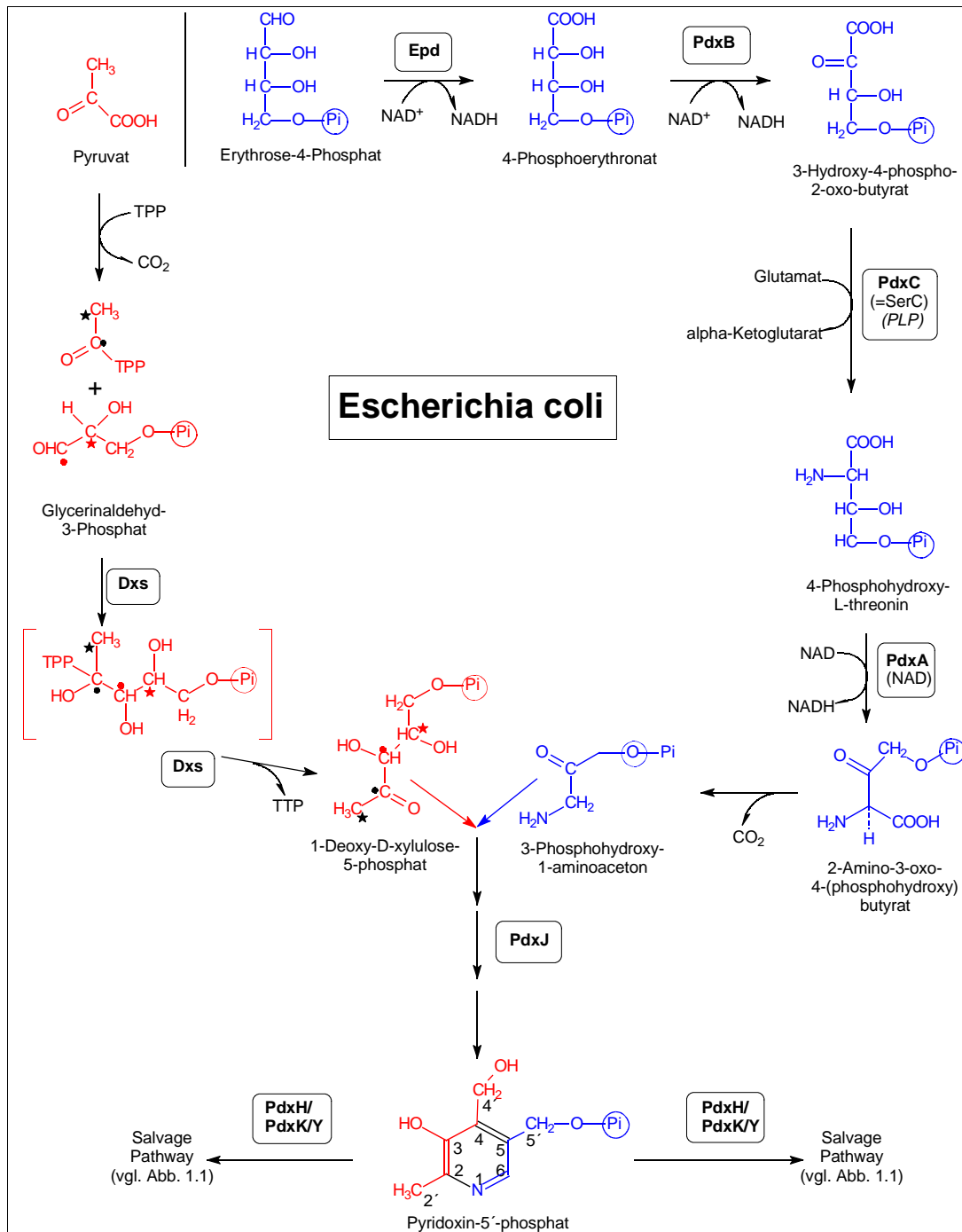


Abbildung 1.4 Biosyntheseweg von Pyridoxin-5'-Phosphates in Escherichia coli

Die beteiligten Enzyme sind: Erythrose-4-phosphat-Dehydrogenase (Epd), Erythronat-4-Phosphat-Dehydrogenase (PdxB), 4-Phosphohydroxy-L-threonin:a-Ketoglutarat-transaminase (PdxC/SerC), 4-Phosphohydroxy-L-threonin-Dehydrogenase (PdxA), Pyridoxinphosphat-Synthase (PdxJ), 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat-Synthase (Dxs). TPP ist Thiaminpyrophosphat. Zu den Enzymen PdxH (Pyridoxamin-5'-Phosphat: O₂-Oxydoreduktase [EC 1.4.3.5]) und PdxK/PdxY (Isoformen der Pyridoxinkinase) siehe *Abbildung 1.1, Seite 2*.

Die genetischen Studien zu den einzelnen an den Biosyntheseschritten beteiligten

Enzymen haben gezeigt, daß die den Enzymen zugrundeliegenden Gene voneinander getrennt im Genom von *Escherichia coli* vorliegen. Aufgrund der Struktur des Genoms dieses Enterobakteriums wäre eine Clusterung der an der Synthese beteiligten Gene zusammen unter der Kontrolle eines eigenen Promotors innerhalb eines Operons zu erwarten gewesen. Ganz im Gegenteil konnten verschiedene Autoren zeigen, daß jedes Gen in einem anderen Operon unter der Kontrolle des jeweiligen Promotors liegt. Bei einer solchen Struktur stellt sich die Frage, wie es dem Organismus gelingt, die jeweiligen Gene zu regulieren, um die für die Synthesen benötigten Enzyme bereitzustellen.

Die 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase (*Dxs*) ist in einem Operon mit Genen lokalisiert, die für den Isoprenstoffwechsels kodieren. In diesem Fall läßt sich nachvollziehen, daß der für die Vitaminsynthese verwendete Teil der durch *Dxs* gebildeten Pentose Desoxyxylulose im Vergleich zum Verbrauch im Isoprenstoffwechsel nur gering ist. Daher dürfte eine zusätzliche Regulation nicht notwendig sein. Gleiches sollte für die Regulation der Transaminase *PdxC/SerC* gelten. Sie stellt primär die Transaminierung der proteinogenen Aminosäure Serin sicher. Auch hier ist die Funktion im Pyridoxinstoffwechsel nur als Nebenreaktion zu verstehen. Anders gestaltet sich die Situation bei den Genen für *Epd* und *PdxB*. In diesem Fall leistet sich der Organismus aus ökonomischer Sicht zusätzliche biosynthetische Strukturen. Anstelle von *Epd* und *PdxB* stehen homologe Proteine des Serinstoffwechsels zur Verfügung (vgl. *Abbildung 1.3, Seite 5*), die diese Aufgabe übernehmen könnten.

Um die regulatorischen Zusammenhänge dieser zunächst aufwendigen Vernetzung der Proteine besser zu verstehen, bedarf es weiterer Untersuchungen der einzelnen Operons sowie des Vergleiches der analogen Strukturen anderer Organismen, die die Biosynthese der B₆-Vitamine auf die gleiche bzw. abweichende Weise vollziehen (vgl. *Kapitel 4.1.2, Seite 113*).

1.3 4'-Methylpyridoxin, ein Strukturanalogon von Vitamin B₆ in *Ginkgo biloba* L.

Botanisch und pharmazeutisch zieht die heute nur noch in Zentralchina natürlich vorkommende Spezies *Ginkgo biloba* L. aus der Familie der *Ginkgoaceae* viel Aufmerksamkeit auf sich. Der oft als „lebendes Fossil“ bezeichnete Baum war schon im Jura ubiquitär verbreitet. Zu dieser Zeit umfaßte die Familie der *Ginkgoaceae* insgesamt ca. 15 Gattungen mit ca. 60 verschiedenen Arten, die sich archäologisch belegen lassen (*Melzheimer, 1992*). Heute existiert aus dieser Familie nur noch der Ginkgo-

Baum, *Ginkgo biloba*, der neben seinem natürlichen Vorkommen weltweit vor allem in Parks und an Wegesrändern kultiviert wird.

Von pharmakologischem Interesse ist er wegen seiner Hauptinhaltsstoffe, der Flavonoidderivate (Flavonglycoside, Proanthocyanidine) und Terpene (Ginkgolide A/B/C/J und Bilobalid, *Hölzl [1992]*), denen zentral und peripher durchblutungsfördernde Wirkungen zugesprochen werden. In Arzneizubereitungen fester und flüssiger Form wird deshalb der Extrakt der Blätter bei zahlreichen Indikationen eingesetzt. Diese reichen in der Praxis von peripheren und zentralen Durchblutungsstörungen, Demenzercheinungen über Schwindel jeglicher Genese bis hin zu durch Mangel durchblutungen hervorgerufenen Ohrgeräuschen (Tinnitus).

Pharmakologisch weit weniger bekannt ist die Tatsache, daß in Blättern und Früchten der Pflanze neben den Vitaminen der B₆-Gruppe ein Antivitamin akkumuliert: 4'-O-Methylpyridoxin und das Phosphorsäureesterderivat 4'-O-Methylpyridoxin-5'-Phosphat bzw. deren Glykoside (*Wada et al. [1985]*, *Arenz et al. [1996]*, siehe *Abbildung 1.5*). Gegenüber dem Vitamin führt die Methylierung der für die Vitamineigenschaft essentiellen funktionellen Gruppe am 4'-Kohlenstoffatom zum Verlust der Cofaktoreigenschaften (vgl. *Abbildung 1.2, Seite 3*). Das Antivitamin kann die für die Vitaminwirkung notwendige Bildung der Schiffsbasis mit einer α -Aminogruppe einer Aminosäure nicht eingehen. Wird dem Organismus neben dem Vitamin auch das Antivitamin zugeführt, sollten beide Verbindungen um die Bindung an Pyridoxal-5'-phosphat abhängigen Enzymen kompetitiv konkurrieren. Überwiegt die Bindung des Antivitamins, äußert sich dieses Phänomen pharmakologisch durch verschiedene Symptome; vor allem sind dies tonische und tonisch-klonische Krämpfe, die epileptiformen Mustern ähneln, sowie Bewußtlosigkeit und Paralyse der Extremitäten (*Wada, [1985]*, *Yagi, 1993*, *Yanai [1990]*). Diese als „Gin-nan-Sitotoxismus“ (*gin-nan*, chinesisches für: *Ginkgo*-Samen) bekannten Symptome sind durch Gabe von Vitamin B₆ reversibel. In den 30er und 60er Jahren des vorigen Jahrhunderts traten die Symptome in den Zeiten von Nah-

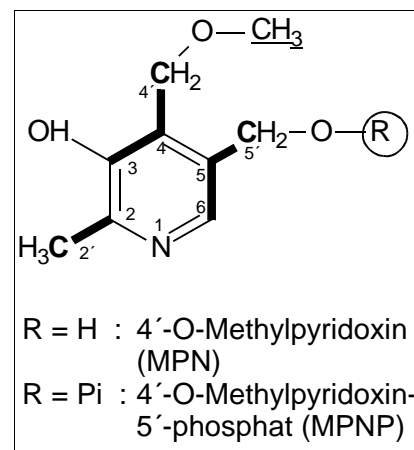


Abbildung 1.5 4'-O-Methylpyridoxin und 4'-O-Methylpyridoxin-5'-Phosphat (Ginkgotoxin)

Die hervorgehobenen Bindungen und Kohlenstoffatome zeigen den durch Fütterung von *Ginkgo biloba* mit D-[U-¹³C₆]-Glucose erhaltenen Einbau des schweren Kohlenstoffisotops in MPN bzw. MPNP. Diese stimmt überein mit dem durch analoge Fütterung erhaltenen Einbauschema des Pyridoxin-5'-phosphat aus *Escherichia coli*.

Unterstrichen dargestellt ist die durch Inkubation mit (Methyl-¹³C₁)-Methionin erhaltene Markierung.

rungsmangel auf, in denen die traditionell auf dem chinesischen und japanischen Speiseplan vorhandenen Samen des Ginkgobaums verstärkt als Nahrungsquelle dienten. Aufgrund ihres geringen Körpergewichts waren vor allem Kinder von der oft letalen Vergiftung betroffen (*Wada, 1985*).

Auf molekularer Ebene werden das 4'-Methylpyridoxin sowie andere durch Derivatisierungsexperimente am Pyridoxin erzeugte Strukturen mit Antivitamincharakter (z. B. 4'-Desoxypyridoxin) als Inhibitoren der Pyridoxalkinase, der Pyridoxin/Pyridoxamin-5'-phosphatoxidase (siehe *Abbildung 1.1, Seite 2*) sowie einiger Pyridoxal-5'-phosphat abhängiger Enzyme diskutiert. Nachdem beobachtet wurde, daß 4'-O-Methylpyridoxin und andere konvulsiv wirkende Substanzen die Konzentration des inhibitorischen Neurotransmitters γ -Aminobuttersäure (GABA) kurz vor Beginn eines epileptiformen Krampfanfalls senken (*Horton et al., 1982*), wurde jedes Enzym, das an der Bildung dieses Neurotransmitters beteiligt ist, als mögliches Ziel des Toxins in Betracht gezogen. Der limitierende Schritt in der Synthese der γ -Aminobuttersäure (GABA) ist die Decarboxylierung der Aminosäure Glutamat durch eine L-Glutamat-1-carboxy-Lyase (Glutamat-decarboxylase; GAD; E. C. 4.1.1.15) zu GABA. Da diese Reaktion Pyridoxal-5'-Phosphat abhängige ist, konzentrierten sich die Untersuchungen zunächst auf den Einfluß der dem Vitamer strukturverwandten Stoffen auf die Decarboxylase. *Buss et al. (2001)* untersuchte zwei Isoformen des Enzyms, die beide im menschlichen Hirn vorkommen: GAD_{65kDA} und GAD_{67kDA}. Sie konnte einen aktivitätsmindernden Einfluß von Ginkgotoxin und anderer Strukturanaloga mit Antivitamincharakter auf die rekombinant exprimierten Enzyme *in vitro* feststellen. Dieser war im Falle der phosphorylierten Metabolite PNP und Desoxypyridoxin-5-phosphat, nicht aber im Fall der unphosphorylierten Analoga messbar und durch Gabe von Pyridoxal-5'-phosphat reversibel. Da die Effekte der Inhibitoren auf die Enzymaktivität der Glutamat-decarboxylasen in Konzentrationsbereichen auftraten, die *in vivo* schwerlich erreicht werden, wurde gefolgert, daß die Hemmung dieser Isoenzyme nicht allein für das Auftreten der Intoxikationssymptome verantwortlich sein dürfte.

Entgegen älterer Angaben (*Wada et al., 1993*) konnte *Arenz (1996)* 4'-O-Methylpyridoxin (MPN) nicht nur in den *Ginkgo*-Samen, sondern auch in den Blättern und den aus ihnen durch Extraktion hergestellten Fertigarzneimitteln nachweisen. Da für Bilobalid, einem Hauptinhaltsstoff des Blattextraktes, eine Wirkung gegen Krämpfe berichtet wird, die durch 4'-O-Methylpyridoxin hervorgerufen worden sind (*Sasaki et al., 1995, 1997*), kann davon ausgegangen werden, daß die Einnahme von Blattextrakten unbedenklich ist.

1.4 Biosynthese des Vitamin B₆ in *Ginkgo biloba*

Parallel zu den am Enterobakterium *Escherichia coli* gewonnenen Erkenntnissen widmeten sich Leistner und Mitarbeiter der Biosynthese der Vitamere in *Ginkgo biloba*. Es sollte gezeigt werden, daß die Pflanze als alternatives System zur Untersuchung der Vitamin B₆-Biosynthese dienen kann. Die Pflanze besitzt die Besonderheit, neben den Vitameren auch das 4'-Methyletherderivat des Pyridoxins, das 4'-O-Methylpyridoxin, zu produzieren, das in den Samen und Blättern akkumuliert (siehe *Abbildung 1.5, Seite 9*).

Arenz (1996) und Fiehe (1999) gelang es, die von Hill und Spenser (1996) gefundenen Daten zum Einbau von D-[U-¹³C₆]-Glucose in das Kohlenstoffgerüst des Heterozyklus im pflanzlichen System nachzuvollziehen. Die kanadische Arbeitsgruppe zeigte, daß das Bakterium die aus der markierten Glucose stammenden Kohlenstoffatome in den drei zusammenhängenden Bausteinen C₂-C₂, C₃-C₄-C₄' und C₅-C₅-C₆ in das Kohlenstoffgerüst des Pyridoxin einbaut (siehe *Abbildung 1.5, Seite 9*). Eben diese Markierungsmuster erhielten auch Arenz und Fiehe, als sie eine pflanzlichen Zellsuspensionskultur von *Ginkgo biloba* mit in gleicher Weise markierter Glucose als Kohlenstoffquelle versetzten. 4'-O-Methylpyridoxin wurde aus den Zellen und dem Medium der Zellsuspensionskulturen isoliert. Die *Abbildung 1.5 (Seite 9)* zeigt das durch ¹³C-NMR-Analyse des MPN erhaltene Einbaumuster des Kohlenstoffisotops.

Ferner zeigten Fiehe et al. (1999, 2000) durch Versuche mit (Methyl-¹³C₁)-Methionin an Zellsuspensionskulturen der Pflanze, daß die Etherbildung am Kohlenstoffatom 4' zum 4'-O-Methylpyridoxin (MPN) bzw. 4'-O-Methylpyridoxin-5'-phosphat (MPNP, siehe *Abbildung 1.5, Seite 9*) zu einem späten Zeitpunkt der Biosynthese erfolgt. Diese funktionelle Gruppe wird nicht durch einen methylierten Precursor in den Heterozyklus eingeführt. Die Ergebnisse zum Einbau der Glucose in das Ringsystem und die zur Einführung der Etherfunktion legten die Vermutung nahe, die Bildung des Vitamin B₆ verlief in der Pflanze *Ginkgo biloba* in ähnlicher Weise wie im Bakterium *Escherichia coli*. Das *Ginkgo*-System sollte bei der Erforschung des Biosyntheseweges als Alternative zum bakteriellen dienen können.

Um den Biosyntheseweg in beiden Organismen besser miteinander vergleichen zu können, führte Fiehe zahlreiche Inkubationen an einem pflanzlichen *in vitro*-System zur zellfreien enzymatischen Synthese von Ginkgotoxin durch (Fiehe, 1999). Neben nicht-isotopenmarkierten Vorstufen setzte sie auch ²H- und ¹⁴C-markierte Precursoren ein und verfolgte den Einbau dieser Isotope in das Ginkgotoxin. Für den Einbau entsprechend markierter 1-Desoxy-D-xylulose und des korrespondierenden 5-Phosphates in das Kohlenstoffgerüst des PNP konnte sie keine Anhaltspunkte finden (vgl. *Kapitel 4.1, Seite 111*).

Im Gegensatz zu den aus den Experimenten mit markierter Glucose erhaltenen Daten legten diese Ergebnisse nahe, daß die Biosynthese von Vitamin B₆ in *Ginkgo biloba* auf einem anderen als dem aus *Escherichia coli* bekannten Weg verläuft. Diese Annahme wurde gestützt durch Ergebnisse von neueren molekularbiologischen Experimenten der Arbeitsgruppe von Ehrenshaft. Aus dem pflanzenpathogenen Pilz *Cercospora nicotianae* wurde das Gen *sor1* (single oxygen resistance gene 1, später zu *pdx1* umbenannt) kloniert (Ehrenshaft et al., 1999). Ehrenshaft konnte eine doppelte Funktion des Genproduktes nachweisen. Zum einem ist *Sor1* beteiligt an der Resistenz des Pilzes gegenüber Singulett-Sauerstoff, der durch das pilzeigene Perylenchinon *Cercosporin* unter Lichteinstrahlung gebildet wird. *Cercosporin* - ein Strukturverwandtes des aus *Hypericum perforatum* bekannten phototoxischen Hypericins - führt nach Ausscheidung auf die Pflanzenmembran unter Lichteinfluß zur Bildung von Singulett-Sauerstoff, der die Pflanzenzelle schädigt und zum Zelltot führt. Durch die Verletzung der Pflanzenoberfläche wird dem Pilz Zutritt zum Pflanzenorgan gewährt, der ihm zahlreiche Vorteile im Hinblick auf seine Ernährung und Fortpflanzung bietet (Daub, Ehrenshaft., 2000). Desweiteren besitzt das Genprodukt eine essentielle

Tabelle 1.1 Vorkommen des *pdx1*-Gens und der aus *Escherichia coli* bekannten Gene *pdxA* und *pdxJ* in Organismen deren Genom partiell oder komplett^a sequenziert ist

(entlehnt Daub, 2000, Table 1)

Organismus	<i>pdx1</i>	<i>pdxA/J</i>
Pflanzen		
<i>Arabidopsis thaliana</i>	+	-
<i>Hevea brasiliensis</i>	+	-
<i>Stellaria longipes</i>	+	-
Pilze		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ^a	+	-
<i>Aspergillus nidulans</i>	+	-
Archaeobakterien		
<i>Methanococcus jannaschii</i> ^a	+	-
<i>Pyrococcus horikoshii</i> ^a	+	-
<i>Aeropyrum pernix</i> ^a	+	-
Eubakterien		
<i>Haemophilus influenzae</i> ^a	+	-
<i>Bacillus subtilis</i> ^a	+	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ^a	+	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-
<i>Escherichia coli</i>	-	+
<i>Helicobacter pylori</i>	-	+
<i>Burkholderia cepacia</i> ^a	-	+
<i>Yersinia pestis</i>	-	+
<i>Bordetella pertussis</i>	-	+
<i>Borrelia burgdorferi</i> ^a	-	-
<i>Chlamydia pneumoniae</i> ^a	-	-
<i>Rickettsia prowazekii</i> ^a	-	-
Tiere		
<i>Caenorhabditis elegans</i>	-	-

Funktion für die Biosynthese des Vitamins B₆ in diesem Pilz. Sor-Mutanten von *Cercospora nicotianae* wachsen Pyridoxin-abhängig. Diese Abhängigkeit läßt sich durch Transformation mit dem organismeneigenen Gen komplementieren (Ehrenshaft et al., 1999).

Zahlreiche Homologe des sor-Gens wurden in verschiedenen Organismen gefunden - in Eubakterien, Archaeobakterien, Pilzen und Pflanzen. Desweiteren zeigte ein Sequenzvergleich der bekannten Genome einiger Organismen, daß solche, die ein sor-homologes Gen besitzen, keine der bisher für die Pyridoxin-Biosynthese als notwendig vorausgesetzten Gene trugen (*pdxA*, *pdxJ*, siehe Tabelle 1.1).

Zusammen mit den von Fiehe im Rahmen der Versuche am zellfreien pflanzlichen System getätigten Beobachtungen legen diese von Ehrenshaft und Daub erhaltenen Daten folgenden Schluß nahe: In der Natur existiert mehr als ein universeller Biosyntheseweg für die Vitamere der B₆-Gruppe - ein erster, in *Escherichia coli* weitgehend erforschter Weg - benötigt die Gene der pdx Gruppe, unter anderem *pdxA* und *pdxJ* (vgl. Abbildung 1.4, Seite 7); ein weiterer, in *Cercospora nicotianae* und anderen Eukaryonten wahrscheinlicher Weg, kann auf Genen der sor-Familie basieren.

Aufgabenstellung und Ziel dieser Arbeit

Die im Rahmen der vorliegenden Dissertation durchgeführten Arbeiten sollten Auskunft geben, welchen der beiden Biosynthesewege zur Bildung der B₆-Vitamere die Pflanze *Ginkgo biloba* verwendet. Um diese Fragestellung zu klären, sollte das Genom der Pflanze nach einer homologen Sequenz der sor(*pdx1*)-Familie durchsucht werden. Ließe sich eine solche nachweisen, könnte man vermuten, die Pflanze betreibe in der gleichen Weise die Vitamin B₆-Biosynthese wie dies die anderen Träger des konservierten Gens – insbesondere der Pilz *Cercospora nicotianae* - tun. Da dieser Weg von dem aus *Escherichia coli* bekannten zu differieren scheint, sollten auch Vertreter der aus dem Enterobakterium bekannten Genfamilien der Gruppe *epd*, *pdxB*, *pdxA* und *pdxJ* nicht nachweisbar sein (vgl. Kapitel 1.2, Seite 3 und Abbildungen 1.3 und 1.4).

Um Hinweise auf die Expression des Gens im pflanzlichen System zu bekommen, sollte diese in einer von Arenz etablierten, MPN-produzierenden Zellsuspensionskultur von *Ginkgo biloba* (Arenz, 1996) überprüft und die zugehörige cDNA kloniert werden. Angesichts der geringen Mengen MPN, die die Zellkultur produzierte, ließ sich eine ebenso geringe Expressionsrate des Gens erwarten. Daher soll alternativ zur Herstellung einer Phagen-cDNA-Bibliothek eine sensitivere Methode etabliert werden, die es erlaubt, extrem niedrig exprimierte Transkripte nachzuweisen.

Um die Eigenschaften des Sor1(*Pdx1*)-homologen Proteins und dessen Einfluß auf die Vitamin B₆-Biosynthese zu verstehen, sollte der offene Leserahmen selektiv exprimiert und das Enzym mittels Affinitätschromatographie gereinigt werden. Durch

Einsatz des Proteins in dem von *Fiehe (1999)* entwickelten zellfreien System zur Synthese des Ginkgotoxins sollte sich dessen Einfluß auf die MPN-Bildung charakterisieren lassen. Daraus könnten sich bei entsprechender Versuchsanordnung neue Hinweise auf mögliche Precursoren der Vitamin B₆-Bildung in diesem Organismus ergeben.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien, Lösungen, Verbrauchsmaterialien

2.1.1 Organische und anorganische Chemikalien

Im Rahmen der Arbeiten zur vorliegenden Dissertation fanden die in *Tabelle 2.1* aufgelisteten Chemikalien Verwendung:

Tabelle 2.1 *Bezugsquellen wichtiger Chemikalien*

Substanz	Bezugsquelle
Acrylamid (Roti-Phorese)	Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
Agar	Fluka = Sigma-Aldrich, 30926 Seelze
Agarose	Life Technologies (Gibco BRL), 76131 Karlsruhe
Alconox®	Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
APS, Ammoniumperoxodisulfat	Merck-Eurolab, Darmstadt
Bradford-Reagenz	Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
Calciumchlorid	Fluka = Sigma-Aldrich, 30926 Seelze
Chloroform	Merck-Eurolab, Darmstadt
Coomassie-Brillant blue G250®	Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
CSPD-Star®	Roche-Diagnostics, 68305 Mannheim
Dig-F _{AB} -Fragment	Roche-Diagnostics, 68305 Mannheim
Essigsäure, Eisessig	Merck-Eurolab, Darmstadt
Ethanol	SDS GmbH, 76437 Rastatt
Ethidiumbromid-Lösung, 1 %	Merck-Eurolab, Darmstadt
Formaldehyd-Lösung, 37 % (=12,3M)	Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
Galactose	Fluka = Sigma-Aldrich, 30926 Seelze
Glucose	Merck-Eurolab, Darmstadt
Glycin	Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
Hefe Extract (=Select® Yeast Extract)	Life Technologies (Gibco BRL), 76131 Karlsruhe
HPLC-Wasser (Lichrosolv®)	Merck-Eurolab, Darmstadt

Substanz	Bezugsquelle
Kaliumacetat	Merck-Eurolab, Darmstadt
LicrosolV®, HPLC-Wasser	Merck-Eurolab, Darmstadt
Maleinsäure	Merck-Eurolab, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck-Eurolab, Darmstadt
Phenol (Roti-Phenol®), pH 8	Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
Phenol (Aquaphenol®), pH 4,5	Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
Ponseau S	Serva, 69115 Heidelberg
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
TEMED	Merck-Eurolab, Darmstadt
Tris-Base	Merck-Eurolab, Darmstadt
Trypton (=Select® Pepton 140)	Life Technologies (Gibco BRL), 76131 Karlsruhe
UltraHyb®	Ambion, Huntingdon, Cambridgeshire PE29 6XY, United Kingdom
Zitronensäure	Merck-Eurolab, Darmstadt

2.1.1.1 Oligonukleotide („Primer“)

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in *Tabelle 2.2* aufgelistet. Sie wurden von der Firma MWG Biotech, Eggenstein, bezogen. Sie wurden salzfrei in lyophilisierter Form angeliefert und mußten für die Polymerisationsreaktion mit autoklaviertem HPLC-Wasser gelöst werden. Für die RT-PCR wurden die Oligonukleotide in RNase-freiem Wasser gelöst.

Tabelle 2.2 Desoxyoligonukleotide („Primer“)

Für degenerierte Oligonukleotide gilt: W = A/T, Y = T/C, S = C/G, R = A/G, M = A/C, K = T/G, D = T/A/G, H = A/C/T, V = A/C/G, N = A/T/C/G, I (Inosin).

Bezeichnung	DNA-Sequenz (5´->3´)	?T[°C]	bp	M	Funktion
Sor-1-Hin1	GCH GTI ACD ATY CCI GTIATG	56,2	21	6424	
Sor-1-Rück1	HCC ITC ICA ICC SAR YTG CAT	58,5	21	6315	
SNZ-1-Hin	ATT GGA TCC ATG ACT GGA GGA GAC TTT AAG		30		Hefe-Primer

Bezeichnung	DNA-Sequenz (5'→3')	?T[°C]	bp	M	Funktion
SNZ-1-Rück	TCA CCC GGG TCA CCA CCC AAT TTC GGA AAG		30		Hefe-Primer
Sor-1-Race	GTG CAT ATC ATC TGC AGG AGT GAG		24		GSP ₁
Sor-2-Race	CGG CAA TTC CGA CAT CCA CAC AC		23		GSP ₂
Sor-3-Race	GAG GCA GTG AGG CAT GTG GAA GC		23		GSP ₃
Sor-4-Race	CAG ATT GCT GCT CCC TAT GAG CTT G		25		GSP ₄
3'RACEcDNA	<u>AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA</u> <u>GTA CTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT</u> TTT TTT TTT (AGC) N	67,3	56	17174	Erststrangsynthese bei 3'-RACE, Q _T (Anker- mod. oligo-dT-Primer)
Q _T	CGA GTG AGC AGA GTG ACG AGG ACT CGA GCT CAA GCT TTT TTT TTT TTT TT		51		Erststrangsynthese bei 3'-RACE, Q _T (Anker- mod. oligo-dT-Primer)
Q ₀	CGA GTGAGC AGA GTG ACG		18		Q ₀
Q ₁	GAG GAC TCG AGC TCA AGC		18		Q ₁
Q _{T2}	GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA CTT TTT TTT TTT TTT TTV		39		Erststrangsynthese bei 3'-RACE, Q _T (Anker- mod. oligo-dT-Primer)
Q _{1'}	GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA C		22		Q ₁
5'RACEcDNA	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT T(AGC) N	47	27	8162	Erststrangsynthese bei 5'-RACE, Q _T (mod. oligo-dT-Primer)
SMART II-5'	<u>AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA</u> <u>GTA CGC GGG</u>	70,9	30	9339	SMART-Oligomit <u>Stan-</u> <u>dard-Primersequenz</u>
RACE _{long}	CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAA <u>GCA GTG GTA ACA ACG CAG</u> <u>AGT</u>	74	45	13896	SMART _{long} , Standard-Primerse- quenz
RACE _{short}	CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C	58,4	22	6703	SMART _{short} , <u>Standard-Primerse-</u> <u>quenz</u>
RACE _{nested}	AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GT	60,6	23	7131	SMART _{nested} , <u>Standard-Primerse-</u> <u>quenz</u>

Bezeichnung	DNA-Sequenz (5'→3')	?T[°C]	bp	M	Funktion
SorGb-Start	GGG ATC CAT GGC CAG CGA CGG AGT TGT GAC		30		Sor _{GB} -StartPri- mer(<u>Bam</u> HI)
SorGb-Stopp	TGC GTC GAC CTA CTC TGA CCT CTC TGC ATA TCG	33			Sor _{GB} -StoppPri- mer(<u>Sal</u> I)
Sor-GBfl-pMal EcoHin	TTG AAG GAA TTC ATG GCC AGC GAC GGA GTT GTG AC	71,8	35	10876	Sor _{GB} -StartPrimer (<u>Eco</u> <u>R</u> 1)
Sor-GBfl-pMal XbaRück	GCC TGC TCT AGA CTA CTC TGA CCT CTC TGC ATA TCG	72,9	36	10898	Sor _{GB} -StoppPrimer (<u>Xba</u> 1)
Mal-MCS-Hin	GGT CGT CAG ACT GTC GAT GAA	62,1	22	6815	Sequenzierprimer pMal-c2
Mal-MCS-Rück	TGG CGA AAG GGG GAT GTG CTG C	65,8	22	6896	Sequenzierprimer pMal-c2
M ₁₃ -fwd-20	GTA AAA CGA CGG CCA GT		17		univ. Sequenzierprimer
M ₁₃ rev	GGA AAC AGC TAT GAC CAT G		19		univ. Sequenzierprimer
SP ₆	CAT ACG ATTTAG GTG ACA CTA TAG				univ. Sequenzierprimer
T ₇	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C		22		univ. Sequenzierprimer
T ₃	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG		20		univ. Sequenzierprimer

2.1.1.2 Plasmide und Vektoren

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Klonierungs- und Sequenzierungsplasmide sowie Expressionsplasmide sind in den *Tabellen 2.3 und 2.4* aufgelistet.

Tabelle 2.3 Klonierungs- und Sequenzierungsplasmide

Bezeichnung	wichtige Eigenschaften	Größe	Referenz/Bezugsquelle
pBluescript® II KS(-)	Amp ^r , lacPOZ	2961 bp	Alting-Mees et al. (1992)/Startagene, La Jolla, USA
pBlueT	3'-T-Überhangvektor auf der Grundlage von pBluescript® II KS(-)	2961 bp	im Haus erzeugt

Bezeichnung	wichtige Eigenschaften	Größe	Referenz/Bezugsquelle
pCR [®] 2.1-TOPO	Amp ^r , Kan ^r , lacPOZ, 3'-T-Überhangvektor	3908 bp	Invitrogen, 9704 CH Groningen, Niederlande
pGem3Zf(+) [®]	Amp ^r , lacPOZ, 3'-T-Überhangvektor	3197 bp	Promega, 68199 Mannheim
pGem-Teasy [®]	Amp ^r , lacPOZ, 3'-T-Überhangvektor	3015 bp	Promega, 68199 Mannheim

Tabelle 2.4 Expressionsplasmide

Bezeichnung	Eigenschaften	Größe	Referenz/Bezugsquelle
pBargpe1	gdpA, Amp ^r , pUC-origin, bar (Expressionsvektor für <i>Cercospora nicotianae</i>)	5500 bp	Martin, L. et al., Washington State University
pMal-c2 [®]	Amp ^r , lacPOZ, Mal E (Expressionsvektor für <i>E. coli</i>)	6721 bp	NEB, Frankfurt a. M.
pQE _{Yeast} [®] 30	Amp ^r , P _{GAL1} Ura, Shuttlevektor (Expressionsvektor für <i>S. cerevisiae</i>)	8910 bp	Qiagen, 40724 Hilden (in der Entwicklung)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden durch Klonierungen folgende rekombinante Plasmide erhalten:

Tabelle 2.5 eigene Klonierungs- und Sequenzierungskonstrukte

Bezeichnung	Größe	Vektorursprung	Klonierte DNA/Klonierungsstrategie
pL5-1/2	7651 bp	pGem3Zf(+)	so _{r_{Gb}} fl(Thr)-Pwo-Pol.-Prod-BamH I/Sal I in pGem3Zf(+)- BamH I/Sal I
pL6-1	7651 bp	pGem3Zf(+)	so _{r_{Gb}} fl(Meth)-Pwo-Pol.-Prod- BamH I/Sal I in pGem3Zf(+)- BamH I/Sal I

Tabelle 2.6 eigene Expressionskonstrukte

Bezeichnung	Größe	Vektorursprung	Klonierte DNA/Klonierungsstrategie
pL53-35	7651 bp	pMal-c2	so _{r_{Gb}} (Thr)-BamH I/Sal I in pMal-c2-BamH I/Sal I
pL60-1	7651bp	pMal-c2	so _{r_{Gb}} (Meth)-BamH I/Sal I in pMal-c2-BamH I/Sal I

Bezeichnung	Größe	Vektorursprung	Klonierte DNA/Klonierungsstrategie
pL58-1/2/3/4/5/6/7/8/9	9843 bp	pQE _y 30	sorGb(Thr)-BamH I/Sal I in pMal-c2-BamH I/Sal I
pI63-9	9843 bp	pQE _y 30	sorGb(Meth)-BamH I/Sal I in pMal-c2-BamH I/Sal I
pL40-1/2/3/4/5/6/7	6430 bp	pBargpe1	sorGb(Thr)-BamH I/Sal I in pMal-c2-BamH I/Xho I
pL45-1/2/3/4/5/6/7	6430 bp	pBargpe1	sorGb(Thr)-BamH I/Sal I in pMal-c2-BamH I/Xho I
pL56-1/2/3/4/8/9/10	6430 bp	pBargpe1	sorGb(Meth)-BamH I/Sal I in pMal-c2-BamH I/Xho I
pL57-1/2/3/4	6430 bp	pBargpe1	sorGb(Meth)-BamH I/Sal I in pMal-c2-BamH I/Xho I

2.1.1.3 Enzyme, Größenstandards und Reagenziensätze

In der *Tabelle 2.7* sind die verwendeten Enzyme, Größenstandards und Reagenziensätze zusammengestellt.

Tabelle 2.7 Enzyme, Größenstandards und Reagenziensätze

Bezeichnung	Hersteller
Penta-His TM -Mouse-Antibody (Antikörper I)	Qiagen, 40724 Hilden
anti-Mouse IgG-HRP: polyclonales HRP-konjugiertes Ziegen-IgG (Antikörper II)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
ATP, TTP, CTP, GTP (je 100 mM)	MBI-Fermentas, 68789 St. Leon-Rot
Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit I	Perkin Elmer/ABI Prism, 64331 Weiterstadt
Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus (Enhanced Luminol)	NEN Lifescience Products, B-1930 Zaventem, Belgien
Endonucleasen	MBI-Fermentas, 68789 St. Leon-Rot, NEB-Biolabs, 65926 Frankfurt am Main
Faktor Xa-Kit	Novagen
GeneRuler Ladder Mix	MBI-Fermentas, 68789 St. Leon-Rot
Loading Dye, 6x (DNA-Auftragspuffer)	MBI-Fermentas, 68789 St. Leon-Rot
Low Molecular Weight Marker	Amersham-Pharmacia Biotech, 79111 Freiburg

Bezeichnung	Hersteller
Perfect Protein™ Marker	Novagen, Madison, WI 53711, USA
pGEM-T-Easy-Vektor-Kit	Promega, 68199 Mannheim
pMal™ Protein Fusion and Purification System	NEB-Biolabs, 65926 Frankfurt am Main
Pwo-Polymerase	Roche-Diagnostics, 68305 Mannheim
Qiaquick Gel Extraktion Kit	Qiagen, 40724 Hilden
Ready-To-Go® RT-PCR Beads	Amersham-Pharmacia Biotech, 79111 Freiburg
RNAasin, RNase-Inhibitor	Promega, 68199 Mannheim
RT-PCR-Beads	Amersham-Pharmacia Biotech, 79111 Freiburg
Superscript II, Reverse Transcriptase (incl. 5xFist-Strand-Buffer, MgCl ₂ , DTT)	Life Technologies, 76131 Karlsruhe
Taq-Polymerase	Q-biogene, 68123 Heidelberg
TOPO-TA-Cloning Kit, Version K2	Invitrogen, 9704 CH Groningen, Niederlande
Wizard Plus Midipreps DNA purification System	Promega, 68199 Mannheim

2.1.2 Material für Chromatographie, Filtration und Blotting sowie Plastikware

In der *Tabelle 2.8* sind die verwendeten Materialien zur Chromatographie, Filtration und zum Nukleinsäureblotting zusammengestellt.

Tabelle 2.8 *Material für Chromatographie, Filtration und Blotting*

Bezeichnung	Hersteller	Verwendung
0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml, Sale-lock	Fa. Eppendorf, Hamburg	Reaktionsgefäße
Agfa Curix HC 1.000G X-Ray Film	Agfa-Geavert, Mortsel, Belgien	Autoradiographiefilme
Biodyne Plus		Hybridisierungsmembran
Gel-Blotting Papier	Schleicher und Schüll, 37586 Dassel	Southern- /Northern-Transfer von Nukleinsäuren
Hybridisierungsschlauch	Merck-Eurolab, Darmstadt	Northern-Hybridisierung, Western-Transfer
Kryoröhrchen, 2 ml, Nalgene®	über Fa. Faust, 53340 Mecken- heim	Dauerkulturen

Bezeichnung	Hersteller	Verwendung
Membranfilter 0,2 µm	Schleicher und Schüll, 37586 Dassel	Sterilfiltration
Polyvinylidenfluorid.Membran (PVDF)	Pall Gellmann, Rosdorf	Western-Transfer

2.1.3 Lösungen, Kulturmedien

2.1.3.1 Lösungen für Arbeiten mit DNA

Die Zusammensetzungen der für Arbeiten mit DNA verwendeten Puffer sind in *Tabelle 2.9* aufgelistet. Falls nicht anders beschrieben, wurde Reinstwasser für die Herstellung verwendet (siehe *Kapitel 2.2.1, Seite 32*).

Tabelle 2.9 *Lösungen für Arbeiten mit DNA*

Puffer / Lösung	Zusammensetzung		Herstellung
ATP, 10 mM	in Wasser lösen		Sterilfiltration
BSA, 10x	BSA, 100x [10 mg/ml] 0,1 VT		Endkonzentration 1 µg/µl
Chloroform/Isoamylalkohol	24 VT / 2 VT		
Einzelstrangheringssperma-DNA	Heringssperma-DNA in DMSO	10 µg/µl	Lösen; vor Gebrauch 5 min bei 90 °C denaturieren
Ethanol 70 %	Ethanol 100 % Wasser	70 ml 30 ml	mischen
Kirby-Mix	Phenol (Tris-HCl- pH 8-gepuffert)	24 VT	
	Chloroform	24 VT	
	Isoamylalkohol	2 VT	
LiAc-Lösung (10fach, pH 7,5)	LiAcetat	1 M	in Wasser lösen, pH 7,5 mit Essigsäure einstellen, Sterilfiltration
Lysepuffer P	N-Laurylsarkosin	1 g	
	EDTA, 05M	20 M	
	Proteinase K	20 mg	
	H ₂ O	ad 100 ml	Die Lösung wird sterilfiltriert
Natriumacetat-Lösung	NaAc	3 M	pH 4,6

Puffer / Lösung	Zusammensetzung		Herstellung
PEP 4000, 50 %	PEG 4000	50 g	unter Erwärmen lösen, Sterilfiltration
	Wasser	50 ml	
PEG-P-Lösung	PEG 6.000	30 g	heiß (60 °C) sterilfiltrieren
	NaCl,	2 M	
	H ₂ O	ad 100 ml	
Puffer für Restriktionsenzyme	nach Herstellerangaben		
Puffer P1	Tris	50 mM	
	EDTA	10 mM	
	RNAse A	100 µg/ml	pH 8
Puffer P2	NaOH	0,2 M	
	SDS	1,0 %	Mischen
Puffer P3	KAc	2,55 M	pH 4,8 mit Eisessig
Sequenzierpuffer	Formamid	5 VT	
	EDTA (25 mM, pH 8)	1 VT	mischen
Sphaeroastenpuffer	Sorbitol	1 M	+ 10 µl β-Mercaptoethanol pro 0,5 ml Puffer
	Na Pi, pH 7,5	0,05 M	
STE-Puffer	Tris HCl	25 mM	
	EDTA, pH 8	25 mM	
	Saccharose	300 mM	
	Lysozym	10 mg/ml	pH 8
TAE-Puffer, 1x	TAE-Puffer	1/50	VT Mit Wasser mischen
TAE-Puffer, 50x	Tris	2 M	
	Eisessig	1 M	
	EDTA	0,05 M	pH 8,3
TB-Puffer	HEPES oder PIPES	10 mM	Die Lösung wurde vor Gebrauch frisch hergestellt und sterilfiltriert
	CaCl ₂	15 mM	
	KCL	250 mM	
			pH 6,7 mit KOH
	MnCl ₂	55 mM	
TBE-Puffer, 10 fach	Tris	0,9 M	
	Börsäure	0,9 M	
	EDTA	0,2 M	mischen
TBE-Puffer, 1 fach	TBE-Puffer, 10 fach	0,1	VT mischen
TE-Puffer (0,1 fach), pH 8	Tris HCL	10 mM	
	EDTA, pH 8	1 mM	pH 8 einstellen

Puffer / Lösung	Zusammensetzung		Herstellung
TE-Puffer (10fach, pH 7,5)	Tris	1	M in wenig Wasser Lösen und mit
	EDTA	10	mM HCl _{konz} pH7,5 einstellen, Volumen auffüllen, Sterilfiltration
TE-Puffer (1fach, pH 7,5)	TE-Puffer (10fach, pH 7,5) / Wasser		1/10 mischen
TE-LiAc-Lösung (1fach, pH 7,5)	TE-Puffer (10fach)	1	VT Vor Gebrauch frisch herstellen
	LiAc-Lösung (10fach)	1	VT
	steriles Wasser	8	VT

2.1.3.2 Lösungen für Arbeiten mit RNA

Die Zusammensetzungen der für Arbeiten mit RNA verwendeten Puffer sind in der *Tabelle 2.10* gelistet. Falls nicht anders beschrieben, wurde immer mit RNase-Inhibitoren behandeltes Reinstwasser für die Herstellung verwendet (siehe *Kapitel 2.2.1, Seite 32*).

Tabelle 2.10 Lösungen für die Arbeit mit RNA

Puffer / Lösung	Zusammensetzung		Herstellung/Anmerkung
Blockierungsreagenz 10 %- Stocklösung	Blocking Reagenz	10 %	In DMPC-H ₂ O lösen, autoklavieren
Blockierungslösung	Blocking Reagenz1 Maleinsäurepuffer	10 % q.s.	in der Wärme lösen und autoklavieren
CSPD-Star	Fertiglösung		siehe Tab. 2.1
Dig-F _{A/B} -Antikörper	Fertiglösung		siehe Tab. 2.1
Detektionspuffer	Tris-HCl	0,1 M	
	NaCl	0,1 M	pH 9,5; In DMPC-H ₂ O lösen
DMPC-H ₂ O	DMPC	0,1 %	DMPC in 100 ml Ethanol / Wasser (1:1) vorlösen und mit 900 ml H ₂ O mischen;
	Ethanol	50 ml	
	H ₂ O	950 ml	1h inkubieren, autoklavieren
EDTA, 0,5M (RNA)	EDTA	0,5 M	lösen in DMPC-H ₂ O
Ethidiumbromidlösung, 1 %	Fertiglsg., siehe Tab 2.1		Merck-Eurolab, Darmstadt
Formaldehyd-Gel-Puffer-1x	Formaldehyd-Gel-Puffer-5x		
		0,2 VT	mit DMPC-H ₂ O auffüllen

Puffer / Lösung	Zusammensetzung			Herstellung/Anmerkung
Formaldehyd-Gel-Puffer-5x	MOPS, pH 7	0,1	M	> aus MOPS, 10x > aus EDTA, 0,5M, pH 8 mit DMPC-H ₂ O auffüllen
	NaAc	40	mM	
	EDTA, pH 8 (RNA)	5	mM	
Hybridisierungslösung	Ambion Ultrahyb			Fertigprodukt, siehe Tab 2.1
Maleinsäurepuffer	Maleinsäure	100	mM	pH 7,5; In DMPC-H ₂ O lösen!
	NaCl	150	mM	
MOPS, 10x	MOPS	41,9	g	- pH 7 einstellen
	NaAc	4,1	g	- 0,1 % DMPC zugeben, 1h inkubieren und autoklavieren
	NaEDTA · 2 H ₂ O	3,7	g	- vor Licht geschützt lagern
	DMPC-H ₂ O	ad 1.000	ml	
RNAse-Denaturierungslösung	NaOH	0,1	M	Zu reinigendes Material 1h darin baden und mit DMPC-Wasser abspülen
	H ₂ O ₂	0,3	%	
SDS, 10 %	SDS	10	g	
	DMPC-H ₂ O	ad 100	ml	
SSC, 20-fach	NaAc	3	M	pH 7,0; autoklavieren
	NaCitrat	0,3	M	
SSC, 10fach	SSC, 20-fach	1	VT	mischen
	DMPC-H ₂ O	1	VT	
Waschlösung _{AK}	Maleinsäure	100	mM	pH 7,5; In DMPC-H ₂ O lösen!
	NaCl	150	mM	
	Tween 20	0,3	%	
Waschpuffer-2 fach	SSC	2	fach	Mit DMPC-H ₂ O mischen.
	SDS	0,1	%	
Waschpuffer-0,5 fach	SSC	0,5	fach	Mit DMPC-H ₂ O mischen.
	SDS	0,1	%	

2.1.3.3 **Lösungen für chemisches / proteinchemisches Arbeiten**

Die Zusammensetzungen der für chemische/proteinchemische Arbeiten verwendeten Puffer sind in *Tabelle 2.11* aufgelistet. Falls nicht anders beschrieben, wurde Reinstwasser für die Herstellung verwendet (Reinstwasserherstellung siehe *Kapitel 2.2.1, Seite 32*).

Tabelle 2.11 Puffer für chemisches/proteinchemisches Arbeiten

Puffer / Lösung	Zusammensetzung	Herstellung
Acrylamid-Lösung	siehe Tab. 2.1, Roti-Phorese	
Antikörperlösung I bzw. II (Western-Transfer)	Waschlösung I Antikörper I bzw. Antikörper II	40 ml 1/ 500 1/ 2000
APS, 20 %	APS H ₂ O	2 g ad 10 ml lösen, bei -20 °C lagern
Blockierungslösung (Western-Transfer)	PBS Milchpulver, entfettet	1 x 5 %
Bradford-Reagenz	Fertiglösung	siehe Tab. 2.1, Seite 15
Butanol, wassergesättigt		Butanol mit etwas Wasser mischen
Column Buffer (pMal-System)	Tris-HCl (pH 7,4; 1M) NaCl EDTA (0,5M) H ₂ O	20 ml 11,7 g 2,0 ml ad 1.000 ml lösen und autoklavieren
Coomassie blue-Färbelösung	Coomassie-Brillant blue G250® H ₂ O Eisessig MeOH	1 g 1.000 ml 75 ml 500 ml
Elektrodenpuffer	Tris Glycin SDS	0,3 % 1,44 % 0,1 % (= 7,5g Tris, 38,5g Glycin + 2,5g SDS / 5.000 ml)
Elutions-Puffer (pMal-System)	Maltose in Column Buffer	10 mM < auf steriltfiltrierter Stocklösung (1M)
Entfärbelösung	H ₂ O Eisessig MeOH	1810 ml 190 ml 500 ml
PBS-Puffer (10fach, Phosphate Buffered Saline, für Western-Transfer)	Na ₂ HPO ₄ NaH ₂ PO ₄ NaCl	0,58 M 0,17 M 0,68 M nach 1/10-Verdünnung sollte pH 7,3-7,4 erreicht werden
Ponceau-S-Lösung	Ponceau S Trichloressigsäure	0,2 % 3 %

Puffer / Lösung	Zusammensetzung			Herstellung
Sammelgel-Lösung, 3 %	Sammelgelpuffer	2,5	ml	Sammelgelpuffer, Acrylamid-Lsg. und Wasser mischen und entgasen, APS und TEMED zugeben und die Lösung sofort in Gießvorrichtung geben; 30 min polymerisieren lassen
	Acrylamid-Lsg.	1,0	ml	
	Wasser	6,0	ml	
	APS, 20 %	75	µl	
	TEMED	15	µl	
Sammelgelpuffer (Upper Tris)	SDS	0,4	%	(1 g SDS + 15,2 g Tris in 250 ml); pH 6,8
	Tris-HCL	0,5	M	
SDS-Page-Ladepuffer-5-fach	Glycerin (87 %)	5,75	g	Komponenten mischen und unter Erwärmen lösen, kühl lagern (Lösung erstarrt), vor Gebrauch auf RT erwärmen
	β-Mercaptoethanol	2,5	ml	
	SDS	9,0	g	
	Bromphenolblaulösung (1 %w/v)	0,1	ml	
	Tris-HCl (1,9 M, pH 6,8)	1,65	ml	
Transferpuffer (Western-Transfer)	Tris	48	mM	pH 9,2
	Glycine	39	mM	
	Methanol	20	%	
TEMED	siehe Tab. 2.1, Seite 15			
Trenngelpuffer (Lower Tris)	SDS	0,4	%	(1 g SDS + 45,5 g Tris /250 ml); pH 8,8
	Tris-GCL	1,5	M	
Trenngel-Lösung, 10 %	Trenngelpuffer	7,5	ml	Trenngelpuffer, Acrylamid-Lsg. und Wasser mischen und entgasen, APS und TEMED zugeben und die Lösung sofort in Gießvorrichtung geben. 30 min polymerisieren lassen
	Acrylamid-Lsg.	7,5	ml	
	Wasser	14,8	ml	
	APS, 20 %	150	µl	
	TEMED	18,5	µl	
Waschlösung I (Western-transfer)	PBS-Puffer 10fach	50	ml	pH 7,45 einstellen, fakultativ kann Tween 20 bis 0,1 % zugesetzt werden
	Milchpulver, entfettet	5	g	
	Wasser, ad	500	ml	
Waschlösung II (Western-Transfer)	PBS-Puffer 10fach	30	ml	pH 7,45 einstellen,
	Milchpulver, entfettet	3	g	
	Tween 20	0,3	%	
	Wasser, ad	300	ml	
YA-Puffer incl. Zymolyase	wie YA-Puffer			Zymolyase: 2,5 mg/mg Feuchtgewicht der Hefezellen zusetzen
	Zymolyase		q.s.	

2.1.3.4 Kulturmedien/Lösungen für die Arbeit mit Mikroorganismen

Die Zusammensetzungen von Medien für die Anzucht von bakteriellen Zellkulturen sind in *Tabelle 2.12* zusammengestellt. Falls nicht anders beschrieben, wurde Reinstwasser für die Herstellung verwendet (siehe *Kapitel 2.2.1, Seite 32*).

Tabelle 2.12 Medien/Lösungen für die Arbeit mit Mikroorganismen

Medium	Zusammensetzung		Herstellung
LB-Medium (nach Luria-Bertani)	Trypton	1 %	pH 7,0 mit NaOH einstellen, autoklavieren
	Hefeextrakt	0,5 %	
	NaCl	1 %	
LB _{mod.} -Medium (modifiziert nach Luria-Bertani)	Trypton	1 %	pH 7,0 mit NaOH einstellen, autoklavieren
	Hefeextrakt	0,5 %	
	Glucose	0,5 %	
	NaCl	1 %	
Rich-Medium + Glucose	Trypton	1 %	autoklavieren
	Hefeextrakt	0,5 %	
	Glucose	0,2 %	
	NaCl	1 %	
YT-Medium	Trypton	1,6 %	pH 7,0 mit NaOH einstellen, autoklavieren
	Hefeextrakt	1,0 %	
	NaCl	0,5 %	
SD-Medium	Yeast Nitrogen Base without Amino Acids	6,7 g	> autoklavieren
	Wasser ad	910 ml	
	Adenin	20 mg	
	Histidin	20 mg	
	Leucin	20 mg	
	Lysin	20 mg	
	Tryptophan	20 mg	
SD-Glucose-Medium	wie SD-Medium		Glucose-Lösung sterilfiltrieren und nach dem Autoklavieren dem Medium zusetzen
	Glucose (50 % w/v)	40 ml	

Medium	Zusammensetzung		Herstellung
SOC-Medium	Trypton	2,0 %	
	Hefeextrakt	0,5 %	
	Glucose	20 mM	
	NaCl	10 mM	
	MgCl ₂	10 mM	
	MgSO ₄	10 mM	
	KCl	2 mM	autoklavieren
YP-Medium	Bacto Pepton	20 g	
	Yeast Extract	10 g	
	Wasser ad	960 ml	autoklavieren
YP-Glucose	wie YP-Medium		
	Glucose (50 % w/v)	40 ml	siehe SD-Glucose
YP-Galactose	wie YP-Medium		Galactose-Lösung sterilfiltrieren
	Galactose (50 % w/v)	40 ml	und nach dem Autoklavieren dem Medium zusetzen

Für die Kultivierung von Mikroorganismen wurde durch den Einsatz von Antibiotika immer dann ein Selektionsdruck ausgeübt, wenn dieser zum Erhalt plasmidkodierter Eigenschaften unerlässlich war. Zu diesem Zweck wurden die Antibiotika in sterilfiltrierten Stocklösungen (1000 fache der Endkonzentration) vorgehalten, aus denen die Verdünnung auf die Endkonzentration im Kulturmedium vorgenommen wurde. *Tabelle 2.13* gibt eine Übersicht über die eingesetzten Konzentrationen.

Tabelle 2.13 *Antibiotikazusätze zur Anzucht von Escherichia coli*

Antibiotikum	Konzentration der Stocklösung (Lösungsmittel)	Endkonzentration im Kulturmedium
Penicillin G	100 mg/ml (Wasser)	100 µg/ml
Kanamycin	60 mg/ml (Wasser)	60 µg/ml
Tetracyclin	10 mg/ml (Ethanol)	10 µg/ml

2.1.3.5 Kulturmedien/Lösungen für die Arbeit mit Zellkulturen von *Ginkgo biloba*

Die Zusammensetzungen von Medien und Lösungen für die Anzucht von Zellkulturen von *Ginkgo biloba* sind im folgenden zusammengestellt. Falls nicht anders be-

schrieben, wurde Reinstwasser für die Herstellung verwendet (siehe *Kapitel 2.2.1, Seite 32*).

Tabelle 2.14 Kulturmedien / Lösungen für die Arbeit mit Zellkulturen von *Ginkgo biloba* L.

Medium / Lösung	Zusammensetzung			
4x – Medium (Zenk et al., 1975)	Makroelemente:	KNO ₃	2500,0	mg/L
		MgSO ₄ · 7 H ₂ O	250,0	mg/L
		NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O	169,6	mg/L
		CaCl ₂ · 2 H ₂ O	150,0	mg/L
		(NH ₄) ₂ SO ₄ · 2 H ₂ O	134,0	mg/L
	Mikroelemente:	Na ₂ EDTA	30,2	mg/L
		FeSO ₄ · 7 H ₂ O	25,6	mg/L
		MnSO ₄ · 4 H ₂ O	13,2	mg/L
		H ₃ BO ₃	3,0	mg/L
		ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	3,0	mg/L
		KI	0,75	mg/L
		Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,25	mg/L
		CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,025	mg/L
		CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,025	mg/L
	Vitamine:	myo-Inositol	100,0	mg/L
		Thiaminchlorid-HCl	10,0	mg/L
		Nicotinsäure	1,0	mg/L
		Pyridoxin-HCl 1,0	mg/L	
	Auxine/Kinine:	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	2,0	mg/L
		3-Indolessigsäure	0,5	mg/L
		1-Naphthyllessigsäure	0,5	mg/L
		6-Furfurylaminopurine (Kinetin)	0,2	mg/L
	Zucker:	Saccharose	20,0	g/L
Aminosäuren:	NZ-Amine A (Pepton)	2,0	g/L	
	pH-Wert	5,5		

Medium / Lösung	Zusammensetzung			
4x OP – Medium (modifiziert nach Zenk et al., 1975)	Bei diesem <i>pyridoxinfreien</i> Medium handelt es sich um das vorangehend beschriebene 4x-Medium <i>ohne</i> Zusatz von Pyridoxin-HCl.			
MS _w – Medium (modifiziert nach Murashige und Skoog, 1962)	Makroelemente:	KNO ₃	1900,0	mg/L
		NH ₄ NO ₃	1650,0	mg/L
		KH ₂ PO ₄	170,0	mg/L
		CaCl ₂ · 2 H ₂ O	440,0	mg/L
		MgSO ₄ · 7 H ₂ O	370,0	mg/L
	Mikroelemente:	Na ₂ EDTA	37,3	mg/L
		FeSO ₄ · 7 H ₂ O	27,8	mg/L
		MnSO ₄ · 4 H ₂ O	22,3	mg/L
		H ₃ BO ₃	6,2	mg/L
		ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	10,6	mg/L
		KI	0,83	mg/L
		Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,25	mg/L
		CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,025	mg/L
		CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,025	mg/L
	Vitamine:	myo-Inositol	100,0	mg/L
		Thiaminchlorid-HCl	0,1	mg/L
		Nicotinsäure	0,5	mg/L
		Pyridoxin-HCl	0,5	mg/L
	Auxine/Kinine:	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	2,0	mg/L
		6-Benzylaminopurine	1,0	mg/L
	Zucker:	Saccharose	30,0	g/L
	Aminosäuren:	Caseinhydrolysat („Casamino Acids“)	2,0	g/L
		Glycin	2,0	mg/L
		pH-Wert	5,75	
MS _w OP – Medium (modifiziert nach Murashige und Skoog, 1962)	Bei diesem <i>pyridoxinfreien</i> Medium handelt es sich um das vorangehend beschriebene MS _w -Medium <i>ohne</i> Zusatz von Pyridoxin-HCl.			
Quecksilber (II) -chlorid – Lösung (vgl. Kapitel 2.3.2)		Hg (II) Cl ₂	0,1	%

2.2 Laboreinrichtung

2.2.1 Reinstwasseraufbereitung

Soweit nicht anders beschrieben, wurde für alle Arbeiten Reinstwasser eingesetzt. Die Bereitung erfolgte mit einer „Milli-Q Reagent Water-Anlage“ der Firma Millipore, Eschborn. Für den molekularbiologischen Einsatz wurde das Wasser durch Autoklavieren sterilisiert (siehe *Kapitel 2.2.2, Seite 32*).

2.2.2 Sterilisationsmethoden

- *Autoklavieren*: Sterilisation von Gebrauchsmaterialien und Lösungen durch Autoklavieren erfolgte in einem Autoklav der Firma Webeco, Bad Schwartau, bei 121 °C und 1 atü für 20 min
- *Sterilfiltration*: Sterilisation von temperaturlabilen Lösungen erfolgte durch Filtration durch einen Membranfilter (Porenweite 0,2 µm) der Firma Schleicher und Schüll, Dassel.

2.2.3 Reinraumbedingungen/Laminar Airflow

Arbeiten, zu denen Reinraumbedingungen benötigt wurden (steriles Arbeiten), wurde in einer Querstrombank (Laminar Airflow) durchgeführt.

Bakterien und Pilze wurden in dem Gerät BSB 4A (Vorlaufzeit 10 min) der Firma Gelaire Flow Laboratories bearbeitet. Pflanzliche Zellkulturen wurden in einer Querstrombank des Typs CF436B (Vorlaufzeit 10 min) der Firma CeacConcordia Elektrizitäts AG, Dortmund, bearbeitet.

2.2.4 Sonstige Geräte und Einrichtungen

- **Raum zur Kultivierung von pflanzlichen Zellkulturen:** In diesem Raum herrschte eine gleichbleibende Temperatur von 20 °C und eine permanente Beleuchtung (ca. 400 lx).
- **Brutschrank:** Heraeus VT 5042 EK/N2
- **Durchflußphotometer:** "LKB Uvicord SII", Pharmacia, Freiburg (Wellenlänge 280 nm)
- **Geldokumentation:** UV-Durchlichttisch Chroma 43, Vetter GmbH, Giesloch, und Polaroid-Kamera MP4, Fa. Kodak mit Film des Typs 667
- **Polyacrylat-Gelelektrophorese (SDS-PAGE):** Maxigel Twin-Gelelektrophorese-System und Gelrockner, Fa. Biometra, Göttingen
- **Laborradio:** Receiver 3400T, Elac (Elektroacoustic GmbH), Kiel
- **PCR-Thermoblock:** Biometra T3 Thermocycler, Biometra, Göttingen
- **pH-Meter:** pH-Meter 766 Calimatic, Fa. Knick Elektrische Meßgeräte GmbH, 14163 Berlin
- **Schüttler:** HT Infors, CH-4103 Bottmingen, Schweiz
- **Schüttelwasserbad:** GFL 1083, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
- **Spannungsgeber für Elektrophoresen:** Biorad Powerpac 300, Biorad, 80939 München; Firma Consort, Turnhout, Belgien
- **Spannungsgeber für Western-Transfer:** Trans-Blot SD Semi-dry Electrophoretic Transfer Cell, Biorad, 80939 München
- **Spülmaschine:** Mielabor G 7783Multitronic, Fa. Miele, Gütersloh
- **Spektralphotometer:** Uvikon® 860, Kontron, München
- **Ultraschall-Desintegrator:** "Sonifier Typ 250", Branson, Danbury, Connecticut, USA
- **Vakuumkonzentrator:** SpeedVac Plus SC110A, Savant
- **Waagen:** H51-Feinwaage und K7-Grobwaage, Fa. Mettler, Gießen
- **Zentrifuge:** Eppendorf 5804R, Eppendorf, Hamburg

2.3 Biologisches Material

2.3.1 Mikroorganismen

Die Genotypen der in dieser Arbeit für Klonierungs- und Expressionsexperimente verwendeten Mikroorganismen sind in *Tabelle 2.15* beschreiben.

Tabelle 2.15 *Mikroorganismen*

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i> JM 109	e14 ⁻ (McrA ⁻) <i>recA1 endA gyrA96 thi-1 hsdR17(r?- m?+) supE44 re-IA1 ? (lac-proAB) [F?traD36 proAB lac^hZ ?M15]</i>	Stratagene, La Jolla, CA 92037 USA. (Yanish-Perron, C., Viera, J., Messing, J. (1985), <i>Gene</i> 33 : 103-199)
<i>Escherichia coli</i> XL1 blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 [F?proAB lac^hZ ?M15 Tn10 (Tet^r)]^c</i>	Stratagene, La Jolla, CA 92037 USA. (Bullock, W., Fernandez, J.M., Short, J.M. (1987), <i>Bio-techniques</i> 5 : 376-379)
<i>Escherichia coli</i> XL1 Blue MRF ⁺	D(<i>mcrA</i>)183 ?(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F?proAB lac^hZ ?M15 Tn10 (Tet^r)]^c</i>	Stratagene, La Jolla, CA 92037 USA. (Jerpseth, B., et. al. (1992) <i>Stratagies</i> 5 : 81-83)
<i>Escherichia coli</i> XL1 Blue MRF ⁺ Kan	D(<i>mcrA</i>)183 ?(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F?proAB lac^hZ ?M15 Tn5 (Kan^r)]^c</i>	Stratagene, La Jolla, CA 92037 USA. (Jerpseth, B., et. al. (1993) <i>Stratagies</i> 6 : 24
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MAT, <i>leu2-3, 112ura3-52 his3-trp1-lys2-80 suc2- ?9</i>	Qiagen, 40724 Hilden.

Durch Transformation dieser Organismen in der in *Kapitel 2.4.8 (Seite 53)* beschriebenen Weise mit rekombinanten Plasmiden (vgl. *Tabelle 2.5 und 2.6*) entstanden rekombinante Mikroorganismen. Diente die Erzeugung dieser Organismus der Vermehrung eines Plasmides oder der Sequenzbestimmung von klonierter DNA, so wurde der Organismus nach der Gewinnung des Plasmides durch Autoklavieren vernichtet.

Zur Gewinnung eines rekombinanten Organismus zu Proteinexpression wurde der Ausgangsorganismus jeweils bei Bedarf frisch mit dem Zielplasmid transformiert. Eine Konservierung in Form einer Dauerkultur und eine anschließende Reaktivierung erfolgten nicht. Die Spezifikationen der für die Proteingewinnung erzeugten Organismen zeigt die *Tabelle 2.16*:

Tabelle 2.16 rekombinante Mikroorganismen

Zielorganismus	Ausgangs-organismus	rekombinantes Plasmid	Eigenschaft/Funktion
<i>Escherichia coli</i> XL1 Blue MRF´Kan pL53-35	<i>Escherichia coli</i> XL1 Blue MRF´ Kan	pL53-35-1	sorGb(Thr)-BamH I/Sal I in pMal-c2-BamH I/Sal I
<i>Escherichia coli</i> XL1 Blue MRF´Kan pL60-1	<i>Escherichia coli</i> XL1 Blue MRF´Kan	pL60-1	sorGb(Meth)-BamH I/Sal I in pMal-c2-BamH I/Sal I
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> pL58-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	pL58-1	sorGb(Thr)-BamH I/Sal I in pMal-c2-BamH I/Sal I
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> pL63-9	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	pL63-9	sorGb(Meth)-BamH I/Sal I in pMal-c2-BamH I/Sal I

2.3.1.1 Kultivierung und Konservierung von Mikroorganismen

Escherichia coli

Die Kultivierung von *Escherichia coli*-Stämmen erfolgte stets aus einer Einzelkolonie oder aus einer Flüssigkultur, die sich von einer Einzelkolonie ableitete. Dem Kulturmedium - in der Regel LB-Medium – wurde je nach Resistenzeigenschaften des Stammes ein Antibiotikum zur Selektion zugesetzt (siehe *Tabelle 2.13, Seite 29*).

Die Kultivierung erfolgte für 12-16 Stunden (üN) bei 37 °C und 200 rpm in einem Schüttler der Firma Infors. Festkulturen mit entsprechendem Antibiotika-Zusatz (siehe *Tabelle 2.13, Seite 29*) wurden in einem Thermoschrank der Firma Heraeus mit den Deckel der Petrischale nach unten plaziert und 12-16 Stunden (üN) bei 37 °C inokuliert.

Zur Konservierung eines Stammes wurde 1 ml einer üN-Kultur mit 1 ml sterilem Glycerol in einem Kryo-Röhrchen (Nalgene®) gemischt, 3 Stunden bei 37 °C inokuliert und bei – 80 °C als Dauerkultur eingefroren.

Zur Reaktivierung eines Stammes aus einer Dauerkultur wurde mit einer sterilen Impföse ein Tropfen dieser auf einer LB-Festmedienplatte im „13-Strichverfahren“ (Schlegel, 1985) ausgestrichen und üN bei 37 °C wie oben beschrieben inokuliert. Die durch dieses Verfahren selektierten Einzelkolonien konnten für nachfolgende Versuche verwendet werden.

Saccharomyces cerevisiae

Die Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* erfolgte stets aus einer Einzelkolonie oder aus einer Flüssigkultur, die aus einer Einzelkultur entstanden war.

Wenn nicht anders beschrieben, erfolgte die Kultivierung für 12-16 Stunden (üN) bei 28 °C und 180 rpm in YPD-Medium in einem Schüttler der Firma Infors. Festkulturen wurden in einem Brutschrank der Firma Heraeus mit dem Deckel der Petrischale nach unten plaziert und länger als 48 h bei 28 °C inokuliert.

Zur Konservierung eines Stammes wurde 1 ml einer üN-Kultur mit 1 ml sterilem Glycerol in einem Kryo-Röhrchen (Nalgene®) gemischt, 3 Stunden bei 28 °C inkubiert und bei – 80 °C als Dauerkultur eingefroren.

Zur Reaktivierung eines Stammes aus einer Dauerkultur wurde mit einer sterilen Impföse ein Tropfen dieser auf einer Festmedienplatte im „13-Strichverfahren“ (*Schlegel, 1985*) ausgestrichen und mit dem Deckel der Petrischale nach unten in den Brutschrank plaziert und wie oben beschrieben inokuliert (> 48h). Die durch dieses Verfahren erzeugten Einzelkolonien konnten für nachfolgende Versuche verwendet werden.

2.3.1.2 Messung der Zellzahl von Mikroorganismen

Der Kontrolle des Wachstumsverhaltens von *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* in Flüssigkulturen diene das Verfahren der Trübungsmessung. Die scheinbare Absorption von 1 ml des zu bestimmenden Inokulats wurde bei 600 nm in einem Photometer (Uvikon® 860, Kotron, München) gegen Wasser gemessen (OD₆₀₀-Wert). Nach *Bertram und Gassen (1991)* ergibt sich bei einem OD₆₀₀-Wert von 1,0 eine ungefähre Zellzahl von 8x10⁸ Zellen.

2.3.2 Pflanzliche Zellkulturen von *Ginkgo biloba*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Zellkulturen von *Ginkgo biloba* erzeugt und gepflegt, um für die jeweiligen Experimente Zellmaterial vorzuhalten. Die nachfolgende *Tabelle 2.17* beschreibt die Herkunft der Kulturen.

Tabelle 2.17 Pflanzliche Zellkulturen aus *Ginkgo biloba*

Nummer	Herkunft	Primärgewebe	Medium	Bemerkung
1	eigene Erzeugung	Samenkerne	MS _w OP-fest	Kallus
2	eigene Erzeugung	Samenkerne	4xOP-fest	Kallus
3	eigene Erzeugung	Blätter	MS _w OP-fest	Kallus
4	eigene Erzeugung	Blätter	4xOP-fest	Kallus
5	eigene Erzeugung	Blätter	4x-fest	Kallus
6	DSMZ	unbekannt	MS _w OP-fest	Kallus
7	DSMZ	unbekannt	4xOP-fest	Kallus
8	DSMZ	unbekannt	4x-fest	Kallus
9	eigene Erzeugung	Blätter	MS _w OP-flüssig	Suspensionskultur, aus Kultur Nr. 3
10	eigene Erzeugung	Blätter	4xOP-flüssig	Suspensionskultur, aus Kultur Nr. 4
11	eigene Erzeugung	unbekannt	MS _w OP-flüssig	Suspensionskultur, aus Kultur Nr. 6
12	eigene Erzeugung	unbekannt	4xOP-flüssig	Suspensionskultur, aus Kultur Nr. 7

2.3.2.1 Anlegen und Erhalten von pflanzlichen Zellkulturen

Alle Arbeiten im Zusammenhang mit pflanzlichen Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt (siehe *Kapitel 2.2.3, Seite 32*). Zum Produktschutz wurden Kittel und Mundschutz getragen, die Hände wurden desinfiziert. Die benötigten Chemikalien, Lösungen und Verbrauchsmaterialien sind in *Kapitel 2.1 (Seite 15)*, die benötigte Laborausstattung in *Kapitel 2.2 (Seite 32)* aufgeführt.

Auflegen von Pflanzenteilen zur Erzeugung von Kallus-Kulturen

Kalluskulturen von *Ginkgo biloba* wurden im Rahmen dieser Arbeit angelegt, wenn zuvor vorhandene Kulturen ihr Wachstum einstellten und abstarben.

Das für die Herstellung der Kalluskultur vorgesehene Pflanzenmaterial (Samenkerne bzw. Blätter) wurden durch Baden in Quecksilber-II-chlorid-Lösung (0,1 %, 5 min) oberflächlich desinfiziert. Zum Entfernen der Desinfektionslösung wurde das behandelte Gewebe in sterilem Wasser gebadet (3 mal, je 5 min). Um eine Verdünnung der Quecksilbersalzkonzentration zu gewährleisten, wurde für jeden Badeschritt frisches Wasser verwendet.

Die so desinfizierten Pflanzenteile wurden in groschengroße Stücke zerschnitten und in vorbereitetes Festmedium zur Hälfte eingedrückt. Die Präparate wurden in einem Zellkulturraum bei gleichbleibenden Bedingungen solange gelagert (20 °C, Dauerbeleuchtung), bis aus dem aufgelegten Gewebe Kallusgewebe entwuchs. Dies wurde auf frischen Nährboden transferiert.

Anlegen und Erhaltung von Zellsuspensionskulturen

Zur Gewinnung von Zellsuspensionskulturen wurden 8–10 g Kallusgewebe in 100 ml Flüssigmedium transferiert. Der Hals des Erlenmeyerkolbens wurde abgeflämmt, so daß eventuell an ihm haftende Gewebereste verkohlten. Der Kolben wurde mit einem sterilen Wattestopfen verschlossen und unter den Bedingungen des Zellkulturraumes (20 °C, 400 lx) mit 60 rpm geschüttelt.

Nach 10 Tagen – sofern die Kulturen langsam wuchsen nach 14 Tagen – wurden 12 g einer Kultur in 100 ml frisches Medium transferiert und wie oben beschrieben inkubiert.

2.4 Methoden der Molekularbiologie

2.4.1 Isolierung von genomischer DNA

2.4.1.1 *Isolierung von genomischer DNA aus Bakterien*

DNA aus *E. coli* nach einem modifizierten Protokoll zur Isolierung von Gesamt-DNA aus Actinomyceten nach *Altenbuchner und Cullum (1984)* isoliert. Mit Hilfe dieser Methode ließen sich große Mengen DNA guter Qualität gewinnen. Dazu wurde wie folgt verfahren [die benötigten Chemikalien, Lösungen und Verbrauchsmaterialien sind in *Kapitel 2.1 (Seite 15)*, die benötigte Laborausstattung in *Kapitel 2.2 (Seite 32)* aufgeführt]:

- Zur Gewinnung des Ausgangsmaterials wurden 20 ml LB-Medium (gegebenenfalls mit Antibiotikum) mit einer μ N-Kultur des Zielstammes im Verhältnis 1/1.000 angeimpft und über Nacht inkubiert (37 °C; 180 rpm).
- Die Zellen wurden 10 min bei 4.000x g sedimentiert.
- Das Sediment wurde in STE-Puffer resuspendiert und 45 min bei 37 °C unter gelegentlichem vorsichtigem Mischen inkubiert. Die nun folgenden Pipettierschritte wurden mit abgeschnittenen Spitzen durchgeführt, um eine durch Scherung hervorgerufene Degradation der zu isolierenden DNA zu minimieren.
- Es wurden 2 ml SDS-Lösung (10 %) zugegeben und die Lösung durch Vortexen gemischt.
- Zur Zerstörung der Zellwand wurde die Lösung bei 20 min bei 60 °C inkubiert (alternativ 30 min bei 42 °C).
- Zum Abtrennen von Proteinen wurden 2 ml einer Lösung von Phenol/Chloroform (1:1, pH 8) zugegeben, vorsichtig durch Vortexen gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließendes Zentrifugieren (15 min, 15.000x g) diente der Trennung der Phasen und dem Anreichern der denaturierten Proteine in der Interphase. Die wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt.
- Dieser Schritt wurde sooft wiederholt, bis die wässrige Phase von Proteinen befreit und klar war.
- Zum Fällen der DNA aus der wässrigen Phase wurde der Lösung 1/10 VT Natriumacetat (3M, pH 5) und 1 VT Isopropanol zugefügt und das Gefäß kreisförmig geschwenkt.
- Die so gefällte und zum Knäuel aggregierte DNA wurde mit Hilfe einer Pipettenspitze aus der Lösung in ein Reaktionsgefäß überführt.

- Zum Entsalzen wurde die DNA mit Ethanol (70 %) gewaschen und anschließend bei RT vorgetrocknet.
- Die noch alkoholfuchte DNA wurde durch Zugabe von TE-Puffer gelöst. Der noch enthaltene Alkohol wurde bei 37-42 °C abgedampft und die DNA-Lösung bei 4 °C gelagert.

Vor der Verwendung wurde die Konzentration der DNA-Lösung, wie in *Kapitel 2.4.4*, (Seite 44) beschrieben, bestimmt und die Güte der Präparation mittels Agarose-Gel-elektrophorese verifiziert (siehe *Kapitel 2.4.5.1*, Seite 46).

2.4.1.2 Isolierung von genomischer DNA aus *Saccharomyces cerevisiae*

Diese von Frau Dr. Christel Drewke mündlich mitgeteilte Methode wurde verwendet, um genomische DNA aus *S. cerevisiae* zu isolieren. Die benötigten Chemikalien, Lösungen und Verbrauchsmaterialien sind in *Kapitel 2.1* (Seite 15), die benötigte Laborausstattung in *Kapitel 2.2* (Seite 32) aufgeführt.

- Die Zellen einer 5 ml üN-Kultur in YPD-Medium wurden durch Zentrifugation suspendiert (10 min, 4.000x g) und mit sterilem Wasser gewaschen.
- Nach der Entfernung des Wassers wurde das Zellpellet in 0,5 ml Sphaeroastenpuffer aufgenommen, mit Zymolyase (= Lytikase) (20 µl, 2,5 mg/ml) versetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Sphaeroastierung wurde unter dem Mikroskop verfolgt.
- Die Zellen wurden durch Zentrifugation sedimentiert (10 min, 4.000x g, RT).
- Zur Denaturierung von Proteinen und hochmolekularen Bestandteilen wurde das Zellsediment in 0,5 ml EDTA-Lösung (50 mM) aufgenommen und mit 50 µl SDS-Lösung (10 %) versetzt und gut geschüttelt.
- Zugabe von Kaliumacetat (5 M, pH 5, 200 µl) führte zur Fällung der denaturierten Bestandteile, die durch Zentrifugation abgetrennt wurden (5.000x g, 5 min)
- Zur Fällung der DNA wurde die Lösung mit 2,5 VT Ethanol versetzt. Die präzipitierte DNA setzte sich durch Inkubation bei RT am Boden des Gefäßes ab. Der Überstand wurde entfernt, die DNA an der Luft getrocknet und in 40 µl TE-Puffer gelöst.

Vor der Verwendung wurde die Konzentration der DNA-Lösung, wie in *Kapitel 2.4.4*, (Seite 44) beschrieben, bestimmt und die Güte der Präparation mittels Agarose-Gel-elektrophorese verifiziert (siehe *Kapitel 2.4.5.1*, Seite 46).

2.4.1.3 *Isolierung von genomischer DNA aus pflanzlichem Gewebe*

Die von *Blin und Staffort (1976)* beschriebene Methode wurde zur Isolierung genomischer DNA aus pflanzlichem Gewebe von *Ginkgo biloba* verwendet. Diese Methode lieferte sowohl aus Zellkulturen als auch aus Blättern DNA ausreichender Güte, um diese enzymatisch modifizieren zu können. Zum Einsatz kam entweder frisch gewonnenes oder tiefgefrorenes (-80 °C) Zellkulturmaterial oder frisch geerntetes und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefrorenes Blattmaterial. Die benötigten Chemikalien, Lösungen und Verbrauchsmaterialien sind in *Kapitel 2.1 (Seite 15)*, die benötigte Laborausstattung in *Kapitel 2.2 (Seite 32)* aufgeführt.

- Das zu verarbeitende Pflanzenmaterial (bis zu 10 g) wurde in flüssigem Stickstoff gründlich gemörsert.
- Das gefrorene, pulverisierte Gewebe wurde in 20 ml Lysepuffer P aufgenommen und unter Schwenken 3 h bei 50 °C inkubiert.
- Das so erhaltene Rohlysat wurde mehrfach wie folgt mit organischen Lösungsmitteln extrahiert, um Proteine und makromolekulare Bestandteile zu entfernen: Dreimalige Phenolextraktion (Roti-Phenol, pH 8; alternativ: Kirby-Mix), zweimalige Chloroform-Extraktion zur Entfernung des Restphenols, dreimalige Diethylether-Extraktion zur Entfernung des Chloroforms.

Jedesmal wurde 1 VT des organischen Lösungsmittels eingesetzt und zur Phasentrennung zentrifugiert (10 min, 15.000x g, RT).

- Die erhaltene Nukleinsäurelösung wurde zur Entfernung der RNA mit RNase A (100 µg/ml Endlösung) eine Stunde auf Eis inkubiert.
- Die DNA wurde durch Zusatz von PEG P-Lösung (0,5 VT), vorsichtigem Mischen und Inkubieren auf Eis (30 min) zur Fällung gebracht. Alternativ konnte auch Isopropanol verwendet werden; Unter diesen Bedingungen erhöhte sich jedoch die Salzkontamination der gefällten DNA.
- Die DNA wurde durch Zentrifugation (20 min, 20.000x g, 4 °C) sedimentiert, vom Überstand getrennt und zweimal mit Ethanol (70 %) gewaschen.
- Zurückbleibender Alkohol wurde abgedampft, die DNA in TE-Puffer gelöst und bei 4 °C gelagert.

Vor der Verwendung wurde die Konzentration der DNA-Lösung, wie in *Kapitel 2.4.4, (Seite 44)* beschrieben, bestimmt und die Güte der Präparation mittels Agarose-Gel-elektrophorese verifiziert (siehe *Kapitel 2.4.5.1, Seite 46*).

2.4.2 Isolierung Plasmid-DNA aus *E. coli*

2.4.2.1 Isolierung Plasmid-DNA im Kleinmaßstab (bis 10 µg)

Diese Methode wurde angewendet, um kleine Mengen Plasmid-DNA für die automatische Sequenzierung zu gewinnen oder Transformanten auf den Erhalt des korrekten Plasmides zu prüfen. Auf dieser nach *Kieser (1984)* modifizierten Methode basieren zahlreiche Fertigsysteme zur Plasmid-Reinigung. Durch Angleichen der Lösungsmengen ist diese Methode zum Aufschluß beliebiger Kulturmengen geeignet (Mini-, Midi-, Maxi-Maßstab). Die benötigten Chemikalien, Lösungen und Verbrauchsmaterialien sind in *Kapitel 2.1 (Seite 15)*, die benötigte Laborausstattung in *Kapitel 2.2 (Seite 32)* aufgeführt.

- 2 ml einer üN-Kultur des gewünschten *E. coli*-Stammes in LB-Medium (ggf. incl. Antibiotikum) wurden durch Zentrifugation sedimentiert (10 min, 4.000x g, RT).
- Das nach Abdekantieren des Überstandes erhaltene Zellsediment wurde in 300 µl Puffer P1 resuspendiert.
- Zum Zellaufschluß wurde die Suspension mit 300 µl Puffer P2 gemischt und unter gelegentlichem leichtem Mischen 5 min bei RT inkubiert.
- Durch Zugabe des Puffers P3 wurden die Proteine denaturiert und copräzipitierten mit genomischer DNA in Form weißer Flocken. Diese konnten durch Zentrifugation abgetrennt werden (10 min, 20.000x g, RT).
- Sollte hochreine DNA erhalten werden, wurde die DNA Lösung jeweils mit 1 VT mit Phenol (Rotiphenol) und anschließend mit Chloroform gewaschen. Zur Phasentrennung wurde zentrifugiert (5 min, 20.000x g, RT) und die wässrige Phase weiterverwendet. Dieser Schritt ist fakultativ.
- Aus der so erhaltenen Lösung wurde die DNA durch Zusatz einwertiger Alkohole zur Fällung gebracht und durch Zentrifugation (20.000x g, 10 min, RT oder 4 °C) abgetrennt. Die Verwendung von Isopropanol an Stelle von Ethanol läßt größere Mengen Salz copräzipitieren. Wird Isopropanol verwendet, sollte auf eine Kühlung (4 °C) während der Zentrifugation verzichtet werden (RT).
- Die DNA wurde mit 0,5 ml Ethanol (70 %) gewaschen, im Vakuum getrocknet und in 30 µl Wasser oder TE-Puffer aufgenommen.

Vor der Verwendung wurde die Konzentration der DNA-Lösung, wie in *Kapitel 2.4.4, (Seite 44)*, beschrieben, bestimmt. Wurden High-copy-Plasmide nach dieser Methode isoliert, konnte eine Konzentration von ca. 1 µg/µl erwartet werden.

2.4.2.2 **Isolierung Plasmid-DNA im Großmaßstab (10 µg-200 µg)**

Zur Isolierung großer Mengen DNA wurde das Fertigsystem Wizard Plus® der Firma Promega verwendet. Im Gegensatz zu anderen Methoden und Fertigsystemen zeichnet sich dieses neben guter Ausbeute auch durch die Lieferung von DNA exzellenter Qualität aus, mit der sowohl *Escherichia coli* als auch die Pilze *Saccharomyces cerevisiae* und *Cercospora nicotianae* transformiert werden konnten.

Die Isolierung aus 50 ml üN-Kultur in LB-Medium lieferte für High-copy-Plasmide ca. 100 µg, für Low-copy-Plasmide ca. 50 µg DNA. Ein detailliertes Protokoll befindet sich im Anhang (siehe *Kapitel 7.3.2, Seite 153*).

2.4.3 **Isolierung von messenger-RNA [poly(A⁺)RNA] aus pflanzlichem Gewebe**

Poly(A⁺)RNA wurde benötigt, um die an der Biosynthese des Ginkgotoxins beteiligten Gene durch Klonierung untersuchen zu können. Ihre Isolierung war die Grundlage für nachfolgende Reverse Transkriptionen und verschiedene PCR-Verfahren.

Sowohl Zellkulturen und Blätter von *Ginkgo biloba* als auch Samen der Pflanze sind reich an polymeren, hochmolekularen Substanzen. Bei der Isolierung von RNA jeder Art bereiten die genannten Verbindungen große Schwierigkeiten, da ihre Abtrennung nur mühsam oder nicht gelingt. Daraus resultiert eine Nukleinsäure minderer Qualität, die entweder starker Degradierung unterliegt oder aufgrund ihres Anteils an Begleitstoffen zu einer Verarbeitung ungeeignet ist.

Aus diesem Grund wurden eine Vielzahl von literaturbekannten Isolierungsmethoden getestet. Darunter befanden sich klassische Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Techniken wie auch Affinitätschromatographie-gestützte Reinigungen. Neben der direkten Reinigung der poly(A⁺)RNA (Einschrittverfahren) wurde auch der Umweg über die Zwischenreinigung der Gesamt-RNA und anschließender Isolierung der mRNA probiert.

Gute Isolierungsergebnisse wurden mit dem QuickPrep®Micro mRNA Purification System der Firma Pharmacia Biotech aus Pflanzenmaterial erreicht. Dieses Einschrittverfahren zur direkten Gewinnung der poly(A⁺)RNA basiert auf einer klassischen Tensidlyse des Zellmaterials mit der Guanidiniumthiocyanathemmung der RNAsen. Nachdem die Zielmoleküle an eine Cellulose-oligo(dT)-Affinitätsmatrix gebunden wurden, erfolgte die Abtrennung der unerwünschten Begleitsubstanzen durch eine aufwendige Waschprozedur mit Hoch- und Niedrigsalzpuffern. Dadurch wurden andere Nukleinsäurespezies und Polysacchariden entfernt, bevor die mRNA von der Matrix eluiert wurde.

Das System ermöglichte die Gewinnung von 4-5 µg poly(A⁺)RNA aus 100 mg *Ginkgo biloba* Zellkultur (Feuchtgewicht). Es wurde entsprechend den Angaben des Herstellers verfahren (siehe *Kapitel 7.3.5, Seite 153*).

Zur Quantifizierung der erhaltenen Ribonukleinsäure wurde die UV-Absorption bei 260 nm bestimmt wie in *Kapitel 2.4.4 (Seite 44)* beschrieben die Konzentration berechnet. Zur Reinheitsprüfung wurde der Quotient der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm gebildet, der zwischen 1,7 und 2,0 betragen sollte.

Die poly(A⁺)RNA wurde auf Vorhandensein der Ziel-mRNA im Pool unter Verwendung von Oligonukleotiden für ein zentrales Fragment des Gens mittels RT-PCR und anschließender Agarosegelkontrolle geprüft. Bei gewünschter Qualität konnte sie für Nachfolgereaktionen verwendet werden.

2.4.4 Reinigung, Konzentrierung und Quantifizierung von Nukleinsäuren

Reinigung von Nukleinsäuren

Dieses als PCI-Methode (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Methode) bezeichnete Verfahren eignet sich zum Abtrennen von Proteinen und Zelltrümmern aus DNA-Lösungen und ist Bestandteil klassischer Verfahren zur Nukleinsäuregewinnung, wie z. B. der Plasmidpräparation (vgl. *Kapitel 2.4.2.1, Seite 42*) oder der Isolierung genomischer DNA (vgl. *Kapitel 2.4.1, Seite 39*). Die benötigten Chemikalien, Lösungen und Verbrauchsmaterialien sind in *Kapitel 2.1 (Seite 15)*, die benötigte Laborausstattung in *Kapitel 2.2 (Seite 32)* aufgeführt.

- Die wässrige DNA-Lösung wurde mit 1 VT „Kirby-Mix“ (siehe *Tabelle 2.9, Seite 22*) versetzt und mehrfach vorsichtig invertiert.
- Zur Phasentrennung und zum Sammeln der durch Phenol denaturierten Bestandteile wurde zentrifugiert (16.000x g, 15 min)
- Die wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt. Diese Prozedur wurde so häufig wiederholt, bis keine denaturierten Proteine (weißer Schleier) mehr an der Phasengrenze zu beobachten waren (typischerweise 3 mal).
- Zur Abtrennung von Phenol, das in nachfolgenden Reaktionen enzymatische Aktivität hemmen würde, wurde mit 1 VT Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt. Durch Zentrifugation wurden die Phasen getrennt und die wässrige DNA-Lösung in ein neues Gefäß überführt.
- Zur Konzentrierung der DNA wurde wie im Schritt „*Konzentrierung von Nukleinsäure*“ verfahren.

Konzentrierung von Nukleinsäuren

Die Präzipitation von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen erfolgte mit Isopropanol oder Ethanol. Bei kleineren Volumina wurde Isopropanol verwendet; war eine quantitative Fällung unter Vermeidung einer Salz-Copräzipitation erforderlich, wurde Ethanol der Vorzug gegeben.

- Die wässrige DNA-Lösung wurde mit 0,1 VT Natriumacetat-Lösung (3 M, pH 4,5) versetzt (zur Präzipitation werden einwertige Kationen benötigt) und mit 0,7 VT Isopropanol bzw. 2 VT Ethanol vermischt. War – wie im Fall der RNA-Gewinnung – eine quantitative Fällung erwünscht, wurden 6 VT Ethanol eingesetzt.
- Bei Verwendung von Ethanol als Reagenz wurde 15 min auf Eis inkubiert. Zentrifugation (> 15.000x g, 15 min) sedimentierte die Nukleinsäuren.
- Das Nukleinsäuresediment wurde, um Salze zu entfernen, mit Ethanol 70 % (RT) gewaschen und erneut sedimentiert.
- Der Überstand wurde verworfen. Die Nukleinsäure (außer genomische DNA und RNA) wurde im Vakuum von Lösungsmittelresten befreit (Speed Vac® Plus SC110A, Savant, CA, USA).
- Die getrocknete Nukleinsäure wurde je nach Bedarf in TE-Puffer oder in Wasser aufgenommen.

Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung von Nukleinsäuren erfolgte durch eine UV-spektroskopische Vermessung bei 260 nm. Die nach *Sambrook et al.* (1989) der Absorption von 1,0 ($A_{260} = 1,0$) proportionalen Konzentrationen verschiedener Nukleinsäurespezies sind in der *Tabelle 2.18* zusammengestellt.

Tabelle 2.18 Nukleinsäure-Absorptionskoeffizienten A_{260}

Nukleinsäurespezies	Konzentration bei $A_{260}=1,0$
ds DNA	50 µg/ml
ss DNA und RNA	40 µg/ml
Oligonukleotide bis 30bp	30 µg/ml

Die Konzentration einer Nukleinsäurelösung errechnet sich wie folgt:

$$[c] = A_{260} \cdot \text{Absorption} \cdot \text{Verdünnung} \quad [\mu\text{g/ml}]$$

Da Proteine bei 280 nm eine UV-Absorption zeigen, kann der Quotient der Absorptionen beider Wellenlängen als Qualitätskriterium für die Reinheit herangezogen werden. Dieser sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen.

2.4.5 Agarose-Gelelektrophorese

2.4.5.1 Native Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäuren lassen sich aufgrund ihrer polyanionischen Struktur im elektrischen Feld trennen. Die Moleküle migrieren entsprechend ihrer Ladung von der Kathode zur Anode. Ist eine relative Trennung der Moleküle zu ihrer Größenabschätzung gewünscht, kann gepufferte Agarose als Trennmatrix dienen. Für basengenaue Trennung von DNA-Molekülen ist eine Polyacrylat-Matrix nötig (siehe *Kapitel 2.4.13, Seite 68*).

In beiden Fällen erfolgt die Trennung der Moleküle größenabhängig. Kleine Moleküle migrieren schneller als große. Die Migrationsgeschwindigkeit und die Molekülgröße stehen in einem exponentiellen Zusammenhang. Die Trennschärfe für einzelne Molekülgrößenintervalle läßt sich durch die Konzentration der Agarosematrix variieren. Nach *Sambrook et al* (1989) eignen sich Matrixkonzentrationen von 0,3 % Agarose für DNA-Moleküle von einer Größe bis von 60 kb. Höhere Konzentrationen von 2 % ermöglichen die Trennung von Fragmenten bis zu einer Größe von 0,1 kb.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die DNA-Agarose-Gelelektrophorese für analytische und präparative Zwecke verwendet. Die benötigten Chemikalien, Lösungen und Verbrauchsmaterialien sind in *Kapitel 2.1 (Seite 15)*, die benötigte Laborausstattung in *Kapitel 2.2 (Seite 32)* aufgeführt.

- Zur Bereitung der Agarosegellösung wurde eine Agarose-Suspension in 1xTAE-Puffer in einem Mikrowellengerät zum Sieden erhitzt. Dem Trennziel entsprechend wurde die Agarosekonzentration zwischen 0,8 % und 2 % variiert.
- Nach dem Abkühlen der Lösung auf ca. 60 °C wurde der Lösung 5 µl/100 ml Ethidiumbromid-Lösung (1 %) zugesetzt und im Trennschlitten mit Taschenformer zur Starre abgekühlt (RT oder 4 °C-Kühlschrank).
- Die komplette Gießvorrichtung wurde in eine Vertikalelektrophoreseapparatur eingebracht, die Matrix mit TAE-1x-Puffer überschichtet und die Taschenschablone herausgezogen.
- Die vorbereitete Probelösung, bestehend aus DNA-Lösung und DNA-Auftragspuffer 6x (0,2 VT), wurde in die Probetaschen gefüllt. Die im Ladepuffer enthaltenen

Farbstoffe halfen, den Fortgang der Trennung visuell zu verfolgen. Der Farbstoff Bromphenolblau migriert entsprechend einer DNA-Größe von 300 bp, Xylencyanol entsprechen einer Größe von 4.000 bp. Zur detaillierten Größenabschätzung der DNA-Moleküle diente ein gleichzeitig aufgetragener DNA-Größenstandard-Mix. Mit dem Anlegen von Spannung (60-120 V) startete der Trennvorgang.

- Nach Beendigung der Trennung wurde das Ergebnis durch UV-Durchlichtbestrahlung detektiert und durch Fotografie (Polaroid-MP4-Kamera, Film Typ 667) dokumentiert. Das in der Gelmatrix enthaltene Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA. UV-Licht der Wellenlänge 302 nm regt den Komplex zur Fluoreszenz an. Ein Rotfilter ermöglichte die Abbildung des Fluoreszenzlichtes trotz UV-Hintergrundstrahlung.

2.4.5.2 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Die denaturierende Agarose-Gelelektrophorese diente zur Untersuchung von RNA. Sie wurde zum einen als eine dem Northern-Transfer vorgeschaltete Trennmethode eingesetzt, zum anderen um eine Aussage über die Qualität isolierter mRNA zu erhalten,

Das Milieu der Trennung bietet die Möglichkeit, RNA in linearisierter Form der Größe nach unabhängig von ihrer Sekundärstruktur zu trennen. Für eine Qualitätskontrolle der RNA ist deren Visualisierung notwendig. Zu diesem Schritt konnte der Probe -ähnlich der nicht-denaturierenden Gelelektrophorese - Ethidiumbromid als „Interkalationsreagenz“ zugesetzt werden. Eine Farbgebung der linearen RNA im kurzwelligen UV-Licht erfolgt jedoch wohl durch einen Aggregationseffekt des Reagenzes an die Nukleinsäure.

Soll ein Gel in einem weiterführenden Northern-Transfer-Versuch eingebracht werden, behindert das Ethidiumbromid den weiteren Versuchsablauf. Um dennoch eine Information über den Trennvorgang erhalten zu können, wurden in einem solchen Fall neben den ungefärbten Proben auch Ethidiumbromid-gefärbte Proben und ein Molekulargewichtsstandard parallel analysiert.

Alle Plastikmaterialien wurden zuvor 1 h in RNase-Denaturierungslösung gebadet und mit DMPC-behandeltem Wasser abgespült. Die benötigten Chemikalien, Lösungen und Verbrauchsmaterialien sind in *Kapitel 2.1 (Seite 15)*, die benötigte Laborausstattung in *Kapitel 2.2 (Seite 32)* aufgeführt. In beiden Fällen wurde wie folgt verfahren:

- Es wurde ein 1,2 %iges Gel bereitet. Dazu wurde die benötigte Menge Agarose (jeweils aus einer frisch geöffneten Packung) in DMPC-Wasser und MOPS-10x (0,1 VT Endkonzentration) durch Erhitzen gelöst und auf 80 °C abgekühlt.

- Bei dieser Temperatur wurde wässrige Formaldehydlösung (37 %, 12,3 M) bis zu einer Endkonzentration von 18 % zugegeben und die Lösung in einem Gelschlitten erstarren lassen.
- Zum Beladen der Probenaschen wurde der Gelschlitten in die Elektrophoreseapparatur eingebracht und mit Formaldehydgel-Puffer-1x überschichtet.
- Probenvorbereitung: Die zu analysierende RNA (4,5 µl) wurde mit Formaldehydgel-Puffer-5x (4 µl), wässriger Formaldehyd-Lösung (12,3 M = 37 %, 3,5 µl) und Formamid (10 µl) gemischt und 15 min bei 65 °C denaturiert. Die Probe wurde sofort auf Eis abgekühlt, um eine Renaturierung der Nukleinsäure zu verhindern
- Die Probe wurde in die Probenaschen gegeben. Sollte die RNA mit Ethidiumbromid visualisiert werden, wurde die Pipettenspitze zuvor in Ethidiumbromid-Lösung (1 %) getaucht. Mit der Ethidiumbromid-benetzten Spitze wurde anschließend der Einfüllvorgang vorgenommen.
- Die Trennung erfolgte bei 80 V über 1-2 h.
- Zur Dokumentation wurde das Gel im UV-Durchlicht fotografiert. Ungefärbte Spuren konnten direkt dem Northern-Transfer zugeführt werden (siehe *Kapitel 2.4.14, Seite 71*).

2.4.5.3 *Dokumentation der Gelelektrophorese*

Nach der Trennung der Nukleinsäuren wurde diese auf dem UV-Durchlichttisch visualisiert und mit einer Polaroid-MP4-Sofortbildkamera dokumentiert (siehe *Kapitel 2.2.4, Seite 33*).

2.4.5.4 *Extraktion von DNA aus Agarosegelen*

Wurde DNA im präparativen Maßstab mittels Agarose-Gelelektrophorese getrennt (siehe *Kapitel 2.4.5.1*), war eine selektive Rückgewinnung von Molekülen möglich. Zu diesem Zweck wurde das Fertigsystem „Qiaquick Gel Extraktion Kit“ der Fima Qiagen, Hilden, nach den Vorgaben des Herstellers angewendet. Die Vorgehensweise ist im *Kapitel 7.3.1, Seite 153* beschrieben.

Dieses Verfahren eignete sich, um DNA-Fragmente im einem Größenbereich von 100 bp bis 10 kb bis zu einer Menge von 10 µg zurückzugewinnen. Diese Methode wurde sowohl für die Reinigung von DNA-Restriktionsfragmenten als auch von PCR-Produkten verwendet. Eine Wiederfindungsrate von 80 %-90 % erlaubt eine Abschätzung der rückgewonnenen DNA-Menge für nachfolgende Reaktionsschritte.

2.4.6 Hydrolyse von DNA durch Typ-II-Restriktionsendonucleasen

Zur sequenzspezifischen Hydrolyse von DNA fanden Typ-II-Endonucleasen Verwendung. Die für ein Enzym oder deren Kombination benötigten Reaktionsbedingungen wurden nach Angaben des Herstellers aus 10fach konzentrierten Stocklösungen durch Verdünnung mit Wasser hergestellt. Benötigte ein Enzym die Anwesenheit einer Proteinkomponente zur Reaktion, wurde diese in Form von 10fach konzentrierter BSA-Lösung dem Reaktionsgemisch zugesetzt.

Die Reaktionstemperatur wurde nach den Angaben des Herstellers eingestellt und durch ein Wasserbad oder einen Brutschrank gewährleistet. Die Reaktionszeit betrug für Plasmide bis zu einer Menge von bis zu 5 µg 3-4 Stunden, für größere Mengen und genomische DNA 12-16 Stunden (üN).

Waren die für ein Enzym benötigten Reaktionsbedingungen einer Doppelrestriktion inkompatibel, erfolgte die Hydrolyse sequentiell. Nach vorangegangener Restriktion mit Enzym 1 unter optimalen Bedingungen wurde der Ansatz mittels Agarose-Gelelektrophorese gereinigt (siehe *Kapitel 2.4.5.1, Seite 46*). Die Ziel-DNA wurde aus dem Gel zurückgewonnen (siehe *Kapitel 2.4.5.4, Seite 48*) und die zweite Restriktionsreaktion wurde unter für das jeweilige Enzym optimierten Bedingungen durchgeführt.

Die benötigten Chemikalien, Lösungen und Verbrauchsmaterialien sind in *Kapitel 2.1 (Seite 15)*, die benötigte Laborausstattung in *Kapitel 2.2 (Seite 32)* aufgeführt. Die Restriktionsansätze wurden nach folgendem Schema zubereitet:

Tabelle 2.19 *Zusammensetzung von Restriktionsansätzen*

Komponente	Menge [µl]	
DNA-Lösung	x µl	
Puffer, 10fach *	2 µl	
BSA, 10fach *	2 µl	
Enzym 1*	1 µl	
Enzym 2*	1 µl	
H ₂ O	ad	20 µl

* Lösungen nach Angaben des Herstellers

Die verwendeten Endonucleasen wurden nach Herstellerangaben verdünnt, sodaß jeweils 1 µl Enzymlösung die für die Reaktion nötige Menge Protein enthielt. Sollte eine größere Menge DNA-Lösung einer Hydrolyse unterzogen werden, wurde die Ansatzdimension durch Vervielfachung angepaßt.

Die Kontrolle der Hydrolyseeffizienz erfolgte mit einer Agarose-Gelelektrophorese. Sollten die hydrolysierten DNA-Fragmente in einer Nachfolgereaktion Verwendung finden, wurden diese aus der Gelmatrix eluiert.

2.4.7 Klonierung von DNA

2.4.7.1 Ligation

Die Kondensation von DNA-Doppelsträngen in Form der Bildung inter- und intramolekularer Phosphordiesterbindungen zwischen den 3'-Hydroxyl- und den 5'-Phosphorsäureesterfunktionen zweier DNA-Moleküle wird als Ligation bezeichnet. Diese Reaktion kann in Laboranwendungen durch das virale Protein T4-Ligase unter Energieverbrauch (ATP) katalysiert werden.

Die Ligation wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Klonierung von DNA-Fragmenten verschiedenen Ursprungs in Vektoren verwendet. Kamen abweichend von der hier beschriebenen Vorgehensweise Fertigsysteme zum Einsatz, ist deren Anwendung im *Kapitel 2.4.7.2, (Seite 51)* beschrieben. Die benötigten Chemikalien, Lösungen und Verbrauchsmaterialien sind in *Kapitel 2.1 (Seite 15)*, die benötigte Laborausstattung in *Kapitel 2.2 (Seite 32)* aufgeführt. Das Reaktionsgemisch wurde nach den Angaben des Herstellers wie folgt zubereitet:

Tabelle 2.20 Zusammensetzung der Ligationsansätze

Komponente	Ligation kohäsiver DNA-Enden	Ligation glatter DNA-Enden
DNA-Fragment	x ng	x ng
geöffneter Vektor	50 ng	50 ng
Puffer, 10 fach	1 µl	1 µl
PEG 4.000, 50 %	---	1 µl
ATP, 10 mM	1 µl	1 µl
T4-Ligase	2 u	8 u
H ₂ O	ad 10 µl	ad 10 µl

Die Ligation von 50 ng Vektor-DNA erbrachte gute Ergebnisse. Die Menge des zu klonierenden Produktes unter Einbeziehung der Molekulargewichtsverhältnisse wurde so gewählt, daß für die Ligation kohäsiver Enden ein Verhältnis von 1:1 (Ziel-/Vektor-DNA) und für die Ligation glatter Ende ein Verhältnis von 5:1 (Ziel-/Vektor-DNA) vorlag.

Konnte aufgrund von Verdünnungen von Vektor-/ Ziel-DNA die Ansatzgröße von 10 µl nicht eingehalten werden, wurde diese durch Vervielfältigung entsprechend angepaßt.

2.4.7.2 Klonierung von Taq-generierten PCR-Produkten in T-Überhangvektoren

Sollten die durch rekombinante DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) erzeugten PCR-Produkte durch Klonierung konserviert werden, mußte ein gesondertes System angewendet werden. Das Enzym besitzt die Eigenschaft einer DNA-unabhängigen terminalen Nukleotidtransferase. Diese bewirkt eine Kondensation eines einzelnen Desoxyadenosine-Überhanges an den 3'-Enden doppelsträngiger DNA.

Diese Eigenschaft kann genutzt werden, um die erzeugte DNA in einen Vektor zu ligieren, der seinerseits mit einem einzelnen T-Überhang am 5'-Ende der Vektorarme ausgestattet ist. Dieser Reaktionsmechanismus ist dem der Ligation kohäsiver DNA-Enden vergleichbar und zeichnet sich durch eine deutlich erhöhte Effizienz gegenüber der Ligation glatter Enden aus.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst auf zwei der am Markt bekanntesten T-Überhangklonierungssysteme zurückgegriffen (siehe unten). Aus Kostengründen bot sich jedoch die Eigensynthese eines Vektorsystem mit diesen Eigenschaften an. *Diefenbach et al.* (1995) beschreiben eine Methode, die erfolgreich mit dem Vektor pBluescript SK(-) angewendet wurde und zu sehr guten Klonierungsergebnissen führt:

TOPO TA[®]-Cloning Kit (Invitrogen)

Das TOPO TA Cloning[®] System der Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande, erlaubt eine sehr effiziente Klonierung Taq-Polymerase generierter PCR-Produkte innerhalb kurzer Zeit. Der Hersteller erreicht dies durch eine kovalente Bindung des Enzyms Topoisomerase I (aus einem *Vaccinia*-Virus) an den T-Überhang des Vektors (pCR[®]2.1-TOPO). Das anwendungsfertig vorbereitete Reaktionsgemisch wurde immer dann eingesetzt, wenn PCR-Produkte geringer Konzentration kloniert werden sollten (z. B. nach RACE-PCR). Die Ligation erfolgte in der halben vom Hersteller empfohlenen Ansatzgröße, ohne daß wesentliche Effektivitätseinbußen im Vergleich zu den Herstellerangaben zu beobachten waren.

Die Transformation wurde wahlweise mit den vom Hersteller gelieferte ultra-kompetente Zellen des Stammes *E. coli TOP 10*´ oder mit im Haus vorhandenen kompetente Zellen durchgeführt. Unabhängig von der Art der verwendeten Zellen wurden sowohl

die Ligation als auch die Transformation nach den Herstellervorschriften (Version K2) ausgeführt (siehe Kapitel 7.3.3, Seite 153).

Die erhaltenen Kolonien konnten durch PCR oder Restriktionstestung der isolierten Plasmide überprüft werden. Beide Verfahren sind möglich, da der Vektor neben den die Klonierungsstelle flankierenden *Eco RI*-Restriktionsschnittstellen auch die Universalprimerstellen M13_{rev}, M13_{fwd} und T₇ zur Verfügung stellt.

pGem-T-easy-Cloning-Kit (Promega)

Alternativ zum oben beschriebenen Produkt wurde das der Firma Promega eingesetzt. Da die Klonierungseffizienz etwa 10fach niedriger einzuschätzen ist als die des Invitrogen-Systems, fand es vor allem dann Verwendung, wenn ausreichende Mengen an Start-DNA zur Verfügung standen.

Die Transformation erfolgte mit im Hause vorhandene kompetente *E. coli* Zellen. Unabhängig vom Stamm der verwendeten Zellen wurden sowohl die Ligation als auch die Transformation nach den Herstellervorschriften ausgeführt (siehe Kapitel 7.3.4, Seite 153).

Erzeugung eines T-Überhangvektors

Die Grundlage für die Herstellung eines derartigen Systems ist ein Klonierungsvektor, der eine *Eco RV*-Restriktionsschnittstelle im Polylinker besitzt. Der Vektor pBluescript SK(-) erfüllt diese Bedingungen und wurde für diese Synthese nach folgender Vorschrift behandelt [die benötigten Chemikalien, Lösungen und Verbrauchsmaterialien sind in Kapitel 2.1 (Seite 15), die benötigte Laborausstattung in Kapitel 2.2 (Seite 32) aufgeführt]:

- Restriktionsschnitt des Vektors mit *EcoR V*: 87 µl einer Plasmidlösung (10 µg DNA) wurden mit 10 µl *EcoR V*-Puffer (10fach, nach Herstellerangaben), 1 µl BSA (10 mg/ml) und 2 µl *EcoR V*-Enzym(10 u/µl) gemischt. Die Reaktion wurde 12-16 h bei 37 °C inkubiert (üN).
- Fällung des geöffneten Vektors: Die Lösung wurde mit 10 µl NaCl (2 M) und 250 µl Ethanol versetzt, 10 min bei -20 °C inkubiert und die präzipitierte Nukleinsäure durch Zentrifugation (20.000x g, RT, 20 min) sedimentiert. Das Sediment wurde getrocknet und in 90 µl Wasser gelöst.
- Restriktionskontrolle: 5 µl wurden der DNA-Lösung mit Agarose-Gelelektrophorese auf vollständige Restriktion kontrolliert (siehe Kapitel 2.4.5.1, Seite 46). Als Kontrolle kann ein parallel analysierter, geöffneter Vektor dienen.

- Addition des T-Überhanges: 85 µl DNA-Lösung wurden mit 10 µl *Taq*-Polymerase-Puffer (10fach, nach Angaben des Herstellers), 2 µl dTT (100 µM) und 3 µl *Taq*-Polymerase (2 u/µl) gemischt und zwei Stunden bei 70 °C auf dem PCR-Block inkubiert.
- Reinigung: Der Ansatz wurde mit 1 VT Kirby-Mix ausgeschüttelt. Die Phasentrennung wird durch Zentrifugieren herbeigeführt (20.000x g, 5 min). In einem neuen Gefäß wird die DNA durch Zugabe von 1/10 VT Natriumchlorid-Lösung (2 M) und 2,5 VT Ethanol aus der wässrigen Phase präzipitiert und durch Zentrifugieren (20.000x g, 20min) sedimentiert.
- Die ringoffene DNA wurde getrocknet (SpeedVac) und in 100 µl TE (0,1fach) bei 4 °C gelagert.

Für jeweils eine Ligation eines PCR-Produktes wurde 1 µl der nach dieser Vorschrift bereiteten Lösung als T-Überhangvektor in die im *Kapitel 2.4.7.1*, (Seite 50) beschriebene Reaktion eingesetzt. Es wird wie beschrieben verfahren. Die Transformation erfolgte wie in *Kapitel 2.4.8*, Seite 53, beschrieben.

2.4.8 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

Erzielen der Transformationskompetenz nach Inoue et al.

Zur Transformation von *E. coli*-Zellen wurde die Methode nach *Inoue et al.* (1990) verwendet. Dieses im Vergleich zu herkömmlichen Calciumchloridmethoden aufwendigere Verfahren zeichnet sich durch eine Transformationseffizienz von 10^7 bis 10^8 cfu/µg DNA aus.

Die folgenden Arbeitsschritte wurden stets unter sorgfältiger Eiskühlung durchgeführt; verwendete Lösungen, Reaktionsgefäße und Zentrifugen wurden vorgekühlt. Der TB-Puffer wurde frisch vorbereitet (die benötigten Chemikalien, Lösungen und Verbrauchsmaterialien sind in *Kapitel 2.1* (Seite 15), die benötigte Laborausstattung in *Kapitel 2.2* (Seite 32) aufgeführt]:

- 50 ml LB-Medium (ggf. incl. Antibiotikum für Resistenzmarker des Ausgangsstammes) wurden mit 500 µl einer üN-Kultur des gewünschten Stammes angeimpft und bei 24 °C, 180 rpm bis zu einer OD_{600} von 0,5-0,7 inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde mindestens 10 min auf Eis gelagert und anschließend bei 4.000x g, 4 °C, 10 min sedimentiert.

- Die Bakterien wurden in 38 ml eisgekühlten TB-Puffer resuspendiert und anschließend durch Zentrifugieren sedimentiert. Nach diesem Waschschrift wurde das Pellet in 10 ml TB-Puffer aufgenommen.
- Abweichend von der Originalvorschrift wurden die Bakterien erneut sedimentiert und in 2 ml TB-Puffer aufgenommen. Die Suspension wurde mit 150 µl DMSO versetzt und in 100 µl Aliquots geteilt.
- Sollte die Transformation am selben Tag oder am Folgetag durchgeführt werden, wurde die Bakteriensuspension auf Eis oder im Kühlschrank gelagert. Andernfalls wurden die Bakterien zur Vorratshaltung in Isopropanol (-80 °C) schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Auch nach einem viertel Jahr Lagerung war kein wesentlicher Verlust der Transformationskompetenz im Vergleich zum Herstellungstag festzustellen.

Transformation mittels Hitzeschockverfahren

Zur Transformation wurde eine nach dem oben beschriebenen Verfahren bereitete Bakteriensuspension einem Kälte/Hitze-Programm unterzogen, das die Bakterien veranlaßte, die sich in der Lösung befindende DNA aufzunehmen.

Zusätzlich zu den gewünschten Transformationsreaktionen wurde eine Reaktion mit 10 ng eines Standardplasmides (z. B. pGem3Zf⁽⁺⁾) als Positivkontrolle und eine mit 1 µl sterilem Wasser als Negativkontrolle durchgeführt:

- 100 µl Bakteriensuspension wurden mit 10 ng Plasmid oder 1-5 µl Ligationsansatz (siehe Kapitel 2.4.7.1, Seite 50) gemischt und 30 min auf Eis inkubiert.
- Anschließend wurden die Zellen einem Hitzeschock (42 °C, 45 sec) unterzogen und sofort wieder 2 min auf Eis abgeschreckt. Sollten Bakterien des Stammes *E. coli* BL21 oder Verwandte transformiert werden, so wurde die Hitzeschockzeit auf 30 sec reduziert.
- Zur Regeneration der Bakterien wurden der Suspension 800 µl SOC-Medium zugefügt und diese bei 37 °C, 180 rpm geschüttelt. Die Dauer der Regenerationszeit wurde in Abhängigkeit des auf dem transformierten Plasmid vorgegebenen Selektionsmarker gewählt. Sie betrug für β-Lactam-Antibiotika und Tetracyclin eine 30 min, für Kanamycin 60 min.
- Abhängig von der erwarteten Transformationseffizienz wurden je Reaktion 50-300 µl der regenerierten Bakteriensuspension auf vorgewärmte LB-Antibiotikaplaten ausgestrichen und ca. 16 h bei 37 °C mit dem Deckel nach unten inkubiert.

Wird eine β -Lactam-Antibiotikaresistenz als Selektionsmarker gewählt, kann es zu einer sogenannten „Satellitenbildung“ kommen: Im Umkreis von wenigen Millimetern um eine Plasmid-tragende Kolonie bilden sich feine Kolonien nicht Plasmid-tragender Bakterien. Diese können wachsen, da von der Hauptkolonie ausgeschiedene β -Lactamase in das Medium diffundiert und lokal die Antibiotikakonzentration unter die minimale Hemmkonzentration absenkt. Dieses Phänomen kann durch Inkubation bei 30 °C gemindert werden.

Kontrolle des Transformationsergebnisses

Zur Kontrolle des Transformationsergebnisses wurde eine Kolonie in 3 ml antibiotikahaltigem LB-Medium über Nacht inkubiert. Von 2 ml der Kultur wurde das Plasmid isoliert (*siehe Kapitel 2.4.2.1, Seite 42*) und einer Kontrollrestriktion unterzogen (*siehe Kapitel 2.4.6, Seite 49 und Kapitel 2.4.5.1, Seite 46*).

2.4.9 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* mit Plasmid-DNA

Erzielen der Transformationskompetenz

Transformationskompetente Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* wurden nach folgendem Verfahren erhalten:

- 50 ml YP-Medium wurden mit einer Einzelkolonie von *Saccharomyces cerevisiae* versetzt und üN inokuliert (30 °C, 220 rpm).
- 1 ml dieser Kultur wurde verwendet, um 50 ml vorgewärmtes YP-Medium (30 °C) anzupflanzen. Diese Kultur wurde bis zu einer $OD_{600}=0,5$ bei 30 °C und 220 rpm inokuliert.
- Die Kultur wurde auf 4 °C abgekühlt und die Zellen sedimentiert (3000x g, 5 min). Der Überstand wurde verworfen.
- Das Zellsediment wurde in 1 ml TE-LiAc-Lösung (1fach, pH 7,5) resuspendiert und sofort wieder sedimentiert (1200x g, 5 min).
- Das Zellsediment wurde in 0,5 ml TE-LiAc-Lösung (1fach, pH 7,5) resuspendiert. Der Lösung wurden 100 μ l Glycerin zugesetzt und die Mischung à 50 μ l aliquotiert.
- Die Suspension konnte sofort der Transformationsprozedur zugeführt werden oder bei -80 °C gelagert werden.

Transformation der Hefe-Zellen

- 50 µl der nach oben beschriebenen Verfahren erhaltenen Zellsuspension wurden mit 1 µg des zu transformierenden Plasmides und 50 µg Einzelstrang-Heringssperma-DNA (frisch denaturiert) auf Eis gemischt.
- Dieser Suspension wurden 300 µl einer Mischung aus 240 µl PEG 4000 (50 %), 30 µl TE-Puffer (10fach, pH 7,5) und 30 µl LiAc-Lösung (10fach, pH7,5) zugesetzt. Der Ansatz wurde 30 min bei 30 °C inkubiert.
- Der Suspension wurden 35 µl DMSO zugefügt und diese einem Hitzeschock (42 °C, 6 min) unterzogen.
- Die Suspension wurde sofort 1 min auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation sedimentiert (1200x g, 5 sec, 4 °C).
- Das Sediment wurde in TE-Puffer (1fach, pH7,5) (200 µl) resuspendiert und auf SD-Glucose-Festmedienplatten ausgestrichen.
- Das Nährmedium wurde 48-72 h bei 28 °C mit dem Deckel der Platten nach unten inkubiert.

Kontrolle der Transformationsergebnisses

Die nach dem beschriebenen Protokoll erhaltenen rekombinanten Klone von *Saccharomyces cerevisiae* konnten durch eine PCR auf den Erhalt der gewünschten DNA-Sequenz kontrolliert werden. Das Reaktionsgemisch wurde, wie in *Kapitel 2.4.10* (Seite 57) beschrieben, bereitet. Als Startmoleküle der PCR dienten Oligonukleotide, die für die in das transformierte Plasmid inserierte DNA-Sequenz spezifisch waren. Ohne das Plasmid zu isolieren, konnte es dem Reaktionsgemisch zugeführt werden, indem ein Teil der auf dem Selektionsmedium gewachsenen Kolonie unter sterilen Bedingungen in das Reaktionsgemisch transferiert wurde.

Abhängig von der Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotide wurde ein Temperaturschema analog zu dem in *Tabelle 2.22* (Seite 59) dargestellten verwendet. Zur Zerstörung der Hefe-Zellen wurde die initiale Denaturierungsphase der Reaktion auf 30 min ausgedehnt. Erst nach dieser Denaturierung wurde die *Taq*-Polymerase dem Reaktionsansatz zugefügt.

Das Ergebnis der PCR wurde durch Agarose-Gelelektrophorese (siehe *Kapitel 2.4.5.1*, Seite 46) kontrolliert. Wurde ein DNA-Fragment erwarteter Größe polymerisiert, konnte davon ausgegangen werden, daß der Klon das korrekte Plasmid trug. In diesem Fall wurde er außerdem auf die korrekte Expression des Proteins getestet (siehe *Kapitel 2.5.4*, Seite 82).

2.4.10 Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Veröffentlichung von *Saiki et al.* (1988) charakterisiert die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) als eine Oligonukleotid-gerichtete enzymatische Vermehrung von DNA. Das dazu benötigte zyklische Temperaturprogramm beinhaltet drei wesentliche Schritte:

- Denaturierung: Trennen des DNA-Doppelstranges durch Hitze in Einzelstränge.
- Annealing: Anlagerung der Oligonukleotide in Form einer Hybridisierungsreaktion an spezifische Regionen der Ziel-DNA (*engl. anneal* kommt aus der Verhüttung/Schwerindustrie und meint eigentlich das Kühlen einer Glas- oder Metallschmelze)
- Extension: Durch eine DNA-Polymerase vermittelte Verlängerung des DNA-Stranges an seiner komplementären Matrize.

Die Wiederholung dieser Schritte führt zu einer exponentiellen Vermehrung des Startmoleküls, die theoretisch dieser Gleichung folgt:

$$N_n = N_0 \cdot 2^n$$

Dabei ist: N_n die Anzahl der Moleküle nach n Zyklen
 wenn N_0 die Anzahl der Startmoleküle
 und n die Anzahl der Zyklen darstellt

Diese Gleichung suggeriert eine stetige Verdopplung der Molekülzahl mit jedem Zyklus. Tatsächlich ist jedoch davon auszugehen, daß mit zunehmender Zyklenzahl die Effektivität der Reaktion nachläßt und dadurch keine exponentielle Steigerung mehr erreicht werden kann.

Reaktionsbedingungen und technische Voraussetzungen der PCR

Abhängig von der Art der zu amplifizierenden Sequenzen wurden die Reaktionsbedingungen variiert. *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* wurde in Standardreaktionen verwendet. War etwa bei der Polymerisation von offenen Leserahmen eine höhere Lesegenauigkeit notwendig, wurde die *Pwo*-Polymerase aus *Pyrococcus woesei* verwendet. Dieses als *Proofreading*-Polymerase bezeichnete Enzym besitzt eine zusätzliche 3'-5'-Exonuklease-Aktivität, die falsch polymerisierte Basenpaarungen korrigiert.

Die Reaktionsbedingungen sind abhängig von der verwendeten Matrize, den verwendeten Oligonukleotiden und der Länge des zu amplifizierenden Segmentes. Häufig müssen einfach oder mehrfach degenerierte Primer eingesetzt werden. Diese Degeneration senkt die Spezifität der Reaktion. Dies muß gegebenenfalls durch verschiedene Maßnahmen korrigiert werden (vgl. *Dieffenbach 1995*).

Eine Standard-PCR – z. B. zur Amplifikation eines Plasmid-codierten Gens – wurde nach folgendem, unten aufgeführten Schema bereitet. Waren Modifikationen notwendig, wurde wie bei *Dieffenbach (1995)* beschrieben verfahren:

Zusammensetzung des Reaktionsgemisches

Tab. 2.21 zeigt die Zusammensetzung eines Standard-PCR- Reaktionsgemisches. Dabei wurden die Komponenten 1 bis 7 in absteigender Reihenfolge vorgemischt. Die Komponente 8 (*Taq*-Polymerase) wurde erst in Stufe 2 des Reaktionstemperaturschemas (vgl. *Tabelle 2.22*) nach der Denaturierung der Matrize in das Gemisch eingebracht. Dadurch konnte die Enzymaktivität geschont und die Effizienz der Reaktion erhöht werden.

Tabelle 2.21 Zusammensetzung eines Standard-PCR-Reaktionsgemisches

Nr.	Komponente	Menge,[μl]	Menge rel.	Modifikationsmöglichkeiten
1	Matrize, 10 fg-10 ng	bis 10 μ l	---	Änderung der Konzentration: \downarrow, \uparrow
2	Primer „Hin“, 100 μ M	0,5 μ l	1 μ M	Änderung der Konzentration: \downarrow, \uparrow
3	Primer „Rück“, 100 μ M	0,5 μ l	1 μ M	Änderung der Konzentration: \downarrow, \uparrow
4	dNTPs, (je 25 mM)	0,5 μ l	je 250 μ M	
5	Puffer, incl. $MgCl_2$	5,0 μ l	0,1 VT	
6	$MgCl_2$, 25 mM	bis 2,5 μ l	250 μ M/ μ l	Änderung der Konzentration: \uparrow
7	Wasser	ad 50 μ l	---	
8	<i>Taq</i> -Polymerase	2 μ l	1 u	Änderung der Konzentration: \downarrow, \uparrow

Waren zur Verbesserung des Reaktionsergebnisses Modifikationen in der Zusammensetzung des Reaktionsgemisches nötig, wurden diese wie in der Spalte *Modifikationsmöglichkeiten* beschrieben jeweils reaktionsspezifisch abgestimmt.

Tabelle 2.22 Temperaturschema einer Standard-PCR-Reaktion

Schritt	Zweck	Temp.	Mod.	Zeit	Mod.	Schleife
1	Denaturierung	95 °C		5 min		
2	Zugabe der Polymerase	70 °C		q.s.		
3	Annealing	55 °C	↓↑	0,5 min	↓↑	35 Zyklen
4	Extension	72 °C		1 min	↓↑	
5	Denaturierung	95 °C		0,5 min	↓↑	
6	Annealing	55 °C	↓↑	0,5 min	↓↑	
7*	Extension	72 °C		15 min		
8	Kühlung	4 °C		q.s.		

Der überlange Extensionsschritt 7* (nicht bei Reaktionen mit Proof-Reading-Polymerasen) nutzt die Terminale-Nukleotid-Transferase-Aktivität des Enzyms aus *Thermus aquaticus*. Die Polymerase benötigt diese Zeit, um an das 3'-Ende aller generierten Produkte eine einzelne A-Überhangbase zu kondensieren. Die Überhangbase ermöglicht ein effizientes Klonieren der Produkte in entsprechend vorbereitete T-Überhang-Vektoren (vgl. *Kapitel 2.4.7.2, Seite 51*). Auch wenn zunächst keine Klonierung in einen T-Überhangvektor vorgesehen war, wurde dieser Extensionsschritt bei Reaktionen mit *Taq*-Polymerase standardmäßig durchgeführt, um die Möglichkeit der Klonierung zu einem späteren Zeitpunkt zu eröffnen.

War eine Verbesserung des Reaktionsergebnisses notwendig, konnte abhängig von der Reaktion eine Modifikation der einzelnen Reaktionsschritte in beschriebener Weise (siehe Spalte *Mod.*) erfolgen.

Zur Kontrolle des Reaktionsergebnisses wurden 10 µl des PCR-Reaktionsgemisches mit 5 µl Loading-Dye-6x gemischt und mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe *Kapitel 2.4.5.1, Seite 46*) getrennt. Die Nukleinsäurefragmente wurden im UV-Durchlicht visualisiert und die Ergebnisse mit einem Sofortbild dokumentiert (siehe *Kapitel 2.4.5.3, Seite 48*).

Sollten amplifizierte DNA-Moleküle durch Klonierung konserviert werden, wurde die entsprechende Bande aus dem Gel extrahiert (siehe *Kapitel 2.4.5.4, Seite 48*).

2.4.11 Die Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR)

Die Kopplung der PCR mit der Reversen Transkription erweitert das Spektrum der mit dieser Technik zu amplifizierenden Nukleinsäuren um die Ribonukleinsäuren.

In einem ersten Schritt, der Reversen Transkription, wird mit einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (synonym: Reverse Transkriptase oder RTase) der zur RNA komplementäre DNA-Strang gebildet (cDNA).

Dieser Strang kann nun sequenzspezifisch einer PCR-Reaktion unterzogen werden. Diese Technik zeichnet sich im Vergleich zu anderen Techniken der reversen Genetik durch eine erhöhte Sensitivität aus. Sie ermöglicht es, extrem niedrig konzentrierte Moleküle zu detektieren, die von anderen Techniken (Northern-Analyse) nicht erfaßt werden können, z. B. der Nachweis von viraler RNA im Blut.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die RT-PCR eingesetzt, um Genfragmente der an der Biosynthese des Ginkgotoxins in *Ginkgo biloba* beteiligten Gene zu amplifizieren. Die Technik diente ebenso dem Nachweis der Transkription dieser Gene zu verschiedenen Wachstumsperioden von *Ginkgo biloba*-Suspensions-Kulturen. Grundlage für diese Techniken war die Isolierung von Ribonucleinsäure aus dem Zielgewebe. Für die RT-PCR wurde poly(A⁺)RNA verwendet. Ebenso wie andere Techniken, die RNA als Zielmolekül der Reaktion besitzen (z. B. Northern-Hybridisierung), erfordert auch die RT-PCR besondere räumliche, apparative und hygienische Voraussetzungen. Diese sind zum Schutz der Nucleinsäure vor degradierenden Enzymen (RNAsen) unbedingt einzuhalten (siehe *Dieffenbach, 1995*).

Reverse Transkription

Für die Synthese von cDNA aus mRNA (Reverse Transkription) finden verschiedene Enzyme Verwendung, die sich durch unterschiedliche Eigenschaften auszeichnen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die RTase Superscript II der Firma Life Technologies eingesetzt. Dabei handelt es sich um ein in *E. coli* exprimiertes und zur Homogenität gereinigtes Enzym aus dem Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV-RTase). Das natürliche Enzym besitzt zusätzlich zur Reversen-Transkriptase-Aktivität eine RNase H-Aktivität. Diese ist unerwünscht, da sie zur Degradation der RNA vor der Synthese der cDNA führen kann. Bei der Superscript II-RTase wurde diese Nebenaktivität durch eine Punktmutation in der RNase H-Domäne unterbunden. Die Reverse Transkription wurde wie folgt durchgeführt (modifiziert nach den Angaben des Herstellers und *Dieffenbach, 1995*). Die benötigten Chemikalien, Lösungen und Verbrauchsmaterialien sind in *Kapitel 2.1 (Seite 15)*, die benötigte Laborausstattung in *Kapitel 2.2 (Seite 32)* aufgeführt:

- Lösung A: 4 Komponenten wurden gemischt und auf Eis gekühlt: 4 µl 5x-First-Strand-Buffer (nach den Angaben des Herstellers), 1 µl dNTP (250 µM), 2 µl DTT (0,1 M), 1 µl RNAsin (10 u, RNase-Inhibitor); Gesamtvolumen 8 µl.

- Lösung B: Die benötigte Menge RNA wurde in 11 μl Wasser gelöst, mit 1 μl Erststrang-Primer (50 μM) und gegebenenfalls dem SMART-Oligo (10 μM , 1 μl , siehe *Abbildung 2.2, Seite 66*) versetzt und 3 min bei 80 °C denaturiert. Sie wurde sofort 10 min auf Eis abgekühlt. Die Flüssigkeit wurde durch kurzes Zentrifugieren (5 sec) am Gefäßboden gesammelt.
- Lösung B wurde mit der Lösung A gemischt und 2 min bei 42 °C inkubiert.
- 1 μl Superscript II (200 units) wurden beigemischt. Zur Reversen Transkription wurde folgendes Temperaturprogramm durchlaufen: 1 Std. 37 °C-42 °C, 10 min 50 °C, 15 min 70 °C.
- Die erhaltene cDNA konnte direkt in nachfolgende PCR-Reaktionen eingesetzt werden.

Tabelle 2.23 Mögliche Reaktionsansätze zur Reversen Transkription

Komponenten	RT-PCR	3'-RACE-PCR	5'-SMART-RACE-PCR
Lösung A:			
5x-First-Strand-Buffer	4 μl	4 μl	4 μl
dNTP (250 μM)	1 μl	1 μl	1 μl
DTT (0,1M)	2 μl	2 μl	2 μl
RNAsin	1 μl	1 μl	1 μl
Lösung B:			
RNA/H ₂ O	10 μl	10 μl	9 μl
Erststrangprimer, 50 μM	1 μl	1 μl	1 μl
SMART-Oligo, μM	---	---	1 μl
Gesamt:	20 μl	20 μl	20 μl

Die Menge der eingesetzten RNA war abhängig von dem Verwendungszweck der Reaktion: War die Erststrangsynthese Teil der Kontrollreaktion der isolierten mRNA (vgl. *Kapitel 2.4.3, Seite 43*), wurden 200 ng pol(A⁺)RNA eingesetzt. Für die Synthese der cDNA im Rahmen der RACE-PCR-Versuche waren höhere Ausgangsmengen nötig, um die reduzierte Spezifität dieses Systems zu kompensieren (3'-RACE-PCR bis 1 μg , 5'-RACE-PCR bis 2 μg).

Auch die Wahl des Oligonukleotids für die Erststrangsynthese war abhängig von der Zielsetzung des nachfolgenden PCR-Reaktion. Für die Qualitätskontrolle der RNA wurde der „Hin“-Primer der nachfolgenden PCR-Reaktion als Oligonukleotid für die cDNA-Synthese eingesetzt. Für die Versuche im Rahmen der RACE-Experimente fanden jeweils modifizierte oligo-dT-Primer Verwendung (siehe *Tabelle 2.2, Seite 16*).

In allen Fällen wurde mit einer Konzentration von 1 μM begonnen. Nur wenn dadurch in den Nachfolgereaktionen ein nicht zu selektierendes Bandenmuster entstand, wurde die Erststrang-Primerkonzentration zur Erhöhung der Spezifität gesenkt (bis 10 nM).

Polymerase-Ketten-Reaktion

Die der Reversen Transkription nachgeschaltete PCR-Reaktion diente der selektiven Amplifikation einer cDNA oder eines cDNA-Fragmentes aus der zuvor erstellten Bibliothek. In allen Fällen wurde wie im *Kapitel 2.4.10, (Seite 57)* beschrieben vorgegangen. Die Primer wurden entsprechend der Intention des Versuches zusammengestellt.

Als Matrize diente die in der Reversen Transkription erzeugte cDNA. Konnte mit Hilfe der PCR das Zielmolekül aufgrund einer zu geringen Zahl an Ausgangsmolekülen nicht befriedigend amplifiziert werden, wurden entsprechend höhere Menge des Erststrangsynthese-Ansatzes eingesetzt (evtl. sogar die gesamte Reaktion). Anderenfalls konnte diese aliquotiert werden (1/5 VT, 1/4 VT, 1/2 VT) und war dadurch Grundlage für mehrere Nachfolge-PCR.

Eintopfreaktion

Alternativ zu den zuvor beschriebenen sequentiell ablaufenden Schritten konnte für einfache Anwendungen (Kontrolle der RNA-Qualität) das *Ready To Go™-Fertigsystem* der Firma Pharmacia-Biotech eingesetzt werden. In Form trockener Kügelchen bringt dieses System alle notwendigen Reagenzien mit. Zur Komplettierung müssen nur noch RNA, und die (bis zu drei) benötigten Primer hinzugefügt und bis zum Endvolumen mit Wasser aufgefüllt werden. Die Reaktion ist umgehend startbereit.

Für den beschriebenen Anwendungszweck wurden 100ng poly(A⁺)RNA je Reaktion eingesetzt und nach den Angaben des Herstellers verfahren (vgl. *Kapitel 7.3.6, Seite 154*).

2.4.12 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

Für die Klonierung kompletter eukaryontischer „Full-length-Gene“ galt das Konstruieren einer cDNA-Phagenbank und das sich anschließende Durchsuchen mit homologen oder heterologen Sonden lange Zeit als Königsweg. Diese Technik bedarf nicht nur umfangreicher technischer Fertigkeiten, sie ist ebenso zeitintensiv und teuer.

Für den Fall, daß durch die Anwendung anderer Techniken schon Sequenzinformationen über einen zentralen Bereich einer gesuchten mRNA vorliegen, suchte man nach einfacheren Alternativen. Anfang der 90er Jahre wurden von mehreren Arbeitsgruppen sich ähnelnde Techniken entwickelt. Diese ermöglichen es, in kurzer Zeit die Enden einer gewünschten cDNA mittels PCR zu amplifizieren: *Rapid amplification of cDNA ends* (RACE-PCR, *Frohmann et al., 1988*). Andere Gruppen veröffentlichten diese Verfahren unter den Bezeichnungen *anchor PCR* (*Loh et al., 1989*) oder *one-sided PCR* (*Ohara et al., 1989*).

Seit dieser Zeit wurden die Techniken verfeinert. Besonders das Problem der ungewünschten Polymerisation abgebrochener mRNA trat in das Visier. Durch die Präsenz solcher Abbruchfragmente im 5'-Bereich der Nukleinsäure treten fälschlicherweise zu kurze cDNA-Polymerisate auf. Dieses Problem wurde von verschiedenen Autoren unterschiedlich gelöst. Die sogenannte *New RACE* oder auch *RNA-ligase-mediated RACE* (RLM-RACE) genannte Variante bedient sich der Ligation eines RNA-Ankers an das 5'-Ende aller Full-length-mRNA. Da Abbruchfragmente aufgrund ihrer Phosphorylierungsstruktur nicht mit dem Anker versehen werden, ist bei der nachfolgenden Erststrangsynthese die selektive Einführung eines 5'-Ankers nur an komplett transkribierte Moleküle möglich. *Schäfer, B. C. (1995)* und *Dieffenbach, C. W., et al. (1995)* geben einen umfassenden Überblick über die bis dahin verwendeten Abwandlungen der RACE-PCR-Technik. Kommerzielle Fertigsysteme, denen die verschiedenen technischen Varianten der Methode zugrunde liegen, sind von zahlreichen Anbietern erhältlich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die RACE-PCR-Technik angewendet, um Sequenzinformationen über das 3'- und 5'-Ende des sor-like-gene von *Ginkgo biloba* zu erlangen. Ausgangspunkt war die Isolierung von poly(A⁺)RNA aus Zellkulturen von *Ginkgo biloba* zu diversen Wachstumszeitpunkten. Die mRNA wurde durch Reverse Transkription in cDNA überführt. Dazu wurde entsprechend der in *Kapitel 2.4.11*, (*Seite 59*) beschriebenen Methode verfahren. Daher werden im folgenden nur die von der klassischen RT-PCR abweichenden Parameter beschrieben.

2.4.12.1 3'-RACE-PCR

Reverse Transkription

Dieses Verfahren diente zur Polymerisation des 3'-Endes der gesuchten mRNA. Die *Abbildung 2.1* (*Seite 64*) zeigt schematisch den Ablauf der Reaktion: Ausgehend von der isolierten mRNA wurde mittels Reverser Transkription mit einem Erststrangsynthese-Primer (Q_T) ein Hybriddoppelstrang synthetisiert. Der verwendete Primer

besaß neben der zum poly(A⁺)-Bereich der mRNA komplementären oligo(dT)-Sequenz eine nicht komplementäre Überhangsequenz (Q_r-Q₀). Diese als „Anker“ bezeichnete Basenfolge diente als Standard-Primer-Bindestelle für die nachfolgende PCR.

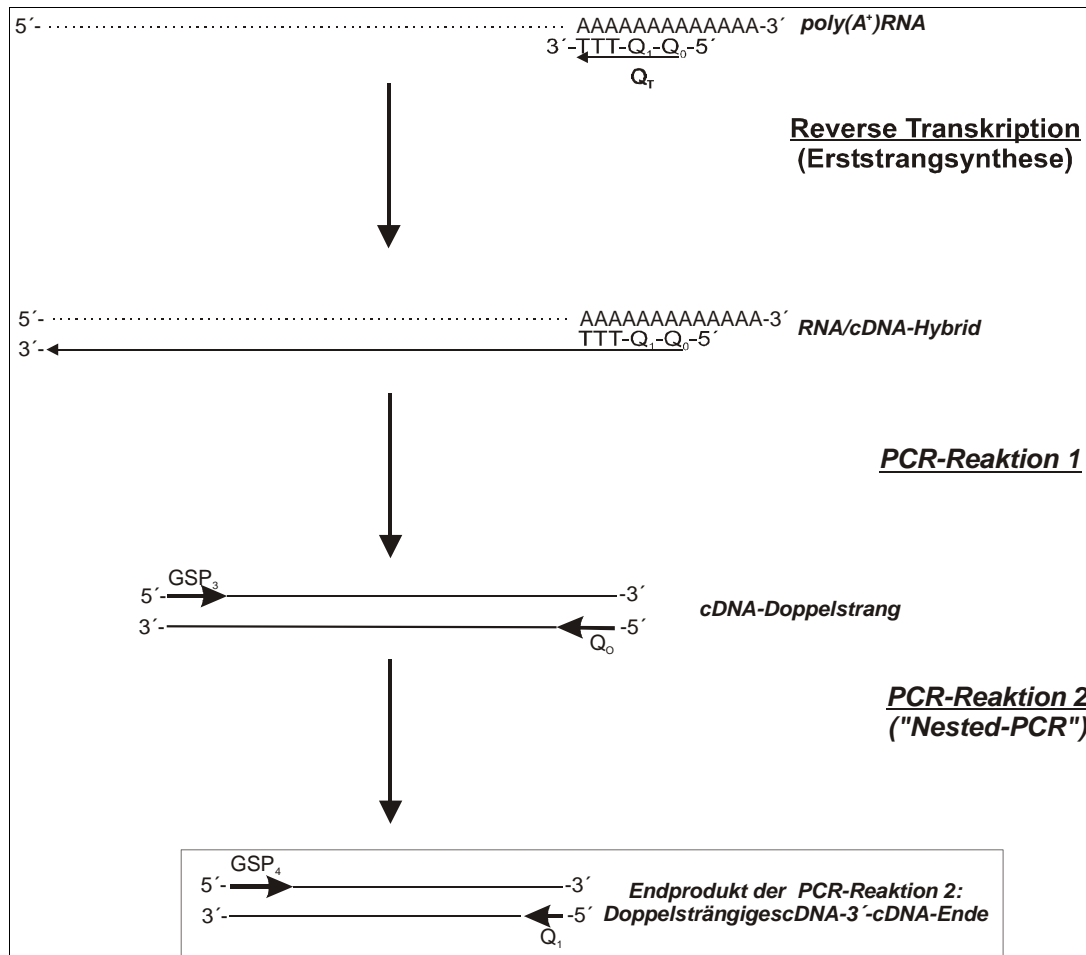


Abbildung 2.1 Ablaufschema der 3'-RACE-PCR

PCR-Reaktion 1

Ein Aliquot der vorausgegangenen Erststrangsynthese wurde als Matrize in die PCR-Reaktion eingesetzt. Die Menge war abhängig von der zu erwartenden Konzentration des Zieltranskriptes. Bei den meisten durchgeführten Anwendungen wurde $\frac{1}{4}$ oder $\frac{1}{2}$ des RT-Ansatzes verwendet. Eine vorherige Reinigung der DNA-Matrize und das Entfernen des Erststrangprimers waren nicht notwendig. Unter Verwendung der Primer GSP₃ und Q₀ wurde die PCR-Reaktion analog der unter Kapitel 2.4.10 (Seite 57) beschriebene Bedingungen durchgeführt.

PCR Reaktion 2 (Nested PCR)

An die PCR-Reaktion 1 wurde direkt eine zweite angeschlossen. Ihr Einsatz verfolgt zwei Absichten: Einerseits war die Selektion des Zielmoleküls aufgrund der Verwendung nur eines genspezifischen Primers unzureichend. Die Polymerisation würde zwangsläufig eine Schar von Nukleinsäuren amplifiziert haben.

Desweiteren reichte bei einer geringen Zahl von cDNA-Ausgangsmolekülen eine Vermehrung über 35 Zyklen nicht aus, um das Zielmolekül mittels Gelelektrophorese zu detektieren. Auch eine Verwendung einer Nachfolgereaktion (Klonierung) war aufgrund der geringen Menge nicht möglich. Aus diesen Gründen wurde ein Aliquot der PCR-Reaktion 1 (10-20 %) als Matrize in die Reaktion 2 eingesetzt. Zur Amplifikation dienten diesmal die Oligonucleotide GPS_4 und Q_1 als Startmoleküle. Die Reaktion wurde entsprechend den Angaben im *Kapitel 2.4.10 (Seite 57)* durchgeführt.

Beide PCR-Reaktionen wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese getrennt und die Banden im UV-Durchlicht visualisiert. Das DNA-Zielfragment wurde aus dem Gel eluiert (siehe *Kapitel 2.4.5.4, Seite 48*). Da beide Reaktionen mit *Taq*-Polymerase durchgeführt wurden, konnte die DNA durch Klonieren in einen T-Überhangvektor (siehe *Kapitel 2.4.7.2, Seite 51*) konserviert werden. Durch automatische Sequenzierung mit vektorspezifischen Oligonukleotiden wurde die Basenfolge der polymerisierten DNA ermittelt (siehe *Kapitel 2.4.13, Seite 68*).

2.4.12.2 5'-RACE- / SMART-RACE-PCR

Die Klonierung des 5'-Endes einer cDNA erweist sich oft als ein erhebliches Problem. Im Gegensatz zur Polymerisation des 3'-Endes gibt es einige sich stark voneinander unterscheidende Protokolle. Hier soll nur die im Rahmen dieser Arbeit verwendete SMART-RACE-Methodik besprochen werden.

Eine wesentliche Neuerung der SMART-Technologie ist die Einführung einer cDNA-Ankersequenz während der Reversen Transkription. Sowohl bei der klassischen RACE-PCR als auch bei der RLM-RACE waren enzymatische Zwischenschritte nötig, um eine Ankersequenz an das primäre cDNA-Molekül zu heften [vgl. Schäfer, B. C. (1995) und Dieffenbach, C. W. et al. (1995)]. Durch die Switching Mechanism At 5-end of RNA-Transkriptions-Technik entfallen diese aufwendigen und mit dem Verlust von Sensitivität behafteten Schritte. Dieser Vorteil macht das Verfahren für die Klonierung in niedriger Kopienzahl vorliegender Gene interessant.

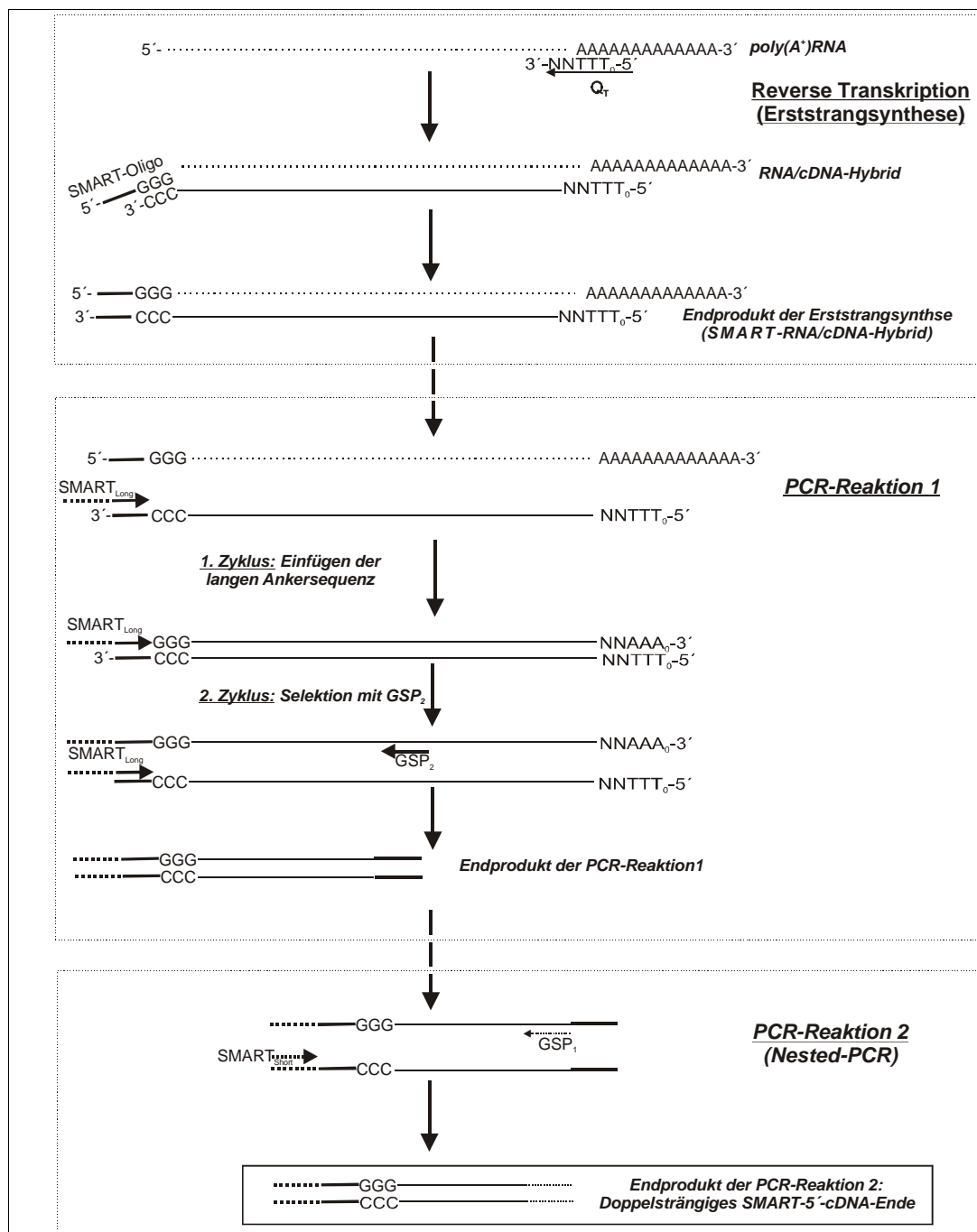


Abbildung 2.2 Ablaufschema der 5'-SMART-RACE-PCR

Abbildung 2.2 zeigt den Ablauf der SMART-RACE-Methode für die Erfassung des 5'-Endes einer poly(A)⁺-RNA-Moleküls. Ausgehend von poly(A)⁺-RNA erfolgt die Erststrangsynthese mit einem am 3'-Ende degenerierten oligo-(dT)-Primer (siehe Abbildung 2.2, 3'-NNTTT-5'). Diese Degeneration führt den Primer beim Anlagern an das Zielmolekül direkt an das Ende des poly-A-Bereichs. Aus dieser effizienten Primer-Anlagerung resultiert eine verbesserte Transkriptionseffizienz. Auch lange Transkripte

können so leichter erhalten werden. Durch den Einsatz des universellen oligo-(dT)-Primers wird die gesamte poly(A⁺)RNA transkribiert. Aus der gewonnenen cDNA können mehrere Gene kloniert werden.

Die Schar der gebildeten cDNA kann die Selektion des gewünschten Moleküls jedoch erschweren. Ist dies der Fall, kann die Erststrangsynthese alternativ mit einem Genspezifischen Primer (z.B. *GSP₂*) die Spezifität erhöhen. In diesem Fall sollte nur das Zielmolekül transkribiert werden.

Neben dem Erststrang-Primer wird das SMART-Oligonukleotid der Reaktion zugefügt. Es besteht aus zwei Standardprimersequenzen (vgl. *Tabelle 2.2, Seite 16*) und einer Tripel-G-Sequenz. Die zur Reversen Transkription verwendete M-MLV-Reverse Transkriptase (Superscript II) besitzt zusätzlich eine Terminale-Nukleotid-Transferase-Aktivität. Am Ende des zu transkribierenden Bereiches heftet sie eine C-Überhangsequenz an die cDNA. Diese ist je nach Molekül unterschiedlich lang und kann 1-10 bp umfassen. Noch während sich die Reverse Transkriptase am Hybridstrang befindet, kann sich das SMART-Oligo an den gebildeten C-Überhang anlagern. Die durch diese Anlagerung gebildete Verlängerung der mRNA am 5'-Ende wird sofort transkribiert. Durch diesen Schritt wird während der cDNA-Synthese der später benötigte Anker eingefügt. Das gebildete SMART-mRNA-cDNA-Hybrid kann umgehend in die PCR-Reaktion 1 eingesetzt werden.

Das Protokoll der Transkriptions-Reaktion entspricht dem einer normalen Reversen Transkription und ist unter *Kapitel 2.4.11, (Seite 59)* beschrieben.

PCR-Reaktion 1

Ein Aliquot der vorausgegangenen Erststrangsynthese wurde als Matrize in die PCR-Reaktion eingesetzt. Die Menge ist abhängig von der zu erwartenden Konzentration des Zieltranskriptes. Bei den meisten durchgeführten Anwendungen wurde $\frac{1}{4}$ oder $\frac{1}{2}$ des RT-Ansatzes verwendet. Eine vorherige Reinigung der DNA-Matrize und das Entfernen des Erststrangprimers waren nicht notwendig. Unter Verwendung der Primer *GSP₂* und *SMART_{long}* wird die PCR-Reaktion analog den unter *Kapitel 2.4.10 (Seite 57)* beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

PCR Reaktion 2 (Nested PCR)

An die *PCR-Reaktion 1* wurde direkt eine zweite Reaktion angeschlossen. Diese verfolgte zwei Absichten: Einerseits war die Selektion des Zielmoleküls aufgrund der Verwendung nur eines genspezifischen Primers unzureichend. Die Polymerisation würde zwangsläufig eine Schar von Nukleinsäuren amplifiziert haben.

Desweiteren reichte bei einer geringen Zahl von cDNA-Ausgangsmolekülen eine Vermehrung über 35 Zyklen nicht aus, um das Zielmolekül mittels Gelelektrophorese zu detektieren. Auch eine sich anschließende Klonierung war aufgrund der geringen Menge nicht möglich. Aus diesen Gründen wurde ein Aliquot der PCR-Reaktion 1 (10-20 %) als Matrize in die Reaktion 2 eingesetzt. Zur Amplifikation dienten diesmal die Oligonucleotide *GPS_i* und *SMART_{short}* als Startmoleküle. Die Reaktion wurde entsprechend der Angaben im *Kapitel 2.4.10 (Seite 57)* durchgeführt.

Die Produkte beider PCR-Reaktionen wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese getrennt und die Banden im UV-Durchlicht visualisiert. Das DNA-Zielfragment wurden aus dem Gel eluiert (siehe *Kapitel 2.4.5.4, Seite 48*). Da beide PCR-Reaktionen mit *Taq*-Polymerase durchgeführt wurden, konnte die DNA durch Klonieren in einen T-Überhangvektor (siehe *Kapitel 2.4.7.2, Seite 51*) konserviert werden.

Durch automatische Sequenzierung mit vektorspezifischen Oligonukleotiden wurde die Basenfolge der polymerisierten DNA ermittelt (siehe *Kapitel 2.4.13, Seite 68*).

2.4.13 Bestimmung der Basenfolge von DNA durch automatische Sequenzierung

Zur Bestimmung der Basenfolge der DNA wurde auf das *Big Dye Cycle Sequencing System* der Firma ABI Prism (Perkin Elmer) zurückgegriffen. Bei diesem handelt es sich um ein modifiziertes Kettenabbruchverfahren nach Sanger (1977).

In einer der PCR ähnlichen Reaktion mit nur einem Startermolekül (Primer) werden DNA-Einzelstränge erzeugt. Da das Reaktionsgemisch neben dNTP (2-Desoxy-Nukleotide) auch ddNTP (2,3-Dideoxy-Nukleotide) enthält, kommt es statistisch über die Schar der gebildeten Einzelstränge an jeder Basenposition des Stranges zum Polymerisationsabbruch (Termination).

Da jede der vier Terminatorkleotidbasen (ddNTP) mit einem eigenen Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, läßt sich der Kettenabbruch detektieren. Die Schar der entstandenen Abbruchfragmente wird über denaturierende DNA-Polyacrylatgelelektrophorese der Größe nach basengenau getrennt. Der Farbstoff der Terminatorbase wird in einer Laserlichtschranke zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt, das detektiert werden kann. Die Wellenlänge des emittierten Lichtes kann der Terminatorbase zugeordnet werden. Das Detektieren dieses Fluoreszenzlichtes über die Zeit nach der Trennung im Gel erlaubt die Festlegung der DNA-Basenfolge vom kleinsten zum größten Abbruchfragment.

Theoretisch ist mit dieser Methode die Basenfolge ab dem ersten auf den Primer folgenden Nukleotid möglich. In der Praxis verläuft die Terminationsreaktion etwa ab der 30. auf den Primer folgenden Base ausreichend gut, um valide Ergebnisse zu er-

halten. Zu weiterführenden Informationen zum DNA-Sequenzierungssystem verweise ich auf die sehr ausführlichen Benutzerinformationen der Firma ABI-Prism. Diese liegen der Arbeit auf CD-ROM bei (Verzeichnis: \Literatur\ABI-Dokumentation\).

Sequenzierreaktion

Die Feststellung der Basenfolge konnte mit dem oben beschriebenen System sowohl direkt aus linearen DNA-Fragmenten (z. B. gereinigte DNA aus einer PCR-Reaktion) als auch nach Klonierung aus ringförmigen DNA-Molekülen erfolgen. Bei optimaler DNA-Qualität konnten bei einer Plasmidgröße bis zu 9 kb Sequenzinformationen von 500-600 bp erhalten werden. Bei kürzeren Plasmiden (3-6 kb) sind Leselängen bis 800 bp möglich. Der Reaktionsansatz für die Kettenabbruchreaktion wurde, wie in *Tabelle 2.24* beschrieben, bereitet [die benötigten Chemikalien, Lösungen und Verbrauchsmaterialien sind in *Kapitel 2.1 (Seite 15)*, die benötigte Laborausstattung in *Kapitel 2.2 (Seite 32)* aufgeführt]:

Tabelle 2.24 *Zusammensetzung einer Sequenzierreaktion*

Komponente	Konzentration im Reaktionsgemisch	übliche Mengenverhältnisse
dsDNA (Matrize)	0,6-1,2 µg	3 µl
Primer (5 pmol/µl)	10-15 pmol	2-3 µl
H ₂ O	q.s.	ad 10 µl
Big Dye Terminator Mix	0,2 VT	2 µl

- Die DNA wurde mit dem Primer und der erforderlichen Menge Wasser in einem PCR-Reaktionsgefäß gemischt und im Thermoblock auf 4 °C vorgekühlt.
- Der *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Reaction Mix* wurde auf Eis aufgetaut
- Zu jeder Reaktion wurden 2 µl des Reaktionsmix gegeben.
- Zur Abbruchreaktion wurde 40mal das folgende Temperaturprogramm durchlaufen: 96 °C (10 sec), 60 °C (5 sec), 60 °C (1 min).

Der *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Reaction Mix* enthält alle für den Ablauf der Reaktion nötigen Chemikalien: Neben dNTP, ddNTP und Puffer ist auch die Polymerase in der benötigten Konzentration vorgemischt. Nach dem Ablauf der Reaktion wurde diese bis zur Weiterverarbeitung auf 4 °C gekühlt gehalten. Zur Detektion mußten die Abbruchfragmente durch Fällung von Terminatoren und Primern befreit werden:

- Das Reaktionsgemisch wurde mit Lichrosolv® (HPLC-Wasser) auf 100 µl aufgefüllt. Durch Zugabe von 10 µl Natriumacetat-Lösung (3 M, pH 4,6) und 250 µl Ethanol (100 %) wurde die Fällung herbeigeführt.
- Die Abbruchfragmente wurden durch Zentrifugieren (20.000x g, 15 min) sedimentiert.
- Der alkoholische Überstand wurde verworfen und die DNA (Pellet nicht sichtbar) mit 300 µl Ethanol (70 %) gründlich gewaschen.
- Es wurde erneut zentrifugiert (20.000x g, 5 min)
- Der Überstand wurde abdekantiert und die DNA im Vakuum getrocknet (SpeedVac).
- Die (nicht sichtbare) DNA wurde in Sequenzierpuffer (2 µl) aufgenommen.

Bis Zur Trennung und Detektion konnte die DNA mehrere Tage bei -20 °C gelagert werden.

Trennung und Detektion

Die Trennung der DNA-Abbruchfragmente erfolgte auf der Basis einer denaturierenden Polyacrylatgelelektrophorese in einem 377-Sequencer der Firma ABI Prism mit automatischer Fluoreszenzdetektion.

- Die Gelgießapparatur und Glasplatten wurden mit Alkonox®-Lösung (1 %) gründlich gewaschen, um Hintergrundfluoreszenz bei der Detektion vorzubeugen.
- 33 ml Gellösung wurden aus Harnstoff (12 g), Acrylamid-Lösung (30 %, 5 ml), TBE-Puffer (10fach, 4 ml) und 15,3 ml HPLC-Wasser gemischt und 10 min an einer Wasserstrahlpumpe entgast.
- Die gereinigten Glasplatten wurden in die Gelapparatur eingespannt.
- Der Gellösung wurden TEMED (10 µl) und APS-Lösung (10 %, 233 µl) zugefügt, um die Polymerisation zu starten; die Lösung wurde gut durchmischt und das Gel zwischen die Glasplatten ausgegossen.
- Durch Einstecken der Rückseite einer Haifischzahn-Taschenschablone wurde eine glatte Gelkante erzeugt. Das Gel polymerisierte 1 h.
- Nach Abschluß der Polymerisation wurde die Haifischzahn-Taschenschablone (36 Taschen) in die Gelfront eingefügt, um Probenaufnahmetaschen zu bilden.
- Das Gel wurde in die Sequenziermaschine senkrecht eingespannt und die Steuerungssoftware programmiert.
- In zwei Chargen wurden die Proben auf das Gel geladen: Charge 1 (Spur 1, 3, 5, etc.), 5 min Spannungsgabe, Charge 2 (Spur 2, 4, 6, etc.). Dies bewirkte ein besseres Trennergebnis durch einen gleichmäßigeren Spannungsfluß im Gel.

- Die Elektrophorese wurde bei gleichzeitiger permanenter Fluoreszenzdetektion über 5 h bei 2400 V und gleichbleibenden 48 °C Geltemperatur durchgeführt.
- Die gesammelten Daten wurden probenspezifisch in einer Datei abgelegt und standen zur Weiterverarbeitung zur Verfügung.

Auswertung der Sequenzergebnisse

Die Auswertung der vom Sequenzer erhaltenen Rohdaten (Fluoreszenzspektren) erfolgte mit dem Softwaremodul *Seqman* der DNA-Bearbeitungs-Suite *Lasergene 99 DNA Star*. Die Rohdaten wurden auf Plausibilität geprüft und konnten direkt zum Sequenzvergleich in eine Datenbank geladen werden. Homologievergleiche und Alignments wurden mit dem *Advanced-Blast-Algorithmus* des *NCBI* im Internet durchgeführt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

2.4.14 Hybridisierung mit RNA als Zielmolekül

Komplementäre Nukleinsäuren besitzen die Eigenschaft, sich unter Bildung von Wasserstoffbrücken zu einem Doppelstrang zu paaren (Hybridisierung). Diese Paarung ist sowohl zwischen zwei DNA- als auch zwischen zwei RNA-Molekülen, bzw. einem DNA- und einem RNA-Molekül möglich.

Im Rahmen dieser Arbeit kam die Hybridisierung unter Bildung homologer RNA-DNA-Hybride zur Kontrolle der Expression des *sor*-ähnlichen Gens aus *Ginkgo biloba* zum Einsatz. Dazu wurde poly(A⁺)RNA mit einer DNA-Sonde zur Hybridisierung gebracht. Das angewendete Verfahren wird im folgenden beschrieben.

Zur Detektion wurde mit dem Digoxigeninsystem der Firma Roche Diagnostics gearbeitet. Die Analysen wurden entsprechend der Herstelleranweisung durchgeführt. Weitere Hintergrundinformationen finden sich im Handbuch „DIG Application Manual for Filter Hybridisation“, Roche Diagnostics (siehe beiliegende CD: \lit\Roche\).

Da die Ribonukleinsäure gegen enzymatische Hydrolyse sehr anfällig ist, muß während der gesamten Prozedur darauf geachtet werden, daß keine RNAsen in das System eingeschleppt werden. Zum Schutz davor wurden die von *Sambrook et al. (1989)* erläuterten Maßnahmen ergriffen und den Anweisungen im „DIG Application Manual for Filter Hybridisation“ Rechnung getragen.

2.4.14.1 Herstellung von markierten Sonden

PCR-gestützte Markierung von Sonden

Nach dem von *Lion und Haas (1990)* beschriebenen Verfahren wurde für bestimmte Bereiche der DNA eine spezifische Sonde mittels PCR hergestellt. Die Markierung der DNA erfolgte durch den Einbau eines Digoxigenin-markierten Desoxyuridintriphosphates (dUTP) anstelle eines Desoxythymidintriphosphates (dTTP) in die DNA während des Polymerisationsvorganges durch die *Taq*-Polymerase. Die Reaktion wurde wie in *Kapitel 2.4.10, (Seite 57)* beschrieben durchgeführt. Allein die Desoxynukleotidtriphosphate (0,5 µl) wurden durch 5 µl des vorgefertigten Markierungsgemisches *Dig DNA Labeling Mixture*, Roche Diagnostics, ersetzt. Diese Mischung enthält neben den dNTP ebenfalls Dig-UTP (Dig-dUTP : dTTP = 1 : 3). Die Effizienz der Reaktion wurde mit Agarose-Gelelektrophorese (vgl. *Kapitel 2.4.5.1, Seite 46*) überprüft und das markierte PCR-Fragment von den übrigen Bestandteilen der Reaktion durch Gelelektion (vgl. *Kapitel 2.4.5.4, Seite 48*) getrennt.

Dieses Verfahren ermöglichte ein gleichmäßig markiertes DNA-Molekül in hoher Kopienzahl. Die Nachweisgrenze der auf diese Weise markierten Sonden wird vom Hersteller mit ca. 0,01-0,03 pg DNA (bzw. 0,5-0,1 pg RNA) angegeben, so daß dieses Verfahren für den Nachweis von Einzeltranskripten geeignet erscheint.

2.4.14.2 Transfer von RNA auf Nylon-Membranen, Northern Blot

Die von *Southern (1975)* entworfene Methode zum Transfer von Nukleinsäuren aus Agarosegelen auf Trägermaterialien durch Kapillarfluß und anschließender Immobilisierung läßt sich für Ribonucleinsäuren modifizieren.

Trennung der RNA

Die mRNA wurde mittels denaturierender Agarose-Gelelektrophorese getrennt (vgl. *Kapitel 2.4.5.2, Seite 47*). Für ein Northern-Experiment wurden je Spur ca. 5 µg poly(A⁺)RNA verwendet.

Transfer („Northern-Blot“)

Das Gel wurde in SSC-Lösung (10fach) gebadet (2 x 15 min), um das Formaldehyd zu entfernen. Eine Transfer-Vorrichtung wurde wie in *Abbildung 2.3* gezeigt aufgebaut.

Eine SSC-Lösung (20fach) wurde in eine Schale gegeben. Diese wurde mit einer Glasplatte abgedeckt, über die zwei Lagen in die SSC-Lösung tauchende Filterpapiere gelegt wurden. Darauf wurde das Gel plaziert, so daß die Oberseite zur Glasbrücke zeigte. Das Gel wurde zuvor am oberen rechten Rand markiert. Direkt auf das Gel wurden die Nylonmembran (in gleicher Weise markiert) und 2 Lagen Filterpapier plaziert. Das ganze System wurde mit SSC-Lösung (20fach) getränkt und von evtl. vorhandene Luftblasen durch Abrollen mit einer Pipette befreit. Die um das Gel befindliche Fläche wurde mit Parafilm (Innenseite steril) abgedeckt. Auf das Gel-Sandwich wurde 5cm hoch Filterpapier aufgetürmt und die Konstruktion mit einem Gewicht (1 kg) beschwert. In diesem Zustand wurde der Transfer in der Regel über Nacht bei 4 °C, mindestens aber 6 Stunden durchgeführt.

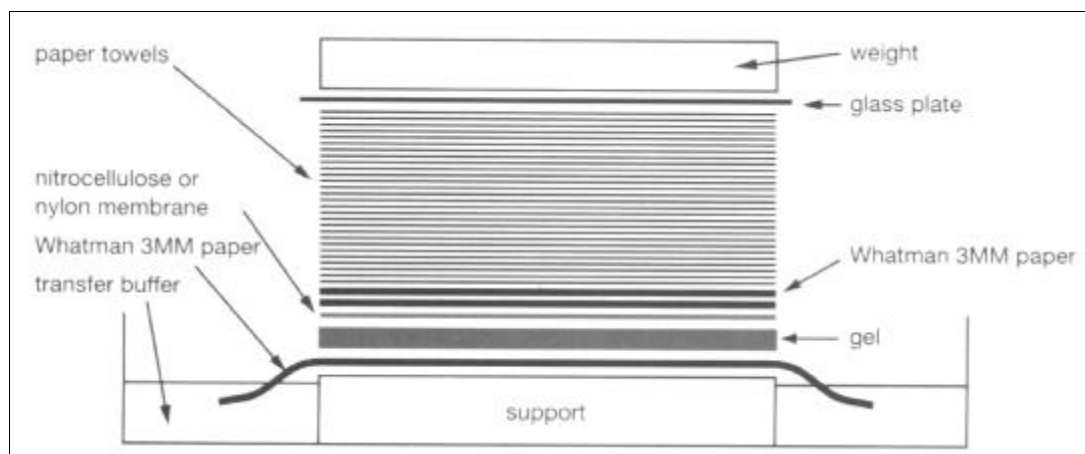


Abbildung 2.3 Aufwärtsgerichteter Kapillartransfer für Nucleinsäuren aus Agarose-Gelen (nach Sambrook et al., 1989)

War der Transfer beendet, wurde die Apparatur abgebaut und die Membran mit der Nucleinsäureseite nach oben auf einem Filter plaziert. In dieser Form wurde die Membran 5 min mit UV-Licht (366 nm) zur Fixierung bestrahlt. Die Membran wurde umgehend der Hybridisierungsprozedur zugeführt.

2.4.14.3 Prehybridisierung/Hybridisierung

Während der Prähybridisierungsphase (mind. 30 min) wurde die Membran in Hybridisierungslösung ohne Sonde bei 50 °C equilibriert. Dazu wurde sie in einem fri-

schen Hybridisierungsbeutel eingeschweißt und mit der Hybridisierungslösung (10 ml) bedeckt, so daß keine Luftblasen an ihrer Fläche hafteten.

Während dieser Zeit wurde die Digoxigenin-markierte DNA in kochendem Wasser denaturiert (10 min, 100 °C). Die Sonde wurde dem Wasserbad entnommen und direkt im Eisbad gekühlt (2 min). Das Gefäß wurde kurz zentrifugiert, um die gesamte Flüssigkeit am Boden zu sammeln.

Die Sonde wurde in frische, vorgewärmte Hybridisierungslösung gegeben. Diese wurde gegen die Vorhybridisierungslösung ausgetauscht. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht unter leichtem Schütteln bei 50 °C. Nach abgeschlossener Hybridisierung wurde die Sonde in ein RNase-freies Gefäß gefüllt und bei -20 °C gelagert. Zur erneuten Verwendung wurde die Sonde fortan bei 68 °C denaturiert.

Die Membran wurde im Waschpuffer-2fach gebadet (2 x 5 min, RT), um die Reste der Sonde abzuspülen. In dieser Zeit wurde ein Schüttelwasserbad vorbereitet. Die Membran wurde nun zweimal in Waschpuffer 0,5fach gespült (2 x 15min, 60 °C), um fehlgebundene Sonde abzutrennen. Nach diesen Waschschrinen konnte die Membran der Detektion zugeführt werden.

2.4.14.4 Detektion

Die Bindung der Sonde an den homologen RNA-Strang wurde mit Hilfe eines gekoppelten Immuno-Assays detektiert. Dieser basiert auf der Bindung des aus Schafen gewonnenen $F_{A/B}$ -Fragmentes des Digoxigenin-Antikörpers an das Dig-markierte dUTP der Sonde. Da an den Antikörper eine alkalische Phosphatase kovalent gebunden ist, ist es möglich, die Antikörperreaktion durch Umsetzung des Chemilumineszenzsubstrates CSPD zu visualisieren. Diese Reaktion setzt Licht frei, das einen Autoradiographiefilm schwärzt. Im Einzelnen wurde wie folgt verfahren:

- Die aus dem Waschschrin der Hybridisierung entnommene Membran wurde in Maleinsäurepuffer equilibriert (2 min).
- Die Membran wurde in Blockierungslösung überführt und dort mindestens 30 min gebadet.
- Die Blockierungslösung wurde verworfen, die Membran wurde mit Antikörperlösung überschichtet und 30 min geschüttelt.
- Nach erfolgter Antikörperreaktion wurde diese Lösung entfernt. Die Membran wurde zweimal mit Waschlösung_{AK} gespült (je 15 min, je 100 ml), um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen.
- Die Membran wurde in 50 ml Detektionspuffer equilibriert (2 min)

- Die mit Detektionspuffer gut durchfeuchtete Membran wurde in einen Plastikschlauch gebettet. Es wurde CSPD-Star-Lösung (2 Tropfen/10cm, RT) zugegeben. Die Membran wurde 15 min bei 37 °C inkubiert, um die Chemilumineszenzreaktion zu starten.
- Das Lichtsignal wurde durch Autoradiographie detektiert. Der Film wurde 4h belichtet. Falls sich das Signal als zu schwach darstellt, konnte die Membran erneute exponiert werden – das Enzym war weitere 12h aktiv.

Mit Hilfe des Chemilumineszenzsignals waren Aussagen über Eigenschaften des Transkriptes möglich:

- Anhand der Position des Signals auf dem Autoradiografie-Film und einem auf dem Gel zugleich analysierten RNA-Molekulargewichtsstandards ließen sich Rückschlüsse auf die ungefähre Größe des Transkriptes ziehen.
- Anhand der Stärke des Chemilumineszenzsignal konnte abgeschätzt werden, ob die mRNA des Zielgens in niedriger oder hoher Kopienzahl vorliegt.

2.5 Methoden der Proteinchemie

2.5.1 Proteinquantifizierung nach Bradford

Zur Quantifizierung von Proteinen wurde stets der Farbstoffassay nach Bradford (1976) herangezogen. Die vergleichsweise einfache und sensitive Methode bedient sich der Bildung von Protein-Farbstoffkomplexen zwischen dem sauren Farbstoff Coomassie-Brillantblau G 250 und einigen Aminosäuren des Proteins. Diese Komplexbildung führt zur Verschiebung des Absorptionsspektrums von 465 nach 595 nm. Da an der Reaktion hauptsächlich die Aminosäure Arginin, in geringerem Umfang Lysin, Histidin, Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin beteiligt sind, ist bei gleichen Mengen verschiedener Proteine eine unterschiedliche Absorption zu erwarten. Der Test kann nicht als objektiv betrachtet werden und hat nur vergleichenden Charakter. Zur Bestimmung wurde wie folgt verfahren:

- 100 µl der Proteinlösung wurden mit 900 µl Bradford-Reagenz (siehe *Tab 2.1, Seite 15*) gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Anschließend wurde die Absorption bei der Wellenlänge von 595 nm vermessen.
- Die Konzentration wurde anhand einer Kalibriergerade (1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20 µg/ml) ermittelt, die mit bekannten Konzentrationen einer in gleicher Weise behandelten BSA-Lösung erstellt wurde.

2.5.2 Denaturierende Proteinacrylamid-Gelelektrophorese – SDS-PAGE

Die denaturierende Proteingelelektrophorese wurde im Rahmen dieser Arbeit verwendet, um Proteingemische und überexprimierte Fusionsproteine zu trennen und ihre Größe anhand von Molekulargewichtsstandards zu charakterisieren. Es wurde das von *Laemmli (1970)* beschriebene diskontinuierliche Tris-HCl / Tris-Glycin-Puffersystem eingesetzt. Vor dem Beladen des Gels wurden die Quartär-, Tertiär- und Sekundärstruktur der zu untersuchenden Proteine mit einem SDS- und Thiolhaltigen Puffer zerstört. Zusammen mit den denaturierenden Bedingungen der Elektrophorese ermöglichte dies die größenabhängige Trennung der Moleküle unabhängig von ihrer Ladung und ihrer Konformation.

Die Trennung wurde in einem 3 %igen Sammelgel und einem 10 %igen Trenngel vorgenommen. Es wurde das *Maxigel-Twin-Gelelektrophorese-System* der Firma Biometra, Göttingen verwendet. Strom und Spannung wurden über einen Spannungsgeber der Firma Consort, Turnhout, Belgien, gesteuert.

Probenvorbereitung

- Die Proteinproben wurden mit SDS-Page-Ladepuffer-5-fach (0,4 VT) gemischt und 10 min bei 100 °C denaturiert.
- Die Proben wurden auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (5 min, 20.000x g, 4 °C).

Zur Molekulargewichtsbestimmung diente der *Low Molekular Weight Marker* der Firma Amersham Biotech, Freiburg, der parallel aufgetragen wurde. Er enthält 6 Proteine definierten Molekulargewichts: Phosphorylase B (97,4 kDa), BSA (66,2 kDa), Ovalbumin (42,7kDa), Kohlensäureanhydratase (31 kDa), Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor (21,5 kDa), Lysozym (14,4 kDa). Das als Lyophilisat angelieferte Reagenz wurde nach den Angaben des Herstellers in 100 µl SDS-Page-Ladepuffer-5-fach gelöst. 5 µl wurden je Spur zur Trennung eingesetzt.

Elektrophorese

- Die Trenngellösung wurde wie in *Tabelle 2.11 (Seite 26)* beschrieben bereitete und in die vorbereitete Gelgießapparatur gegeben.
- Die Lösung wurde zum Glätten der Gelkante mit 2 ml wassergesättigtem Butanol überschichtet und zur Polymerisation bei Raumtemperatur 1 h gelagert.
- Die Butanolschicht wurde mit Wasser abgespült.
- Die erstarrte Trenngellösung wurde mit Sammelgellösung (siehe *Tabelle 2.11, Seite 26*) überschichtet.
- Zur Ausformung von Probenaufnahmetaschen wurde eine Taschenschablone (Kamm) in die Sammelgellösung eingeführt und die Lösung bei Raumtemperatur 30min zur Polymerisation gelagert.
- Der Boden der Probenaufnahmetaschen wurde auf den Glasplatten markiert und der Kamm entfernt.
- Das Gelplattensystem wurde in die Gelelektrophoreseapparatur eingebaut, mit Gelelektrophoresepuffer überschichtet und die Probenaschen gespült.
- Die Proben und die Molekulargewichtsreferenz wurden in die Taschen gefüllt und die Trennung durch Anlegen von Ladung gestartet.
- Diese erfolgte im Bereich des Sammelgels mit 25 mA, im Bereich des Trenngels mit 55 mA.
- Die Trennung wurde gestoppt, sobald der im SDS-Page-Ladepuffer-5fach enthaltene Farbstoff Bromphenolblau den Boden des Trenngels erreicht hatte.
- Das Gel wurde der Apparatur entnommen, das Trenngel vom Sammelgel getrennt und der Detektion zugeführt.

Detektion

Die Detektion der getrennten Proteine erfolgte durch Färbung mit Coomassie-Brillant G 250. Das Prinzip der Technik entspricht dem der Proteinbestimmung nach Bradford (vgl. *Kapitel 2.5.1, Seite 76*). Durch Behandlung des Gel mit dem Farbstoff bilden sich blaue Protein-Coomassie-Komplexe. Diese sind stabil und bleiben beim Entfärben des Gels bestehen. Dadurch heben sich blaue Proteinbanden von klarer Gelmatrix ab.

- Das Trenngel wurde in einer Coomassie-Färbelösung mindestens 2 h unter leichtem Schütteln eingefärbt.
- Die Färbelösung wurde entfernt und das Gel durch Baden in Entfärbelösung entfärbt (einmal 30 min, einmal 12 h)
- Das Trenngel wurde auf einem Filterpapier plaziert und durch Trocknen im Vakuum bei Hitze (Geltrockner Fa. Biometra) konserviert (> 1,5 h, 65 °C).

Die Größe der Zielproteine konnte anhand eines Vergleichs mit dem parallel analysierten Molekulargewichtsstandard abgeschätzt werden.

2.5.3 Gewinnung eines rekombinanten Fusionsproteins mit dem pMal-System (New England Biolabs)

2.5.3.1 Der Proteingewinnung vorgeschaltete Schritte

Transformation des Zielplasmids

Um einen für die Produktion des Fusionsproteins benötigten rekombinanten Bakterienstamm zu gewinnen, wurde Bakterien des Stamms *E. coli XL1 Blue MRF⁺ Kan* mit dem für das Protein kodierenden pMal-c2-Plasmid (vgl. *Tabelle 2.6, Seite 19*) wie in *Kapitel 2.4.8, (Seite 53)* beschrieben transformiert.

Eine erhaltene Einzelkolonie wurde zum Beimpfen von 3 ml LB_{PenG}-Medium verwendet und über Nacht inkubiert (37 °C, 180 rpm). Zur Kontrolle der korrekten Transformation wurde aus 2 ml der Kultur das Plasmid reisoliert und einer Kontrollrestriktion unterzogen. Entsprechend diesen Erwartungen, wurde mit dem verbleibendem Milliliter eine Expressionskultur angeimpft.

Induktion der Proteinproduktion

Die heterologe Expression mit dem pMal-c2-System der Firma NEB produziert ein Fusionsprotein, das N-terminal das Maltosebindende Protein (*MalE*) aus *E. coli* als Fusionsanteil trägt. Die Expression steht unter der Kontrolle des starken *tac*-Promotor und ermöglicht die Bildung großer Proteinmengen.

Da das Zielprotein für die Zelle toxisch zu sein schien, wurde die Proteinbiosynthese abweichend von den Angaben des Herstellers unter sanften Bedingungen durchgeführt (30 °C, 0,3 mM IPTG). Es wurde ansonsten nach den Angaben des Herstellers (Handbuch auf der CD unter \lit\NEB\pMal_Protein_Fusion_Sys_manual.pdf) wie folgt verfahren [die benötigten Chemikalien, Lösungen und Verbrauchsmaterialien sind in *Kapitel 2.1 (Seite 15)*, die benötigte Laborausstattung in *Kapitel 2.2 (Seite 32)* aufgeführt]:

- Die benötigte Menge Rich_{PenG}-Medium wurde mit einer Vorkultur im Verhältnis 1/100 angeimpft und bei 37 °C, 180 rpm, bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inokuliert.
- Zu diesem Zeitpunkt wurde eine nicht indizierte Kontrollprobe genommen (1 ml), die zur späteren Expressionskontrolle wie die induzierte Kultur behandelt wurde.
- Zur Induktion der Fusionsproteinsynthese wurde dem Kulturmedium IPTG (0,3 mM Endkonzentration) zugesetzt und die Kultur wurde fortan bei 30 °C, 180 rpm inkubiert.
- Nach 4 h wurde die Inkubation abgebrochen. Der Kultur wurde eine weitere Kontrollprobe (1 ml) entnommen. Die vor und nach der Induktion gezogenen Proben wurden der Induktionskontrolle zugeführt (siehe unten).
- Aus der übrigen Kultur wurden die Zellen zur Proteingewinnung geerntet. Dazu wurden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert (2.500x g, 4 °C) und das Kulturmedium wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 30ml Column Buffer resuspendiert und üN bei -20 °C eingefroren. Die Zellen konnten wie in *Kapitel 2.5.3.2 (Seite 80)* beschrieben zur Proteinisolierung aufgeschlossen werden.

Da die Proteinexpression in einem *E. coli*-Stamm vorgenommen wurde, der nicht *MalE*-defizient ist, wurde die genomische Expression des Maltose-bindenden Proteins unter der Kontrolle eines *lac*-Promotors durch den Zusatz von Glucose zum Kulturmedium (Rich_{PenG}-Medium) zurückgedrängt.

Zur Kontrolle der korrekten Synthese des Fusionsproteins wurde stets eine *E. coli*-Kultur, die einen nicht rekombinanten pMal-c2-Vektor trug, parallel bearbeitet. Diese produzierte nach Induktion nur das *MalE-lacI*-Fusionsprotein (52 kDa).

Induktionskontrolle

Die Synthese des Fusionsproteins wurde durch SDS-Page kontrolliert (siehe *Kapitel 2.5.2, Seite 76*). Jeweils eine induzierte und nicht induzierte Probe eines Gen-tragenden Klonen und der mit dem nicht rekombinanten Vektor transformierten Zellen wurden gleichzeitig analysiert.

War nur bei der induzierten Probe der Gen-tragenden Klone eine Proteinbande mit dem zu erwartenden Molekulargewicht zu sehen, wurde von einer korrekten Genexpression ausgegangen und das Zellpellet zur Proteingewinnung weiterverarbeitet.

2.5.3.2 Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie an einer Amylose-Matrix

Das nach der Induktion der Fusionsproteinsynthese erhaltene Zellsediment (siehe *Kapitel 2.5.3.1, Seite 78*) wurde zu Isolierung des Zielproteins aufgearbeitet. Dazu wurden die Zellen mit Ultraschall aufgebrochen und der Proteinrohextrakt über eine Amylose-Affinitäts-Matrix gegeben. Nach dem Auswaschen der nicht bindenden Proteine sollte nur noch das Maltose-bindende Fusionsprotein an der Säule verankert bleiben. Dieses wurde durch einen Maltose-haltigen Elutionspuffer von der Affinitäts-säule gewaschen und stand zur Verfügung.

Beginnend mit der Zerstörung der Zellkompartimente wurden alle folgenden Arbeitsschritte bei 4 °C oder unter ständiger Eiskühlung durchgeführt. Dazu wurde wie folgt verfahren [die benötigten Chemikalien, Lösungen und Verbrauchsmaterialien sind in *Kapitel 2.1 (Seite 15)*, die benötigte Laborausstattung in *Kapitel 2.2 (Seite 32)* aufgeführt]:

- Die gefrorene Zellsuspension aus den Induktionsversuchen wurde im Eisbad aufgetaut.
- Mit einem Ultraschall-Desintegrator (Intensität 80-90 %) wurde die Suspension 3mal je 30 sec über eine großen Spitze beschallt. Zwischen den Schallperioden wurde jeweils 5 min Pause eingelegt, um eine Erwärmung der Lösung zu verhindern.
- Die Suspension wurde zentrifugiert (9.000x g, 30 min) um Zellfragmente zu sedimentieren. Lösliche Proteine blieben im Überstand.
- Der Überstand wurde über die zuvor equilibrierte Amylose-Affinitätssäule gegeben (Fließgeschwindigkeit: 1 ml/min).
- Der erste Durchfluß des Rohextraktes wurde gesammelt und ein zweites Mal über die Säule gegeben.

- Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch Spülen der Säule mit Column Buffer abgewaschen (mindestens 12 Säulenvolumen). Der Verlauf des Waschvorganges wurde über die UV-Absorption bei 280 nm kontrolliert (Durchflußphotometer).
- Das Fusionsprotein wurde mit Elutionspuffer von der Affinitätsmatrix eluiert. Es wurden Fraktionen zu je 3 ml gesammelt. Üblicherweise eluiert das Protein ab der 5. Fraktion von der Säule.

Die Konzentration des Fusionsproteins in jeder Fraktion wurde nach Bradford gegen BSA bestimmt (siehe *Kapitel 2.5.1, Seite 76*). Zur Kontrolle der korrekten Translation wurde das gereinigte Protein einer Faktor Xa-Hydrolyse unterzogen (siehe unten). Der Grad der Reinigung sowie der Hydrolyse wurden durch SDS-Page verfolgt (siehe *Kapitel 2.5.2, Seite 76*). Das so erhaltene Protein konnte für Inkubationen genutzt werden.

Faktor Xa-Hydrolyse des Fusionsproteins mit der Protease Faktor Xa

Da der pMal-c2-Vektor im Bereich vor des Polylinkers für die Erkennungssequenz der Protease Faktor Xa kodiert (siehe *Kapitel 7.2.2, Seite 152*), kann mit ihrer Hilfe der Fusionsanteil vom Zielprotein getrennt werden. Im allgemeinen weisen Fusionsproteine eine höhere Stabilität auf als das reine Zielprotein, doch kann eine Hydrolysemöglichkeit sinnvoll sein, wenn der Fusionsanteil die Enzymaktivität beeinträchtigt. Desweiteren bietet er die Möglichkeit, die korrekte Translation überprüfen zu können.

Ist die Hydrolyse des Fusionsproteins in Fusionsanteil und Zielprotein der richtigen Größe möglich, so kann davon ausgegangen werden, daß die Fusionstranskript korrekt tranlatiert wurde und kein Leserasterfehler aufgetreten ist. Zur Hydrolyse wurde nach den Angaben des Herstellers wie folgt verfahren (Handbuch auf der CD unter \Lit\Novagen\Factor_Xa.pdf):

Das Fusionsprotein wurde mit 10x-Faktor-Xa-Puffer (5 µl), Faktor Xa (0,2 u) und Wasser (ad 50 µl) gemischt und bei 21 °C inkubiert. Nach 2 h, 4 h, 8 h und 16 h wurden Proben gezogen, um die Hydrolyse zeitlich charakterisieren zu können. Das Ausmaß der Hydrolyse wurde mit SDS-PAGE verfolgt (siehe *Kapitel 2.5.2, Seite 76*). Wurde das Fusionsprotein in einen 42 kDa großen Fusionsanteil und ein Zielfragment der richtigen Größe gespalten, konnte auf korrekte Translation geschlossen werden. Das Protein wurde bis zum Einsetzen in die Inkubationsreaktionen bei -80 °C gelagert.

2.5.4 Gewinnung eines rekombinanten Proteins mit dem pQE₃₀Y-Hefe-System (Qiagen)

2.5.4.1 Der Proteingewinnung vorgeschaltete Schritte

Transformation mit dem Zielplasmid

Um einen für die Produktion des Fusionsproteins benötigten rekombinanten Hefestamm zu gewinnen, wurde *Saccharomyces cerevisiae* (vgl. Tabelle 2.15, Seite 34) mit dem für das Protein kodierenden pQE₃₀Y-Plasmid (vgl. Tabelle 2.6, Seite 19), wie in Kapitel 2.4.9 (Seite 55) beschrieben, transformiert. Parallel dazu wurden Hefe-Zellen mit einem pQE₃₀Y-Leerplasmid transformiert. Diese dienten in späteren Induktionsversuchen als Negativkontrolle.

Eine erhaltene Einzelkolonie wurde mittels PCR (siehe Kapitel 2.4.9, Seite 55) auf korrekte Transformation getestet. Entsprechend den Erwartungen, wurde mit der verbleibenden Kolonie eine Vorkultur in 5 ml SD-Glucose-Medium angeimpft und üN bei 28 °C inokuliert.

Induktion der Proteinproduktion

Die heterologe Expression mit dem pQE₃₀Y-System der Firma Qiagen, Hilden, produziert ein Fusionsprotein, das N-terminal eine Hexa-Histidin-Sequenz (*His*₆) trägt. Die Synthese des Fusionsproteins steht unter der Kontrolle eines *Gal*-Promotors und ist durch den Zusatz von Galactose zum Kulturmedium induzierbar. Zur Induktion der Proteinsynthese wurde wie folgt verfahren (Lösungen siehe Tabelle 2.9, Seite 22):

- 50 ml SD-Glucose-Medium wurden mit 1 ml Vorkultur (s. o.) angeimpft und für 48 h bei 30 °C und 250 rpm geschüttelt.
- Die Glucosekonzentration des Mediums wurde mit Hilfe von Glucoseteststreifen (Apotheke) bestimmt. Lag sie unter 200 µg/100 ml (Grenzwert des Teststreifens), wurden die Hefezellen sedimentiert (2500x g, 5 min, RT). Anderenfalls wurde weiter inokuliert bis diese Konzentration erreicht war.
- Das Zellsediment wurde in 200 ml YP-Galactose-Medium (Induktionsmedium) resuspendiert, in einen frischen 500 ml-Kolben transferiert und weitere 48 h inokuliert.
- Die Hefe-Zellen wurden durch Zentrifugation (2500x g, 15 min, RT) geerntet und der weiteren Verwendung zugeführt.

Induktionskontrolle

Zur Kontrolle der Synthese des Fusionsproteins wurde vor und 48 h nach der Induktion eine Probe (1 ml Zellsuspension) entnommen. Die Zellen wurden sedimentiert, das Sediment in 20 μ l SDS-PAGE-Puffer resuspendiert und 7 μ l davon mittels denaturierender SDS-PAGE (siehe *Kapitel 2.5.2, Seite 76*) analysiert. Als Kontrolle diente eine in gleicher Weise behandelte Kultur von Hefe-Zellen, die ein pQE₃₀-Y-Leerplasmid trugen. War im Unterschied zu den Leerplasmid-tragenden Zellen die Bildung eines Proteins gewünschter Größe nach Induktion erkennbar, wurde durch Western-Analyse mit einem Penta-His-Mouse-Antikörpern die Expression eines Histidin-Fusionsproteins überprüft.

2.5.5 Western-Transfer von Proteinen und Nachweis spezifischer Proteinstrukturen mit Antikörpern (ELISA)

Der Transfer von Proteinen aus einem Polyacrylatgel auf eine Membran und die anschließende Detektion spezifischer Proteinsequenzen durch Antikörper wurde im Rahmen dieser Arbeit verwendet, um rekombinante Fusionsproteine in einem Proteingemisch zu identifizieren. Dazu wurden die Proteine in einem ersten Schritt unter Anwendung von Spannung auf einer Membran fixiert (Western-Transfer). Anschließend wurde diese mit einem auf eine spezifische Proteindomäne gerichteten Antikörper behandelt. Die Bindung des ersten Antikörpers wurde durch den Einsatz eines auf diesem gerichteten Zweitantikörper detektiert, an den eine Meerrettich-Peroxidase kovalent gekoppelt war. Die Umsetzung eines Substrates der Peroxidase in einer lichtemittierenden Reaktion konnte durch Autoradiographie detektiert werden (ELISA). Dazu wurde nach der Durchführung der Polyacrylatgelelektrophorese wie folgt verfahren (Lösungen siehe *Tabelle 2.7, Seite 20* und *Tabelle 2.11, Seite 26*):

- Das der Gelelektrophorese entnommene SDS-Polyacrylatgel wurde 15 min in Transferpuffer äquilibriert, um Detergenzien und Salze zu entfernen.
- Die Transfermembran (PVDF) wurde zur Vorbereitung auf den Transfer zunächst 10 sec in Methanol und anschließend 10 min in Transferpuffer äquilibriert.
- Zum Transfer der Proteine auf die Membran wurde der Aufbau auf der Platin-Anode des Transfergerätes wie folgt vorgenommen: Zwei Lagen zugeschnittenes, mit Transferpuffer getränktes Filterpapier, Transfermembran, Gel, zwei weitere Lagen mit Transferpuffer getränktem Filterpapier. Nach dem Stapeln jeder Schicht, wurden Luftblasen durch Rollen mit einer Pipette sorgfältig entfernt. Die Platin-Kathode bildete den Abschluß.
- Der Transfer der Proteine erfolgte bei konstanter Spannung (15 V, 1 h, RT).

- Nach dem Transfer der Proteine wurden sowohl die Membran als auch das polyacrylatgel zur Kontrolle der Prozedur 1 min mit Ponceau-Lösung gefärbt und anschließend mit Wasser entfärbt (es verblieb eine leichte Restfärbung).
- Die Membran wurde in Blockierungslösung geschüttelt: 1 h, RT (alternativ üN, 4 C).
- Anschließend wurde die Membran in Antikörperlösung I (40 ml, 1 h, RT) geschwenkt.
- Durch Waschen der Membran in Waschlösung I (einmal 15 min, zweimal je 5 min) wurde der überschüssige Antikörper I entfernt.
- Zur Einleitung des Detektionsverfahrens wurde die so gereinigte Membran mit der Antikörperlösung II umspült (40 ml, 1 h, RT).
- Der überschüssige Antikörper II wurde durch Spülen der Membran mit Waschlösung II (zweimal je 5 min) und Waschlösung I (zweimal je 5 min) entfernt.

Die Bindung des Antikörpers II an den Antikörper I wurde durch eine Chemilumineszenzreaktion kenntlich gemacht, die durch eine am Antikörper II kovalent gebundene Meerettichperoxidase (HRP) katalysiert wurde. Diese ist in der Lage, das Substrat Luminol unter Lichtemission zu oxidieren. Die Zugabe eines Verstärkers erhöht die Lichtemission ca. um das 1000fache.

- Die Membran wurde in einem Hydridisierungsschlauch plziert. In den Schlauch wurde 1 ml einer 1:1-Mischung der Lösungen I und II des Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus, Fa. NEN (Zaventam, Belgien), gegeben und der Schlauch luftblasenfrei verschlossen.
- Zum Starten der Reaktion wurde die Membran 1 min bei RT inkubiert.
- Die Detektion erfolgte durch Autoradiographie. Die Expositionszeiten variierten je nach Intensität der Signale zwischen 2 sec und 15 min.

3 ERGEBNISSE

3.1 Vergleich der *sor*-ähnlichen Gene und Proteine im System

Für den Nachweis eines *sor*-homologen Gens in *Ginkgo biloba* wurde eine PCR-gestützte Suche gewählt. Die für diese Suche benötigten Oligonukleotide konnten auf der Grundlage von Vergleichen *sor*-homologer Sequenzen auf DNA- und Proteinebene synthetisiert werden (siehe *Kapitel 3.1.2, Seite 87*). Ein Vergleich der Nukleotidsequenzen kann zwar Auskunft über die Verwandtschaft der Organismen geben. Er berücksichtigt jedoch nicht den unterschiedlichen Gebrauch der Codons für eine Aminosäure eines jeden Organismus (degenerierter Code, codon usage). Eine von der Degeneration des genetischen Codes bereinigte Variante stellt der Vergleich der Aminosäuresequenzen dar. Er ermöglicht es, konservierte Regionen eines Proteins zu lokalisieren. Diese Regionen besitzen entweder die gleiche Aminosäuresequenz oder unterscheiden sich durch Aminosäuren, die eine ähnliches Raumvolumen oder eine ähnliche räumliche Anordnung einnehmen. Oft ist es möglich, anhand dieser Aminosäuremotive Vermutungen über die Funktion des Proteins anzustellen.

3.1.1 Sequenzanalyse auf Aminosäureebene

Die *Sor/Snz*-Proteinfamilie (NCBI-Gruppe: pfam 01680) zählt zu den am höchsten konservierten bekannten Proteinfamilien. Zentrale Bereiche der Proteinsequenzen stimmen nahezu vollkommen überein. Das von *Ehrenshaft et al. (1999)* gefundene *sor*-Gen (später zu *pdx1* umbenannt) aus dem Pilz *Cercospora nicotianae* ist das längste Gen dieser Familie. Es kodiert für 344 Aminosäuren. Alle anderen Vertreter dieser Protein-Familie sind kürzer. Einige besitzen ca. 320 Aminosäuren, viele Proteine – darunter auch das im Rahmen dieser Arbeit aus *Ginkgo biloba* klonierte Protein – 309 Aminosäure und nur wenige unter 300 Aminosäuren. Alle Proteine tragen zentral das *Sor/Snz*-Motiv (siehe NCBI-CDD-Datenbank: pfam 1680) und variieren in den peripheren Bereichen.

Die *Abbildung 3.1 (Seite 86)* zeigt einen Vergleich die *Pdx1*-Aminosäuresequenz von einem prokaryontischen und fünf eukaryontischen Organismen. Im Vergleich der Proteine miteinander ergibt sich ein deutliches Bild: Zur längsten Sequenz von *Cercospora nicotianae* besitzen alle übrigen eine ähnlich große Homologie - das Protein des Bakteriums *Thermotoga maritima* die geringste, das der Pflanzen eine deutlich

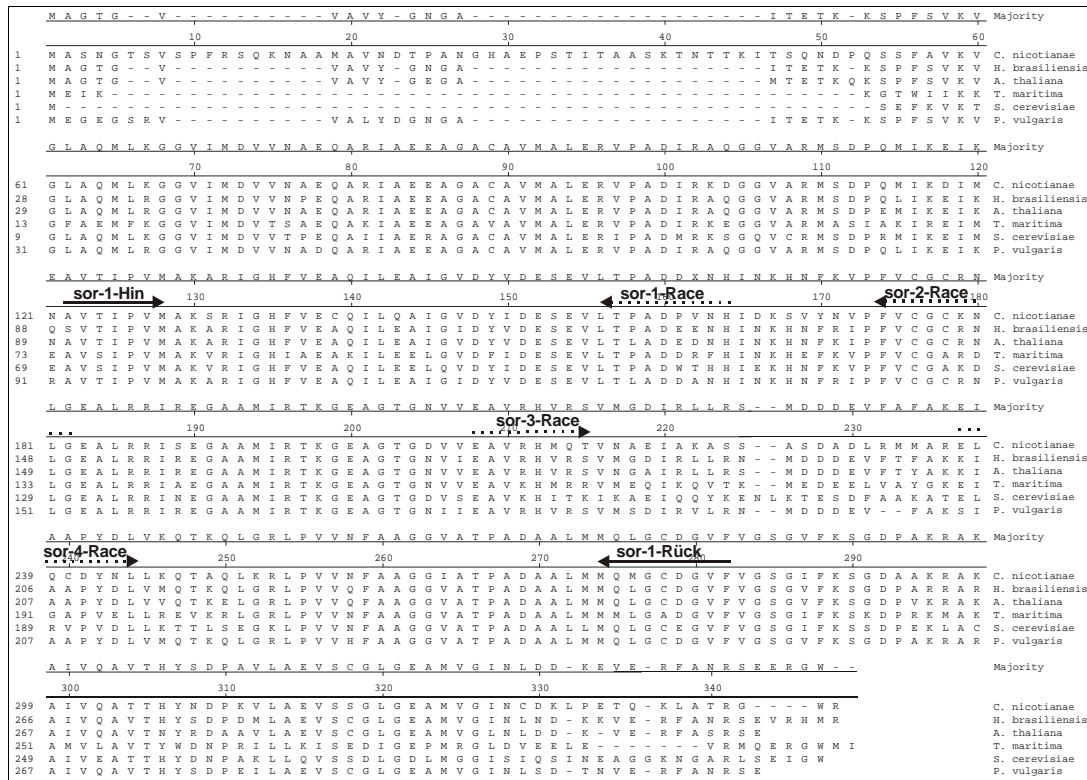


Abbildung 3.1 Vergleich sor-homologer Proteine aus Eukaryonten und einem Prokaryonten

Durchgehende Pfeile symbolisieren Aminosäuremotive, die zur Synthese von Oligonukleotiden für die PCR herangezogen wurden; gestrichelte Pfeile zeigen die Lage von Primern für die RACE-PCR an. Die Tabelle 3.1 (Seite 87) zeigt die diesem Sequenzvergleich zugrundeliegende Berechnung der Identität/Divergenz der Sequenzen.

höhere. Die Homologie innerhalb der Pflanzensequenzen liegt um 20% höher als im Vergleich Pflanze-Bakterium und Pflanze-Pilz. Diese Differenz läßt auf eine besondere Konservierung der Proteine im Pflanzenreich schließen. Sie läßt zudem einen analog gestalteten Biosyntheseweg für die B₆-Vitamer im Pflanzenreich erwarten.

Tabelle 3.1 Paarweise Berechnung der Identität/Divergenz der in Abbildung 3.1 verglichenen sor-homologen Proteinsequenzen

Den Berechnungen der Identität und der Divergenz zweier Sequenzen liegen unterschiedliche Algorithmen zugrunde (Lasergene 99, DNA-Star, Megalign). Die Divergenz ist berechnet unter Einbeziehung eines rekonstruierten phylogenetischen Baumes. Durch die Identität werden zwei Sequenzen direkt ohne die Einbeziehung phylogenetischer Abhängigkeiten miteinander verglichen. Aufgrund der Verwendung unterschiedlicher Berechnungsmethoden ist die Summe aus Identität und Divergenz für ein Vergleichspaar nicht 100% (pflanzliche Organismen sind **fett** markiert).

		Identität[%]						
D i v e r g e n z	---	1	2	3	4	5	6	
	1	---	65,9	68,6	58,3	63,1	65,5	1 - <i>C. nicotianae</i>
	2	39,9	---	88,3	61,0	60,4	89,7	2 - <i>H. brasiliensis</i>
	3	37,0	10,1	---	62,7	60,7	83,2	3 - <i>A. thaliana</i>
	4	55,9	53,7	48,3	---	60,3	61,0	4 - <i>T. maritima</i>
	5	43,9	52,8	50,0	49,4	---	60,1	5 - <i>S. cerevisiae</i>
	6	40,6	7,2	12,8	49,4	51,6	---	6 - <i>P. vulgaris</i>

3.1.2 Synthese der degenerierten Primer

Für die PCR-gestützte Suche eines *sor*-homologen Gens von *Ginkgo biloba* wurden Oligonukleotide als Startmoleküle für die Polymerisationsreaktion benötigt.

Der Aminosäurevergleich der *Sor*-homologen Proteine wurde herangezogen, um besonders geeignete konservierte Regionen festzulegen, für die Oligonukleotide hergestellt werden sollten. Die gewählte Aminosäuresequenz wurde mit Hilfe des für *Ginkgo biloba* aus bereits sequenzierten offenen Leserahmen (ORF, engl.: open reading frame, dt.: offener Leserahmen) ermittelten Codon-Gebrauchs (vgl. *Kapitel 7.1.2, Seite 144*) in eine wahrscheinliche Basenfolge umgerechnet. Da aufgrund des degenerierten Codes an der zweiten und vor allem dritten Position des Codons mehrere Basen möglich sind, wurden nur solche Triplets ausgewählt, die der Organismus bevorzugt zur Kodierung einsetzt. Unterrepräsentierte Codons wurden nicht berücksichtigt, um die Degeneration der Oligonukleotide zu minimieren und einem Verdünnungseffekt bei deren Synthese entgegenzuwirken. Desweiteren wurden bei der Auswahl der konservierten Regionen und beim Primerdesign folgende Regeln berücksichtigt:

- Die erste Base am 3'-Ende durfte nicht variabel sein.
- Wenn möglich wurde die Lage des Primers so gewählt, daß für Methionin (Codon *ATG*) oder Tryptophan (Codon *TGG*) kodierende Triplets das 3'-Ende des Oligonukleotids bildeten.
- Zur Erhöhung des Primer-Matrize-Bindungs-Effizienz wurden am 5'-Ende Fehlpaarungen zugelassen (nicht aber am 3'-Ende).
- Immer, wenn an einer Position eine 4fache Variabilität auftrat, wurde stattdessen Inosin als eine mit jeder anderen Base paarende Modifikation in den Primer integriert.
- Es wurden drei oder mehr G oder C am 3'-Ende vermieden, um eine Selbstpaarung des Primers zu verhindern.
- Es wurde ein T am 3'-Ende vermieden.
- Es wurden Komplementärsequenzen innerhalb und zwischen zwei Primern vermieden, um die Bildung von Primer-internen Schleifen und Primerdimeren einzuschränken.

Auf dieser Grundlage wurden die Primer *Sor-1-Hin* und *Sor-1-Rück* (Nukleotidsequenz siehe Tabelle 2.2, Seite 16) konstruiert und in die PCR eingesetzt.

3.2 Klonierung eines *sor*-homologen Gens aus *Ginkgo biloba*

Die Klonierung des *sor*-homologen Gens von *Ginkgo biloba* sollte in mehreren Schritten erfolgen. Die Vorgehensweise hierzu ist in *Abbildung 3.2* (Seite 89) dargestellt. Zunächst mußte der Nachweis einer solchen Sequenz im Genom des Organismus erbracht werden. In einem zweiten Schritt sollte geprüft werden, ob und zu welchem Zeitpunkt des Wachstums der Zellsuspensionskulturen dieses Gen transkribiert wurde. Nach dem erbrachten Transkriptionsnachweis galt es, die cDNA des Transkriptes zu klonieren. Ihr offener Leserahmen sollte selektiv überexprimiert und das Protein vorgereinigt werden, um seinen Einfluß auf die Biosynthese des Ginkgotoxins in einem zellfreien System prüfen zu können (*Fiehe, 1999*).

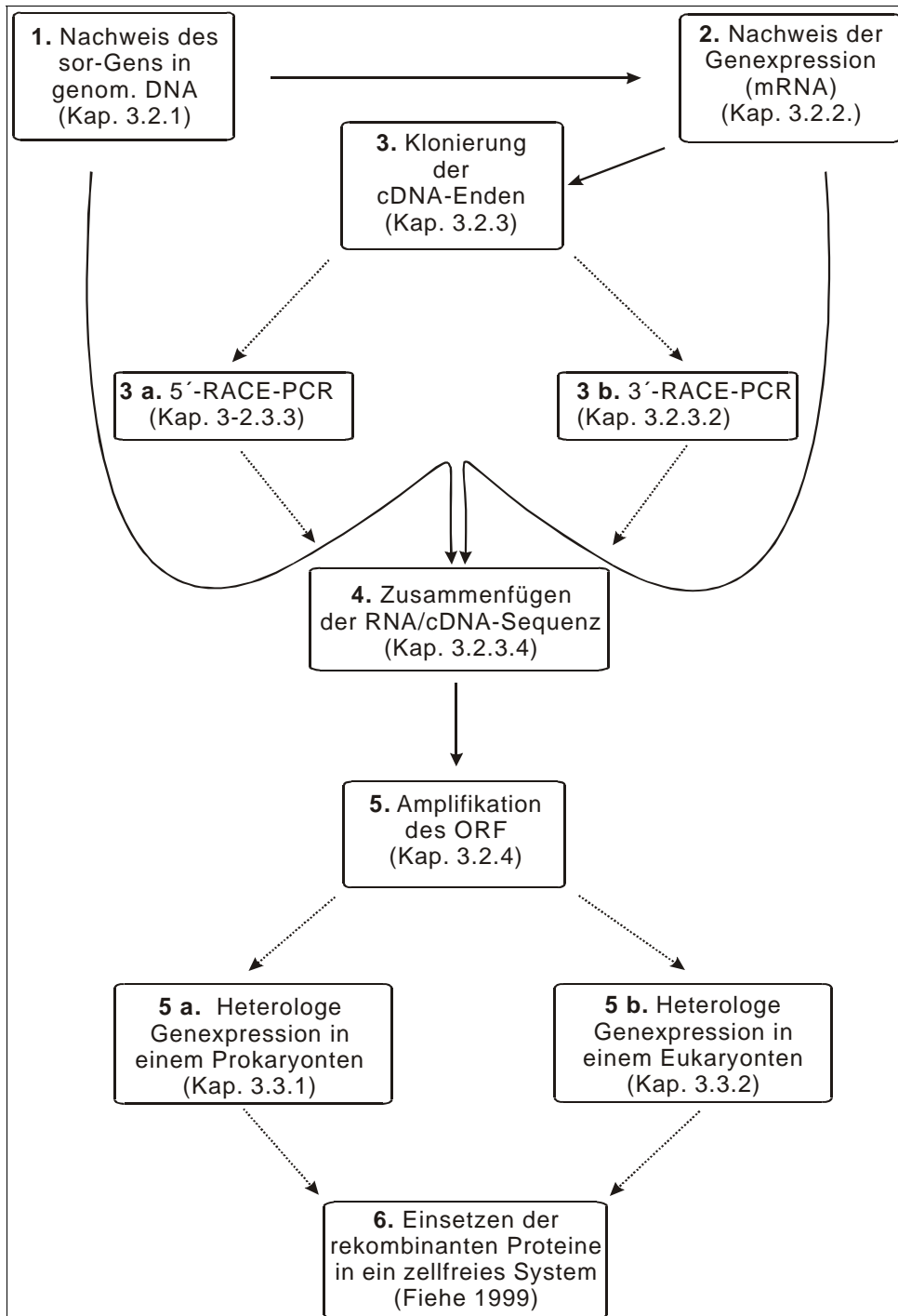


Abbildung 3.2 Strategie zum Nachweis und zur Klonierung eines sor-homologen Gens aus *Ginkgo biloba*

3.2.1 Nachweis einer *sor*-homologen Sequenz im Genom von *Ginkgo biloba*

Um eine *sor*-homologe Sequenz im Genom des Organismus nachzuweisen, wurde aus der von Arenz (1996) etablierten Zellsuspensionskultur genomische DNA isoliert (siehe Kapitel 2.4.1, Seite 39). Diese DNA bildete die Matrize in einer Polymerase-Ketten-Reaktion. Als Startmoleküle für die Polymerisation dienten die Oligonukleotide *Sor-1-Hin* und *Sor-1-Rück* (vgl. Abbildung 3.1, Seite 86 und Tabelle 2.2, Seite 16). Die Reaktion wurde, wie in Kapitel 2.4.10 (Seite 57) beschrieben, durchgeführt.

Entsprechend dem Aminosäurevergleich flankieren die Oligonukleotide einen Proteinabschnitt von 144 Aminosäuren. Die PCR lieferte ein ca. 450 bp großes DNA-Fragment. Dieses wurde in einen T-Überhangvektor kloniert (siehe Kapitel 2.4.7.2, Seite 51) und mit Standardprimern sequenziert (siehe Kapitel 2.4.13, Seite 68). Der anschließende Sequenzvergleich mit der Datenbank des NCBI zeigte hohe Homologien (zwischen 60 und 80 % Identität auf Aminosäureebene) zu den bis dahin bekannten *sor*-ähnlichen DNA-Sequenzen. Diese Daten ließen folgende Aussagen und Vermutungen zu:

1. *Ginkgo biloba* besitzt in seinem Genom eine Sequenz, die hohe Homologien zu bekannten *sor*-ähnlichen Sequenzen aufweist. Da diese Homologie zu bekannten *Sor*-homologen Sequenzen anderer Pflanzen besonders hoch ist (ca. 80 % auf Aminosäureebene), konnte davon ausgegangen werden, daß es sich um ein Fragment der gesuchten DNA-Sequenz handelt.
2. Da die gefundene Sequenz sowohl in der Länge als auch in der Homologie den Erwartungen aus dem Sequenzvergleich (siehe Abbildung 3.1, Seite 86) entspricht, sollte sich der gesamte offene Leserahmen hinsichtlich seiner Länge nicht grundlegend von den bekannten unterscheiden. Es ist eine Gesamtlänge der Sequenz von 930-1030 bp zu erwarten. Diese Annahme vorausgesetzt sollten kodierende Sequenzen am 3'-Ende von ca. 100 bp Länge und am 5'-Ende von ca. 260-390bp Länge noch unbekannt sein.
3. In dem polymerisierten Bereich besitzt das Genom kein Intron. Da der Organismus im Vergleich zu den anderen im Aminosäurevergleich (siehe Abbildung 3.1, Seite 86) gelisteten Pflanzen als sehr ursprünglich anzusehen ist, könnte das Genom nur sporadisch mit Introns durchsetzt sein. Deshalb könnte man erwarten, daß im noch unbekanntem Bereich des offenen Leserahmens keine oder nur wenig Intronsequenz vorkommt.

3.2.2 Nachweis der Expression

Die Fähigkeit eines Organismus, die Vitamere der B₆-Gruppe auf einem von *Escherichia coli* abweichenden Syntheseweg bilden zu können, scheint von der Ausstattung mit einem *sor*-homologen Gen abhängig zu sein. Da ein solches Gen im Genom von *Ginkgo biloba* nachgewiesen werden konnte, kann davon ausgegangen werden, daß der Organismus die genetisch erforderliche Ausstattung zu Biosynthese der Vitamere auf einem bisher unbekanntem Wege besitzt. Im Folgenden galt es, die Expression des Gens zu überprüfen, um sicherzustellen, daß das Gen in die Biosynthese involviert sein kann.

Grundlage für die Kontrolle der Expression (Transkription) war die von Arenz (1996) getroffene Feststellung, daß die Zellsuspensionskulturen ab dem 14. Tag nach ihrer Umsetzung in frisches MS_{woP}-Nährmedium (siehe Kapitel 2.1, Seite 15) eine maximale Menge an Ginkgotoxin im Medium akkumulieren. Davon ausgehend, daß die Translation der mRNA, die Bildung des Vitamins und dessen Sekretion in das Medium ca. 24 h in Anspruch nimmt, wurde poly(A⁺)RNA nach der in Kapitel 2.4.3 (Seite 43) beschriebenen Methode am 13. Kultivierungstag isoliert. Durch RT-PCR (vgl. Kapitel 2.4.11, Seite 59) und durch Northern Analyse (vgl. Kapitel 2.4.14, Seite 71) sollte das Vorhandensein einer *sor*-homologen mRNA zu diesem Zeitpunkt überprüft werden.

3.2.2.1 RT-PCR – Einschrittreaktion zum Nachweis der Genexpression

Da die Produktion der B₆-Vitamere im untersuchten *Ginkgo*-System im Vergleich zu *E. coli* und *S. cerevisiae* relativ gering war, mußte davon ausgegangen werden, daß die für die Proteine des Biosyntheseweges kodierenden Gene in niedriger Kopienzahl in der Zelle transkribiert werden. Daher wurde zunächst ein RT-PCR-gestützter Nachweis des Transkriptes gewählt.

Aus Zellen einer 13 Tage alten Zellsuspensionskultur von *Ginkgo biloba* wurde poly(A⁺)RNA isoliert (siehe Kapitel 2.4.3, Seite 43). Diese wurde in die RT-PCR eingesetzt, die mit dem *Ready To Go RT-PCR-Beads-System* der Firma Amersham-Biotech (siehe Kapitel 2.4.11, Seite 59) in Form einer „Eintopfreaktion“ durchgeführt wurde. Die schon für die Polymerisation des genomischen DNA-Fragmentes gewählten Primer *Sor-1-Hin* und *Sor-1-Rück* (vgl. Abbildung 3.1, Seite 86 und Tabelle 2.2, Seite 16) wurden auch in dieser Reaktion verwendet. Das Oligonukleotid *Sor-1-Rück* fungierte als Starter für die Reverse Transkription der mRNA in cDNA. In der sich direkt anschließenden PCR wurde mit beiden Oligonukleotiden wie bei der Reaktion mit genomischer DNA (vgl. Kapitel 3.2.1, Seite 90) ein ca. 450 bp langes cDNA-Fragment polymerisiert. Die Klonierung und Sequenzierung lieferte eine Basenfolge, die identisch mit der durch genomische PCR erhaltenen Sequenz war.

Diese Reverse Transkriptions-PCR erbrachte zunächst den Nachweis, daß die aus genomischer DNA bekannte Nukleinsäuresequenz in den Zellen der Suspensionskultur kurz vor dem Zeitpunkt der maximalen Ginkgotoxinkonzentration im Kulturmedium transkribiert wurde.

3.2.2.2 Northern Blot zum Nachweis der Genexpression

Um über den reinen Transkriptionsnachweis hinaus Informationen über die Länge des gebildeten Transkriptes zu erhalten, wurde eine Northern-Hybridisierung durchgeführt. Wie in *Kapitel 2.4.14 (Seite 71)* beschrieben, wurde mit den Primern *Sor-1-Hin* und *Sor-1-Rück* eine Sonde durch PCR hergestellt. Diese wurde mit poly(A⁺)RNA, die durch denaturierende Agarose-Gelelektrophorese der Länge nach getrennt wurde, hybridisiert. Der anschließende Immunoassay (vgl. *Kapitel 2.4.14, Seite 71*) visualisierte ein Transkript mit einer Länge von ca. 1000-1500 bp.

Die Hybridisierung lieferte ein sehr schwaches Chemilumineszenzsignal. Dies läßt auf eine nur geringe Transkriptionsrate des Gens schließen. Diese Daten korrelieren mit den von *Arenz (1996)* gefundenen niedrigen Konzentrationen von Ginkgotoxin in Zellen und im Medium von Suspensionskulturen unter optimierten Kulturbedingungen. Auf der Grundlage einer geringen Expressionrate ist nachvollziehbar, daß der Organismus im Vergleich zu anderen Systemen (*siehe Kapitel 3.2.2.1, Seite 91*) nur geringe Mengen der Vitamere produziert.

Ausgehend von der Vermutung, daß auch die Zielsequenz aus *Ginkgo biloba* in ihrer Länge den bekannten Pflanzengen (ca. 930 bp) (vgl. *Kapitel 3.1.1, Seite 85*) ähnlich ist, sollten die noch nicht sequenzierten 3'-und 5'-Enden der cDNA neben der kodierenden Basenfolge ca. 300-400 bp nicht-kodierende Sequenz beinhalten.

3.2.3 RACE-PCR

Für die Klonierung eukaryontischer „Full-length-Gene“ galt das Konstruieren einer cDNA-Phagenbank und das anschließende Durchsuchen mit homologen oder heterologen Sonden lange Zeit als der einzig gangbare Weg. Diese Technik bedarf nicht nur umfangreicher technischer Fertigkeiten, sie ist ebenso zeitintensiv und teuer. Ein wesentlicher Nachteil dieser Methode ist ihre hohe Nachweisgrenze. Gene, die nur in geringer Rate transkribiert werden („single copy genes“), sind nur schwer oder gar nicht mit dieser Methode nachweisbar. Aus diesem Grund wurde darauf verzichtet, eine im Rahmen anderer Arbeiten erstellte cDNA-Bibliothek von *Ginkgo biloba* nach einem *sor*-homologen Transkript zu durchsuchen.

Stattdessen wurde der sensitiveren RACE-PCR Technik für die Klonierung der unbekannt cDNA-Enden der Vorzug gegeben (siehe *Kapitel 2.4.12, Seite 62*). Dieses Verfahren kann eingesetzt werden, wenn zentrale Sequenzbereiche einer cDNA bekannt sind. Die Methode ermöglicht nach *Dieffenbach (1995)* den Nachweis von nur 10 fmol einer Nukleinsäure. Die im Vergleich zur cDNA-Bibliothek wesentlich niedrigere Nachweisgrenze der RACE-PCR läßt sich durch die unterschiedliche Verkettung der notwendigen Arbeitsschritte erklären: In beiden Fällen wird von poly(A⁺)RNA ausgehend cDNA synthetisiert. Zur Synthese einer cDNA-Bibliothek werden bis zur Vermehrung eines Transkriptes in einem Bakterium zahlreiche mit Materialverlusten verbundene Arbeitsschritte durchgeführt (Größenselektion der cDNA, Ligation einer Linkersequenz an die cDNA, Ligation der cDNA in einen Phagenvektor, Verpacken der DNA in eine Phagenhülle, Infektion von Bakterien und anschließende Lyse). Im Gegensatz dazu erfolgt die Anreicherung des Zielmoleküls bei der RACE-PCR im ersten Arbeitsschritt. Der folgende Klonierungsschritt kann dann mit einer exponentiell vermehrten Nukleinsäure durchgeführt werden.

3.2.3.1 Qualität der mRNA für die RACE-PCR

Die Qualität der RNA erwies sich für den Erfolg der Klonierungen als ausschlaggebend. Entgegen den Angaben von *Dieffenbach (1995)*, nach denen auch Gesamt-RNA für die RACE-PCR eingesetzt werden kann, führte deren Verwendung nicht zum Erfolg. Obwohl unter Verwendung verschiedener Protokolle RNA aus Zellen der MS_woP-Suspensionskulturen (jeweils 13. Kultivierungstag) isoliert wurde, verliefen die Enzymreaktionen nicht befriedigend. Während der PCR wurden keine Amplifikate gebildet, wenn die Reinigungsmethode Ribonukleinsäure minderer Qualität lieferte. War eine Methode geeignet, RNA ausreichender Qualität zur Verfügung zu stellen, versagte die Selektion des Zielmoleküls bei der „Nested-PCR“ (vgl. *Abbildung 2.2, Seite 66*, und *Abbildung 2.3, Seite 73*) aufgrund der Präsenz anderer RNA-Spezies.

Deshalb wurde der Reinigung von poly(A⁺)RNA der Vorzug gegeben. Verwendet wurde das mRNA-Isolierungssystem *QuickPrep[®] Micro mRNA Purification Kit* der Firma Pharmacia-Biotech (siehe *Kapitel 2.4.3, Seite 43*), das zusätzlich die in *Ginkgo biloba* in hohen Anteilen enthaltenen Polysaccharide abtrennt. Diese Abtrennung ist von Vorteil, da Polysaccharide durch Erhöhung der Viskosität der Lösung die Effizienz der Enzymreaktion inhibieren. Die so gereinigte poly(A⁺)RNA wurde in die 3'- und die SMART-RACE-PCR eingesetzt (siehe *Kapitel 2.4.12, Seite 62*).

3.2.3.2 3'-RACE-PCR zur Klonierung des 3'-Endes der *sor*-cDNA

Zur Klonierung des 3'-Endes der *sor*-homologen cDNA aus Zellen der *Ginkgo biloba*-Suspensionskultur wurde, wie in Kapitel 2.4.12 (Seite 62) beschrieben, verfahren. Zur Synthese der cDNA wurde poly(A⁺)RNA (0,5 µg) aus am 13. Kultivierungstag geernteten MS_{woP}-Zellkulturen in cDNA revers transkribiert. Die Reaktion wurde mit dem Q_T-Primer Q_{T2} durchgeführt [die relative Position der verwendeten Oligonukleotide zeigt die Abbildung 7.1 (Kapitel 7.1.1, Seite 143)].

Für die PCR-Reaktion 1 wurden die Oligonukleotide Q₁ und *Sor-3-Race* (GSP₃) (vgl. Abbildung 2.1, Seite 64 und Tabelle 2.2, Seite 16) eingesetzt. Da der für die Reverse Transkription verwendete Erstrangprimer Q_{T2} nur eine Ankersequenz enthielt (vgl. Tabelle 2.2, Seite 16), wurde in der PCR-Reaktion 2 nur der genspezifische Primer (jetzt *Sor-4-Race*) ausgetauscht; der Ankerprimer blieb erhalten. Die Reaktion wurde als „Semi-Nested-PCR“ durchgeführt.

Trotz dieser eingeschränkten Bedingungen lieferte die PCR-Reaktion 2 ein einzelnes PCR-Fragment. Abbildung 3.3 zeigt die PCR-Reaktionen 1 und 2 nach der Trennung in einem 1%igen Agarosegel. Während Reaktion 1 (Spur 1) keine vollständige Selektion eines DNA-Fragments ermöglichte, konnte durch die Reaktion 2 ein ca. 550 bp großes DNA-Fragment erhalten werden.

Das DNA-Fragment von 550 bp wurde aus dem Gel eluiert, in einem T-Überhangvektor kloniert und die Insertion mit vektorspezifischen Primern sequenziert. Die verifizierten Sequenzdaten sind in den Abbildungen 7.3 bis 7.6 (Seite 145 bis 148) dargestellt (*sorGB-3*). Die Basenfolge repräsentiert ausgehend vom verwendeten „Nested“-Primer (GSP₃) *Sor-3-Race* über das Stopcodon hinaus den noch unbekanntem Bereich der mRNA. Jenseits der Translationstermination (Basenfolge: TAG, Ende der Sequenz *pwoGBfl*) folgen weitere 230 bp nicht kodierende Sequenz. Die Polyadenylierung der mRNA ist aufgrund der Degeneration des Erstrangprimers Q_{T2} am 3'-Terminus (vgl. Tabelle 2.2, Seite 16) nicht visualisierbar. Diese Degenerierung führt das Erstrang-Oligonukleotid während des Anne-

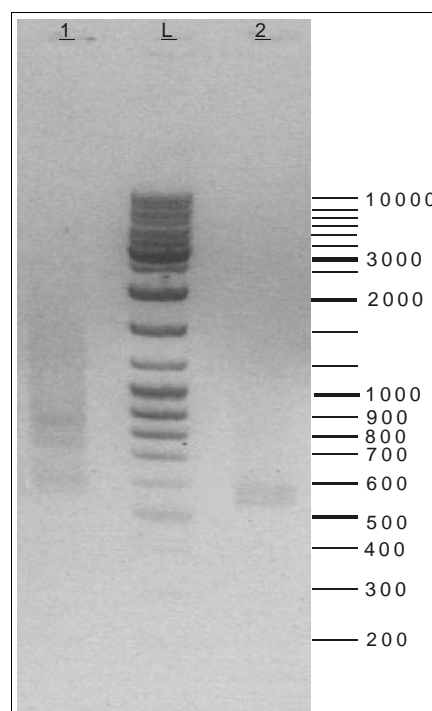


Abbildung 3.3 Agarose-Gelelektrophorese der 3'-RACE-PCR-Versuche

L = Molekulargewichtsstandard [bp], 1 = PCR-Reaktion 1, 2 = PCR-Reaktion 2

alingvorganges der Reversen Transkription an das erste Nukleotid des nichtkodierenden Bereiches hinter der Polyadenylierungssequenz (vgl. *Abbildung 2.2, Seite 66 und Clontech RACE-Manual auf der CD unter lit\Clontech*). Dieses Vorgehen gibt zwar keine Auskunft über die Länge des stabilisierenden Terminus, es ermöglicht aber eine reibungslosere Reverse Transkription der mRNA und liefert längere Transkripte.

3.2.3.3 5'-RACE-PCR zur Klonierung des 5'-Endes der *sor*-cDNA

Um das 5'-Ende der *sor*-homologen cDNA aus Zellen der *Ginkgo biloba* Suspensionskultur zu klonieren, wurde, wie in *Kapitel 2.4.12 (Seite 62)* beschrieben, verfahren.

Zur Synthese der cDNA wurden 0,5 µg poly(A⁺)RNA revers transkribiert, die aus 13 Tage alten MS_woP-Zellsuspensionskulturen isoliert wurde (siehe *Kapitel 2.4.3, Seite 43*). Die Reaktion wurde unter Verwendung des Q_T-Primers 5'-RACEcDNA (siehe *Abbildung 2.1, Seite 64*) durchgeführt [die relative Position der verwendeten Oligonukleotide zeigt die *Abbildung 7.1 (Kapitel 7.1.1, Seite 143)*].

Vom Erstrangsyntheseansatzes wurden 10% der PCR-Reaktion 1 zugeführt. Zur Amplifikation des Zielmoleküls dienten die Oligonukleotide *Sor-2-Race* und *SMART_{long}*.

1/50 der PCR-Reaktion 1 wurde in die „nested“-PCR-Reaktion 2 eingesetzt. Zum Polymerisationsstart wurden die Primer *Sor-1-Race* und *Smart_{short}* herangezogen. Diese Strategie war möglich, da durch die Verwendung des Primers *SMART_{long}* in der Reaktion 1 eine zusätzliche Primerbindestelle selektiv in das 5'-Ende des cDNA-Zielmoleküls integriert wurde. Gegenüber klassischen Verfahren, bei denen in alle entstehenden cDNA-Moleküle eine „Nested“-Primerbindestelle eingefügt wird, wird hier ein Selektionsvorteil in bezug auf das Zielmolekül erreicht (vgl. *Abbildung 2.2, Seite 66, und Dieffenbach, 1995*).

Jeweils 1/5 der PCR-Reaktionen wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert (siehe *Abbildung 3.4, Seite 96*). Die PCR-Reaktion 2 lieferte ein ca. 550 bp großes DNA-Fragment (vgl. *Abbildung 3.4, Spur 2*).

Das Fragment wurde in einen T-Überhangvektor ligiert und sequenziert. Der Vergleich der Sequenzierdaten mit bereits bekannten Genen bestätigte eine Homologie zum 5'-Ende bekannter *sor*-Sequenzen. Es handelte sich um das 5'-Ende der gesuchten *sor*-cDNA. Diese besitzt vor dem Startnukleotid (vgl. *Abbildung 7.3, Seite 145*, Beginn der pwoBGfl-Sequenz, Basenfolge ATG) weitere 150 bp einer nichtkodierenden Sequenz.

In analoger Weise durchgeführte Reaktionen, in die im Unterschied zum oben beschriebenen Versuchsablauf das genspezifische Oligonukleotid *Sor-2-Race* zur cDNA-Erststrangsynthese eingesetzt wurde (vgl. *Abbildung 2.2*, Seite 66), verliefen negativ. Die Nutzung eines genspezifischen Primers für die Reverse Transkription hätte einen Selektionsvorteil für die Ziel-cDNA gegenüber der Verwendung eines Universal-Erststrangprimers erwarten lassen. Dies war nicht der Fall. Durch die beiden nachfolgenden PCR-Reaktionen konnte kein

DNA-Fragment nachgewiesen werden (vgl. *Abbildung 3.4*, *Spur 3/4*). Da diese Reaktionen identisch zu denen der vorher beschriebenen Reaktionsfolge (*Abbildung 3.4*, *Spur 1 und 2*) sind, muß der GUND in der vorausgehenden Reverse Transkription zu suchen sein. Offensichtlich verlief dieser Schritt mit dem genspezifischen Oligonukleotid nicht ausreichend gut.

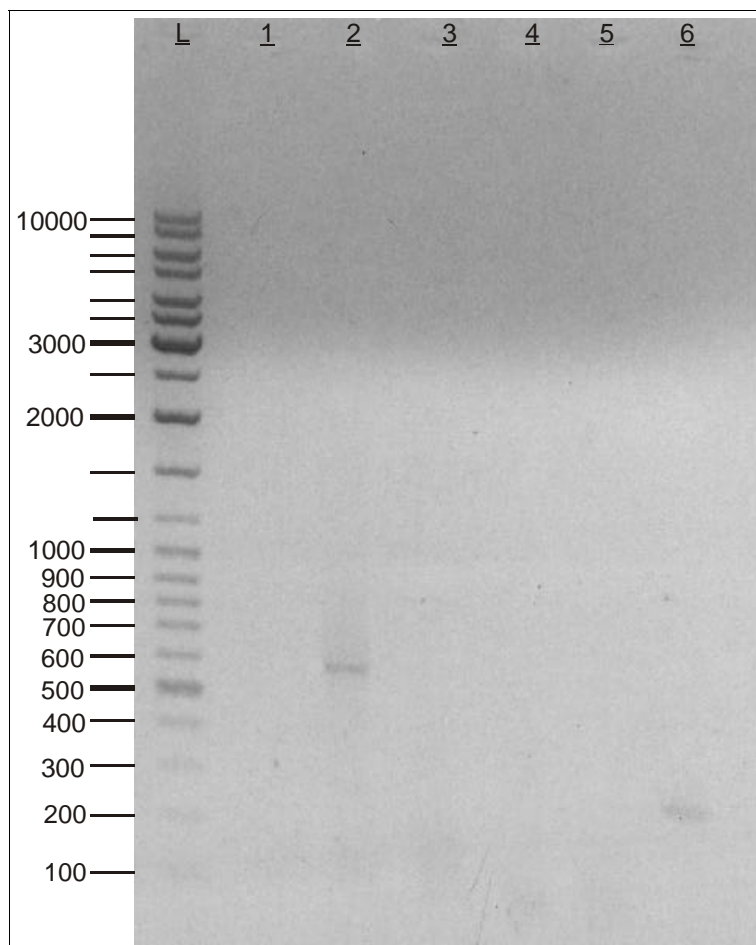


Abbildung 3.4 Agarose-Gelelektrophorese der 5'-RACE-PCR-Reaktionen

Spuren 1/2: PCR-Reaktionen 1 und 2 wurden mit cDNA durchgeführt, die mit dem Primer 5'-RACEcDNA erzeugt wurde; Spuren 3/4: PCR-Reaktionen 1 und 2 wurden mit cDNA durchgeführt, die mit dem Primer Sor-2-Race erzeugt wurde; Spuren 5/6: PCR-Reaktionen 1 und 2 der Positivkontrolle, L = Molekulargewichtsstandard [bp].

3.2.3.4 Gesamt-cDNA des *sor*-ähnlichen Gens aus *Ginkgo biloba* und offener Leserahmen (ORF) des Gens

Die Position der für die RACE-PCR-Versuche generierten Primer wurde so gewählt, daß die in diesen Versuchen polymerisierten DNA-Fragmente Überlappungssequenzen mit dem zentralen, aus genomischer DNA und RNA amplifizierten Fragment besaßen (vgl. *Abbildung 3.1*, Seite 86). Dies ermöglichte es, anhand einer Homologiesuche die überlappenden Bereiche festzustellen und die Sequenzen den beiden Enden der cDNA zuzuordnen. Die mit den Progammodulen *Megalign* und *Seqman* der DNA-Suite *DNA-Star Lasergene 99* durchgeführten Arbeiten machten das Errechnen der kompletten Basenfolgen der *sor*-homologen cDNA aus *Ginkgo biloba* möglich,

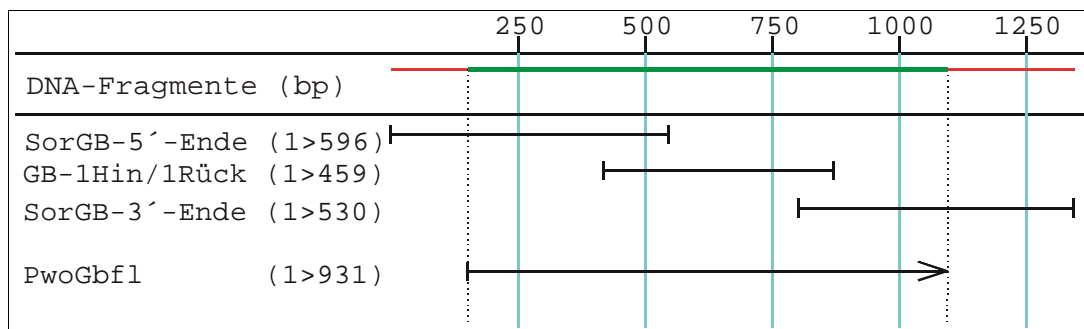


Abbildung 3.5 Relative Lage der durch die beschriebenen PCR-Methoden erhaltenen DNA-Amplifikate

SorGB-5'-Ende: Fragment aus 5'-RACE-PCR; SorGB-1Hin/1Rück: Zentrales Fragment aus PCR mit genomischer DNA und mRNA; SorGB-3'-Ende: Fragment aus 3'-RACE-PCR; pwoGbfl: Amplifikat des ORF mit PWO-Polymerase für die spätere Genexpression (zur Berechnung des Leserahmens vgl. *Abbildung 3.6*, Seite 98).

ohne daß sie zusammenhängend kloniert werden mußten. *Abbildung 3.5* (Seite 97) visualisiert die relative Lage der durch die verschiedenen PCR-Reaktionen mit DNA und cDNA klonierten DNA-Fragmente, für die Sequenzinformationen erhalten wurden. Durch den Vergleich der überlappenden Enden der PCR-Produkte aus der 5'-RACE-PCR (Sequenz *SorGB-5'-Ende*), der 3'-RACE-PCR (Sequenz *SorGB-3'-Ende*) mit dem zuerst aus genomischer DNA und später auch aus mRNA erhaltenen zentralen Fragment (*SorGB-1Hin/1Rück*) kann ihre relative Lage zueinander berechnet werden. Der Abgleich der drei Einzelsequenzen ergab eine cDNA-Gesamtlänge von ca. 1350 bp (ohne Polyadenylierungssequenz).

Zur Festlegung des für das *Sor*-homologe Protein aus *Ginkgo biloba* kodierenden offenen Leserahmens (ORF) wurden für alle sechs Leseraster die ORFs berechnet (vgl. *Abbildung 3.6*, Seite 98). Bei diesen Berechnungen wurde davon ausgegangen, daß das für Methionin kodierende ATG-Triplett als Start-Codon und die Codons *ochre*

(TAA), *amber* (TAG) und *opal* (TGA) als Translationsstop fungieren. Die *Abbildung 3.6* zeigt die auf dieser Grundlage in der cDNA-Sequenz gefundenen offenen Leserahmen. Der im Raster 1 schwarz umrandete Bereich symbolisiert eine 929 bp lange DNA-Sequenz (entspricht 309 Aminosäuren), die in der Datenbankrecherche (NCBI

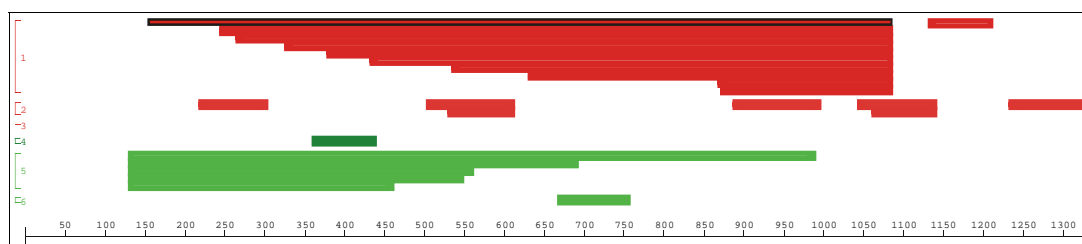


Abbildung 3.6 Kartierung der möglichen Leserahmen in der *sor*-homologen cDNA von *Ginkgo biloba*

Die im (+)-Plus-Strang liegenden Leserahmen sind rot, die im (-)-Strang liegenden Leserahmen sind grün markiert. Der schwarz markierte Bereich in Raster 1 symbolisiert die für das *sor*-homologe Protein kodierende DNA-Sequenz (ORF).

und Proteinsequenzvergleich in *Abbildung 3.7*, Seite 99) als *sor*-homolog identifiziert wurde. Dieser Sequenzbereich wurde im weiteren dazu verwendet, um mit Pwo-Polymerase (einer Proofreading-Polymerase) den für das Protein kodierenden Bereich zu klonieren (vgl. *Kapitel 3.2.4*, Seite 100) und zu exprimieren (vgl. *Kapitel 3.3*, Seite 101). Wird dieses Raster zugrunde gelegt, besitzt die cDNA nichtkodierende Sequenzbereiche: ca. 150 bp liegen am 5'-Ende vor dem Start-Codon, ca. 230 bp hinter dem Stop-Codon am 3'-Ende der cDNA. Die Länge der Polyadenylierungssequenz konnte aufgrund der Klonierungsstrategie nicht bestimmt werden (vgl. *Kapitel 3.2.3.2*, Seite 94). Die cDNA-Sequenz sowie die sich aus dem gefundenen offenen Leserahmen ergebende Proteinsequenz wurden in den zugehörigen Nukleotid- und Protein-Datenbanken des NCBI und EMBL unter der Zugangsnummer AF344827 eingetragen und stehen zum Abruf zur Verfügung.

Abbildung 3.7 (Seite 99) zeigt den aus *Abbildung 3.1* (Seite 86) bekannten Homologievergleich *Sor*-homologer Proteine ergänzt um das aus *Ginkgo biloba* klonierte *Sor*-Protein sowie das für diese Proteinfamilie charakteristische Aminosäuremotiv (nach der CD-Database des NCBI, Proteinmotiv *Sor1/Snz*: pfam01680). Das in der Datenbank erfaßte Motiv umfaßt nur einen Teil der tatsächlich vorhandenen Homologie. Diese ist zum C-Terminus der Proteinsequenz um weitere 65 Aminosäuren ausgedehnt (Aminosäureposition 320-330 des Alignments). Die hier erkennbare deutliche Homologie des *Ginkgo*-Proteins zu dem aus *Cercospora nicotianae* stammenden Protein (vgl auch *Tabelle 3.2*, Seite 100) ist Grundlage für die in *Kapitel 3.4* (Seite 107)

Tabelle 3.2 Paarweise Berechnung der Identität/Divergenz der in Abbildung 3.1 verglichenen *sor*-homologen Proteinsequenzen

Den Berechnungen der Identität und der Divergenz zweier Sequenzen liegen unterschiedliche Algorithmen zugrunde (Lasergene 99, DNA-Star, Megalign). Die Divergenz ist berechnet unter Einbeziehung eines rekonstruierten phylogenetischen Baumes. Durch die Identität werden zwei Sequenzen direkt ohne die Einbeziehung phylogenetischer Abhängigkeiten miteinander verglichen. Aufgrund der Verwendung unterschiedlicher Berechnungsmethoden ist die Summe aus Identität und Divergenz für ein Vergleichspaar nicht 100%. Die Werte für die Vergleich rein pflanzlicher Sequenzpaare sind *kursiv* dargestellt, die Werte für den Vergleich einer pflanzlichen Sequenz (*H. brasiliensis*, *A. thaliana*) mit der von *Ginkgo biloba* sind **fett** markiert.

		Identität[%]							
D	---	1	2	3	4	5	6	7	
i	1	---	61,9	63,7	51,7	55,1	62,2	63,7	1 - <i>C. nicotianae</i> .
v	2	39,9	---	91,1	61,9	62,0	92,5	89,3	2 - <i>H. brasiliensis</i>
e	3	37,5	10,1	---	64,0	62,5	87,6	85,6	3 - <i>A. thaliana</i>
r	4	57,5	53,4	48,5	---	65,7	62,5	65,1	4 - <i>T. maritima</i>
g	5	44,1	51,0	48,7	50,7	---	61,1	62,8	5 - <i>S. cerevisiae</i>
e	6	40,6	7,2	12,8	50,0	50,3	---	87,0	6 - <i>P. vulgaris</i>
n	7	37,2	12,7	17,2	46,6	48,7	14,0	---	7 - <i>G. biloba</i>
z									

3.2.4 Klonierung des offenen Leserahmens des *sor*-homologen Gens aus *Ginkgo biloba*

Der offene Leserahmen wurde mit Hilfe der PCR amplifiziert und in den Vektor pGem 3Zf(+) (siehe Kapitel 7.2, Seite 152) kloniert. Dazu wurde zunächst mit den Primern *sorGgfl-Start* und *sorGBfl-Stop* auf der Grundlage der in der SMART-RACE-PCR (vgl. Kapitel 2.4.12, Seite 62 und Kapitel 3.2.3.3, Seite 95) erstellten cDNA der offene Leserahmen mit Pwo-Polymerase amplifiziert (vgl. Kapitel 2.4.10, Seite 57). Das Fragment wurde zur Klonierung durch die Restriktion mit den Endonukleasen *BamH I* und *Sal I* (vgl. Kapitel 2.4.6, Seite 49) vorbereitet und durch Präzipitation (vgl. Kapitel 2.4.4, Seite 44) gereinigt. Das so erhaltene DNA-Fragment wurde mit dem in gleicher Weise vorbehandelten Vektor, wie in Kapitel 2.4.7.1 (Seite 50) beschrieben, ligiert.

Die nach der Transformation von kompetenten Zellen des Stammes *E coli XL1 Blue MRF'Kan* (vgl. Kapitel 2.4.8, Seite 53) erzeugten Klone wurden zur Präparation des Plasmids in kleinem Maßstab kultiviert. Das zwischen die *BamH I*- und *Sal I*-Restriktionsschnittstellen klonierte DNA-Fragment wurde sequenziert. Die erhaltene Sequenz

bestätigte die zuvor in den verschiedenen PCR-Versuchen im Rahmen der Klonierung der Einzelfragmente erhaltenen Informationen. Sie zeigte ferner eine Zweideutigkeit in der Triplettposition 3 des für die Aminosäure 129 kodierenden Codons. Die Klonierung lieferte zwei unterschiedliche rekombinante Plasmide (*pL5-1/2* und *pL6-1*, vgl. *Tabelle 2.5, Seite 19*). Deren Insertion kodierte an dieser Stelle entweder für die Aminosäure Methionin (Plasmid *pL6-1*, Codon *ATC*) oder für Threonin (Plasmid *pL5-1/2*, Codon *ATG*).

Das anfangs erhaltene zentrale PCR-Fragment aus genomischer DNA von *Ginkgo biloba* (vgl. *Kapitel 3.2.1, Seite 90*) trug an dieser Stelle ein Methionin-Codon. Da die Amplifikation des ORF mit einer Proofreading-Polymerase durchgeführt wurde, ist es wahrscheinlich, daß schon während der Reversen Transkription in einem Teil der Transkripte eine Fehlbase eingebaut wurde. Um auszuschließen, ein Isogen mit einer Aminosäurevariabilität bei der Klonierung übersehen zu haben, wurden alle folgenden mit dem Gen durchgeführten Experimente sowohl mit dem für Methionin- als auch mit dem für Threonin-kodierenden Konstrukt durchgeführt.

3.3 Heterologe Expression des *sor*-ähnlichen Gens aus *Ginkgo biloba*

Um die Funktion des durch den ORF der *sor*-homologen cDNA aus *Ginkgo biloba* kodierten Proteins zu überprüfen, sollte das Protein in einem heterologen System überexprimiert werden. Das gereinigte Protein sollte dann in einem zellfreien System zur Produktion von Ginkgotoxin (siehe *Fiehe, 1999*) eingesetzt werden, um dessen Einfluß auf die Synthese der B₆-Vitamere charakterisieren zu können.

Da in der Literatur keine Daten zur Tertiärstruktur und zur posttranslationalen Modifikation der *Sor*-homologen Proteine vorliegen, wurde entschieden, das Protein sowohl prokaryontisch als auch eukaryontisch zu exprimieren und beide Proteine hinsichtlich ihres Effektes auf die Ginkgotoxinbildung zu vergleichen. Sollte sich kein Unterschied zwischen beiden Expressionsmodi zeigen, könnte man davon ausgehen, dass entweder keine posttranslationale Modifikation durch den eukaryontischen Organismus vorgenommen wird, oder diese keinen Einfluß auf die Enzymaktivität besitzt. In einem solchen Fall könnte in weiteren Versuchen mit dem einfacheren der beiden Systeme weiter gearbeitet werden.

3.3.1 Prokaryontische Expression in *Escherichia coli* mit dem *pMal*TM Protein Fusion and Purification System

Als prokaryontisches Expressionssystem diente das *pMal*TM Protein Fusion and Purification System der Firma New England Biolabs. Dieses System bietet die Möglichkeit der Expression und Reinigung des Zielproteins zusammen mit dem Maltose-Bindeprotein (*MBP*) aus *Escherichia coli*. Die Expression über den starken „*tac*“-Promotor in Kombination mit dem *malE*-Translationsinitiationssignal ermöglicht eine gute Expressionsrate. Die Reinigung der Proteins erfolgte über eine Amylose-Matrix, an die nur das Fusionsprotein aufgrund seiner Maltose-bindenden Domäne bindet (umfassende Informationen zum System finden sich auf der beiliegenden CD unter \lit\NEB\pMal).

3.3.1.1 Klonierungsstrategie

Zur Expression des Proteins waren vorangehende Klonierungsarbeiten notwendig, deren Durchführung im *Kapitel 2.5.3 (Seite 78)* beschrieben ist. Der offene Leserahmen der Vektoren pL5-1 (ORF mit Codon für Aminosäure 129 = Threonin) und pL6-1 (ORF mit Codon für Aminosäure 129 = Methionin) wurden mit den Endonukleasen *BamH I* und *Sal I* herausgeschnitten, in den mit dem gleichen Enzymen vorbehandelten *pMal-c2*-Vektor ligiert und Zellen des Expressionstammes *E. coli XL1 Blue MRF Kan* damit transformiert (Expressionskonstrukte siehe *Kapitel 2.5.3, Seite 78*).

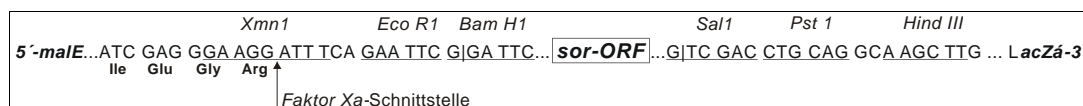


Abbildung 3.8 Klonierungsschema der Konstrukte für das *pMal*-System

Zur Kontrolle der Transformation wurde aus einer 2 ml-Kultur einer rekombinanten Bakterienkolonie das Expressionsplasmid reisoliert und die korrekte Ligation durch Restriktionsanalyse mit den Endonukleasen *BamH I* und *Sal I* kontrolliert. Ferner wurde die korrekte Ligation durch DNA-Sequenzierung des ORF mit den Primern *pMal-MCS-Hin* und *pMal-MCS-Rück* (vgl. *Tabelle 2.2, Seite 16 und Abbildung 7.1, Seite 143*) überprüft. Bei den Klonen, die sowohl in den Restriktionanalysen als auch der Plasmid-Sequenzierung positive Ergebnisse lieferten, wurde die Synthese des Fusionsproteins induziert (siehe *Kapitel 2.5.3.1, Seite 78*). Der Erfolg der Induktion wurde mit Hilfe von SDS-PAGE überprüft.

Die *Tabelle 2.16* (Seite 35) zeigt die im Rahmen dieser Klonierung erzeugten Expressionskonstrukte und rekombinanten Organismen für das Methionin- (*pL60-1*) bzw. das Threonin-tragende *sor*-Gen (*pL53-35-1*) aus *Ginkgo biloba*.

Das durch den nicht rekombinanten *pMal-c2*-Vektor (siehe Kapitel 7.2.2, Seite 152) kodierte *MalE*-Protein besitzt eine Größe von 42 kDa. Durch die Fusion mit dem im gleichen Leseraster folgenden *lacZa* -Protein entsteht bei der Induktion eines Wirtes, der ein nicht rekombinantes Plasmid trägt, ein Fusionsprotein von 52 kDa. Dieser Versuch ermöglicht die Kontrolle des Induktionsverfahrens.

Die anhand des ORF berechnete Größe des *Sor*-Proteins aus *Ginkgo biloba* beträgt 33 kDa. Nach der Induktion eines *malE-sor*-rekombinanten Organismus sollte dieser bei Induktion ein Fusionsprotein von ca. 75 kDa Größe produzieren. Bei korrekter Translation sollte dieses Protein durch Hydrolyse mit der Protease Faktor Xa in das Zielprotein (33 kDa) und seinen Fusionsanteil (Maltose-Bindendes-Protein: 42 kDa) spaltbar sein. Dies ist möglich, da die gewählte Klonierungsstelle im Vektor *pMal-c2* strangabwärts zu dem Bereich liegt, der für das Faktor Xa-Erkennungsmotiv kodiert.

3.3.1.2 **Expressionsergebnisse und Proteinreinigung**

Für jedes der beiden in den *pMal*-Vektor klonierten Gene konnten erfolgreich rekombinante Organismen des Stammes *E. coli* XL1 Blue MRF⁺Kan (vgl. *Tabelle 2.16*, Seite 35) erzeugt werden, die ein Protein korrekter Größe produzieren.

Dazu mußten die von der Firma NEB empfohlenen Induktionsparameter modifiziert werden: Rich_{PenG}-Medium wurde im Verhältnis 1/100 mit einer Vorkultur des zu induzierenden rekombinanten Stammes angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inokuliert (37 °C, 180 rpm). Durch Zugabe von IPTG wurde die Bildung des Fusionsproteins indu-

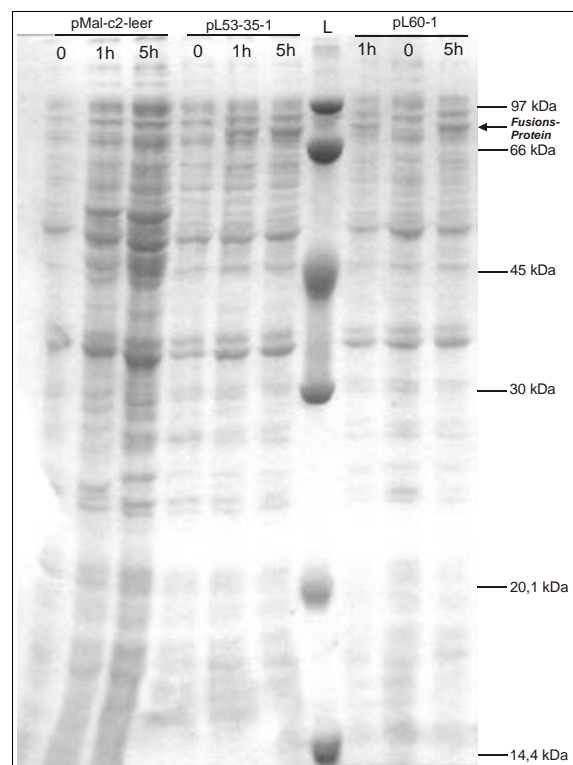


Abbildung 3.9 SDS-PAGE der Induktionskontrolle.

Der Expressionsstamm trug die obigen Plasmide: *pMalc2-leer* (Kontrollvektor *pMal-c2*), *pL53-35-1* (*pMal-c2-sorGBT*), *pL60-1* (*pMal-c2-sorGBMeth*); Zeitpunkt der Probenahme: 0 = vor Induktion, 1 = 1 h nach Induktion, 5 = 5 h nach Induktion.

ziert (Endkonzentration 0,3 mM). Die Kultur wurde weitere 5 h bei 28-30 °C inkubiert. Diese Temperaturabsenkung mußte vorgenommen werden, um eine Bildung des Proteins zu ermöglichen. Wurde wie vom Hersteller empfohlen verfahren (0,3 mM IPTG, 180 rpm, 37 °C, 5-24 h), begann nach ca. 4 h die Lyse der Zellen. Sie schwammen in Agglomeraten, wie man sie auch nach Phagenhydrolyse kennt, im Medium. Die Zellzahl reduzierte sich so drastisch, daß die Suspension wieder klar wurde. Eine Reinigung des Proteins war nicht möglich. Die *Abbildung 3.9*, Seite 103, zeigt die Proteinrohextrakte nach Trennung durch SDS-PAGE vor und nach Induktion.

Zur Reinigung des Fusionsproteins unter modifizierten Expressionsbedingungen wurde das Zellsediment einer 1 l Kultur nach der in *Kapitel 2.5.3* (Seite 78) beschriebenen Methode aufgearbeitet. Das Fusionsprotein wurde über eine Amylose-Affinitätschromatographie von den übrigen im Rohextrakt enthaltenen Proteinen getrennt. Die *Abbildung 3.10* zeigt die Coomassie-Blue-Färbung einer SDS-PAGE zur Kontrolle der Reinigung. Nach Induktion der Fusionsproteinsynthese erschien eine zusätzliche Bande von ca.

76 kDa Größe, die sich (neben wenigen anderen Proteinen) über die Amylose-Affinitätsmatrix reinigen ließ. Die Hydrolyse mit Faktor Xa lieferte zwei Proteinfragmente korrekter Größe (Fusionsanteil 42 kDa, Zielprotein ca. 36 kDa). Die Charge des so gereinigten Proteins konnte für Inkubationen in dem von *Fiehe (1999)* beschriebenen System verwendet werden.

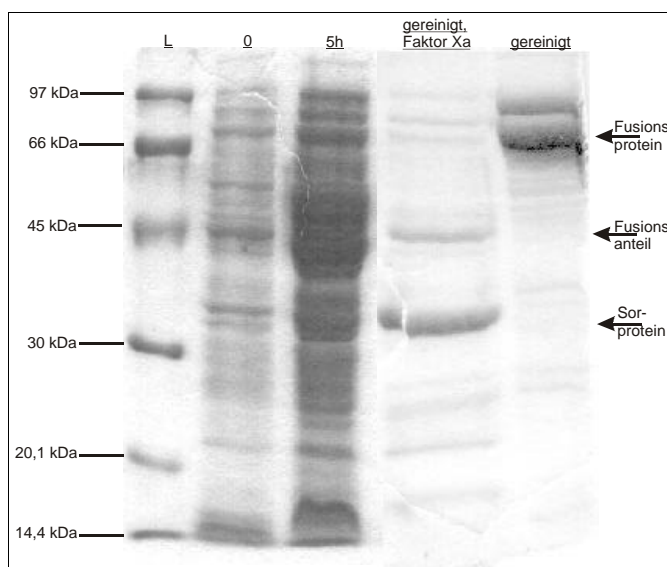


Abbildung 3.10 *Reinigung des Fusionsproteins*

L = Molekulargewichtsstandard; *O* = Rohextrakt (nicht induziert); *5h* = Rohextrakt (5 h nach modifizierter Induktion); *gereinigt* = über Maltose-Harz gereinigtes Protein; *gereinigt, Faktor Xa* = gereinigtes Protein nach Hydrolyse mit Faktor Xa.

3.3.2 Eukaryontische Expression in *Saccharomyces cerevisiae*

3.3.2.1 Das pQE-30-Hefe-System

Zur eukaryontischen Expressions des *Sor*-homologen Proteins aus *Ginkgo biloba* diente ein *His₆-Tag* gestütztes System der Firma Qiagen, Hilden, zur Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Dieses System vereinigt die Möglichkeit der Expression in einem eukaryontischen Wirt mit den Vorteilen einer *His₆-Tag-N²⁺-NTA*-gestützten Proteinreinigung. Die Expression des Proteins wird über einen Galactose-induzierbaren Promotor gesteuert.

3.3.2.2 Klonierungsstrategie

Zur Expression des Proteins waren vorangehende Klonierungsarbeiten notwendig, deren Durchführung im *Kapitel 2.4.9 (Seite 55)* beschrieben ist. Der offene Leserahmen der Vektoren pL5-1 (ORF mit Codon für Aminosäure 129 = Threonin) und pL6-1 (ORF mit Codon für Aminosäure 129 = Methionin) wurden mit den Endonukleasen *BamH I* und *Sal I* herausgeschnitten, in den mit den gleichen Enzymen vorbehandelten pQE₃₀-Y-Vektor ligiert und Zellen des Bakterienstammes *Escherichia coli XL1 Blue MRF⁺Kan* damit transformiert (Expressionskonstrukte siehe *Tabelle 2.6, Seite 19*). Dieser Schritt diente der Vermehrung des Expressionskonstruktes und war möglich, da der Expressionsvektor pQE₃₀-Y als Shuttle-Vektor sowohl einen bakteriellen als auch einen pilzlichen Replikationsursprung besitzt.



Abbildung 3.11 Klonierungsschema der Konstrukte für das pQE₃₀-Y-System

Zur Kontrolle der Transformation wurde aus einer 2 ml-Kultur einer rekombinanten Bakterienkolonie das Expressionsplasmid reisoliert und die korrekte Ligation durch Restriktionsanalyse mit den Endonukleasen *BamH I* und *Sal I* kontrolliert. Entsprechend dem erzeugten Konstrukt den Erwartungen, wurden Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* mit 1 µg des rekombinanten Vektors, wie in *Kapitel 2.4.9 (Seite 55)* beschrieben, transformiert und die erhaltenen Klone durch PCR kontrolliert.

Bei den Klonen, bei denen diese Kontrolle den Nachweis eines rekombinanten Plasmides im Organismus erbrachte, wurde die Synthese des Fusionsproteins indu-

ziert (siehe Kapitel 2.5.4, Seite 82). Der Erfolg der Induktion wurde mit Hilfe von SDS-PAGE überprüft. Die Tabelle 2.16 (Seite 35) zeigt die im Rahmen dieser Klonierung erzeugten rekombinanten Organismen für das Methionin- (*pL63-9*) bzw. das Threonintragende *sor*-Gen (*pL58-1*) aus *Ginkgo biloba*.

Das durch den nicht rekombinanten *pQE₃₀Y*-Vektor (siehe Kapitel 7.2.2, Seite 152) kodierte *His₆*-Oligopeptid besitzt eine Größe von ca 0,8 kDa. Die anhand des ORF berechnete Größe des *Sor*-Proteins aus *Ginkgo biloba* beträgt 33 kDa. Nach der Induktion der *His₆-sor*-rekombinanten Hefe sollte diese ein Fusionsprotein von ca. 34 kDa Größe synthetisieren.

3.3.2.3 Expressionsergebnisse

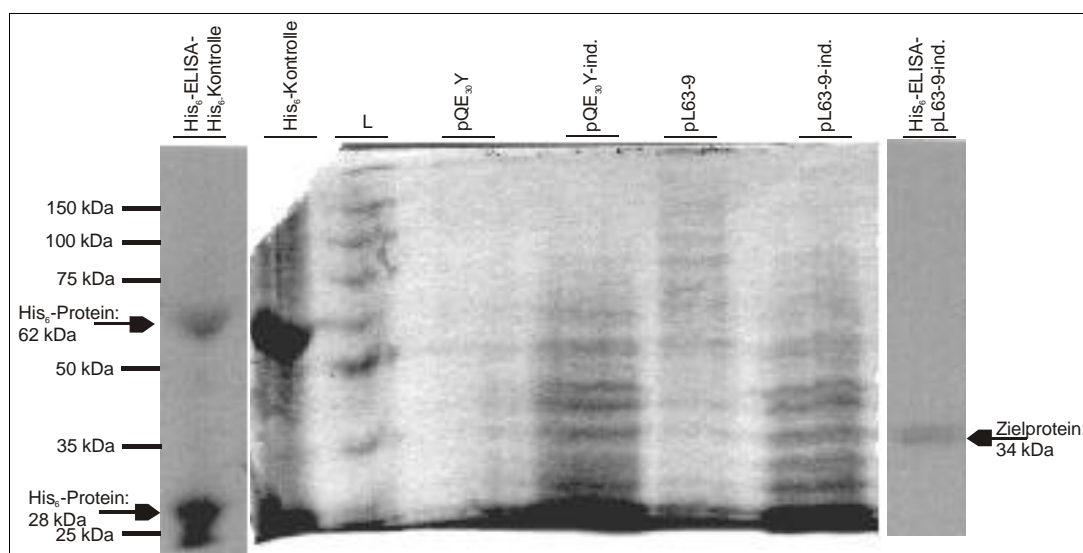


Abbildung 3.12 SDS-PAGE der Induktionskontrolle.

His₆-ELISA-His₆-Kontrolle: His₆-ELISA der Kontrollproteine; *His₆-Kontrolle*: His₆-Fusionsproteine als Positivkontrolle für His₆-ELISA (Molekulargewicht 62 kDa, 28 kDa); die rekombinante Hefestämme trugen folgende Plasmide: *pQE₃₀Y* (Kontrollvektor *pQE₃₀Y*, nicht induziert), *pQE₃₀Y-ind.* (Kontrollvektor *pQE₃₀Y*, induziert), *pL63-9* (*pQE₃₀Y-sorGBMeth*, nicht induziert), *pL63-9-ind.* (*pQE₃₀Y-sorGBMeth*, induziert); *His₆-ELISA-pL63-9-ind.*: Nachweis eines His₆-Fusionsproteins im Rohextrakt von *pL63-9-ind.*; die Eigenschaften der Vektoren sind in den Tabellen 2.6, 2.16 (Seiten 19, 35) dargestellt.

Für jedes der beiden in den *pQE₃₀Y*-Vektor klonierten Gene konnten erfolgreich rekombinante Organismen des Stammes *Saccharomyces cerevisiae* (vgl. Tabelle 2.16, Seite 35) erzeugt werden. Für das Methionin-tragende Gen aus *Ginkgo biloba* wurde exemplarisch die Expression als His₆-Fusionsprotein durch ELISA mit einem Penta-His-Antikörper gezeigt. Zur Induktion der Synthese des Fusionsproteins wurde, wie in

Kapitel 2.5.4 (Seite 82) beschrieben, verfahren. Nach der Induktion ist nur im Rohextrakt des Hefestammes, der ein rekombinantes Plasmid trägt, die Bildung eines Oligohistidinmarkierten Proteins nachweisbar (siehe *Abbildung 3.12, Seite 106*). Die Detektion des His₆-Fusionsanteils erfolgte durch einen Enzym-gekoppelten ELISA mit einem Penta-HisTM-Maus-Antikörper nach Western-Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran (vgl. *Kapitel 2.5.5, Seite 83*).

Da das detektierte Protein die errechnete Größe von 34 kDa besitzt, wird davon ausgegangen, daß es sich um das vektorkodierte *His₆-Sor*-Fusionsprotein handelt. Eine Reinigung des Proteins an einer Nickel oder Kobalt-Matrix steht noch aus.

3.4 Komplementierungsversuche mit *Cercospora nicotianae*

Ehrenshaft et al. (1999) wiesen durch Versuche mit *sor*-Mutanten des Ascomyceten *Cercospora nicotianae* nach, daß dieses Gen an der Biosynthese des Vitamin B₆ beteiligt ist. Eine Vitamin B₆-defiziente *sor*-Mutante konnte erfolgreich durch Transformation mit dem Organismus-eigenen Gen komplementiert werden. Die transformierte Mutante war im Gegensatz zur untransformierten in der Lage, auf Pyridoxin-freiem Medium zu wachsen; sie produzierte Vitamin B₆.

Dieses Komplementierungssystem bietet sich an, um die *sor*-homologen Gene unbekannter Funktion anderer Organismen dadurch zu untersuchen, daß man das Wachstum eines Wildtyp-Stammes mit dem eines mutierten Stammes vergleicht, der ein homologes Fremdgen trägt. Kürzlich konnte ein *sor*-homologes Gen aus *Phaseolus vulgaris* (*pdx1*) von Dr. Cindy Pidgeon kloniert werden (persönliche Mitteilung). Die Komplementierung eines *sor*-defizienten *Cercospora nicotianae*-Stammes mit diesem konnte die Vitamin B₆-Auxotrophie des Organismus kompensieren (persönliche Mitteilung von Dr. Marilyn Ehrenshaft). Dieser Versuch bestätigte die vermutete Funktion des *sor*-homologen Gens aus *Phaseolus vulgaris*.

3.4.1 Komplementierung von *sor*-defizienten *Cercospora nicotianae*-Mutanten mit dem *sor*-homologen Gen aus *Ginkgo biloba*

In gleicher Weise sollte die Funktion des aus *Ginkgo biloba* klonierten *sor*-homologen ORF charakterisiert werden. Durch die Transformation eines im *sor*-Gen mutierten *Cercospora nicotianae*-Stammes mit dem das *Ginkgo*-Gen tragenden Plasmid

pBargpe1 (Pall et al.) sollte die Vitamin B₆-Synthese-Aktivität der Mutante wiederhergestellt werden. Die transformierte Mutante sollte – im Gegensatz zur untransformierten – auf Pyridoxin-freiem Medium wachsen können.

3.4.1.1 Klonierungsstrategie

Zu diesem Zweck wurden der ORF aus den Klonierungsvektoren (pL5-1/2 [*sorGbf-aa129Thr*] und pL6-1 [*sorGBfl-aa129Met*], vgl. Tabelle 2.5, Seite 19) durch Hydrolyse mit den Endonukleasen *BamH I* und *Sal I* herausgeschnitten und in den mit *BamH I* und *Xho I* geöffneten Vektor *pBargpe1* ligiert. Die Abbildung 3.13 zeigt die Klonierungsstrategie (zur Karte des Plasmide siehe Kapitel 7.2.2, Seite 152):

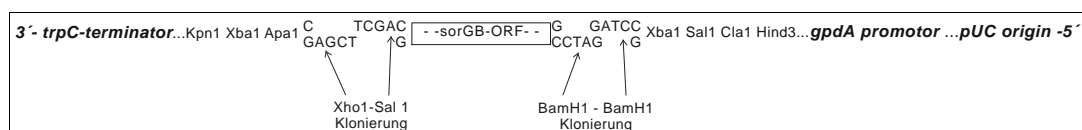


Abbildung 3.13 Klonierungsstrategie der Komplementierungskonstrukte

Der mit den Endonukleasen *BamH I* und *Sal I* vorbereitete *sor*-ORF aus *Ginkgo biloba* wurde in den mit *BamH I* und *Xho I* vorbereiteten Vektor *pBargpe1* ligiert.

Da der Komplementierungsvektor einen pUC-Origin besaß, konnte das rekombinante Plasmid in *Escherichia coli* vermehrt werden. Das vermehrte und gereinigte Plasmid stand dann zur Transformation in die *Cercospora nicotianae*-Zellen zur Verfügung. Die Transformation verlief nur dann erfolgreich, wenn das Plasmid in ausreichender Reinheit vorlag. Diese konnte nur mit dem *Wizard Plus® Plasmid Isolierungssystem* der Firma Promega (siehe Kapitel 7.3.2, Seite 153 und Herstellerinformationen auf der CD unter *VitPromega*) erreicht werden.

Die Transformation der Pilzzellen mit dem Plasmid und der Test der rekombinanten *C. nicotianae*-Klone wurde von Dr. Marilyn Ehrenshaft, NY, USA, durchgeführt.

3.4.1.2 Ergebnisse der Komplementierungsversuche (Dr. M. Ehrenshaft, Persönliche Mitteilung)

Zur Komplementierung wurde ein *sor*-defizienter Stamm von *Cercospora nicotianae* mit den rekombinanten *pBargpe1*-Vektoren transformiert. Die erhaltenen Klone wurden auf Minimal-Medium transferiert, auf dem der Wildtyp-Stamm wächst. Keine der Transformanten wuchs auf diesem Medium.

Daraufhin wurden diese Klone auf Minimalmedium transferiert, das Pyridoxin in den Konzentrationen 1 ng /ml und 10 ng/ml enthielt. Keiner der Transformanten wuchs besser als eine gleichzeitig getestete Mutante, die nur den Kontrollvektor (pBargpe1 ohne Fremdgen) trug.

Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß das *sor*-homologe Gen aus *Ginkgo biloba* das mutierte Gen des Wirtsstammes nicht ersetzen kann.

4 DISKUSSION

4.1 Überlegungen zur Biosynthese von Vitamin B₆ in *Ginkgo biloba*

4.1.1 Die Gene der *sor* (*pdx1*)- und *sno* (*pdx2*)-Familie

Nachdem *Ehrenshaft* (1999) durch Versuche mit *sor*-Mutanten nachweisen konnte, daß das durch *sor1*(*pdx1*) kodierte Protein an der Biosynthese der Vitamere der B₆-Gruppe in *Cercospora nicotianae* beteiligt ist (vgl. *Kapitel 1.4, Seite 11*), konnte für eine Vielzahl der bis dahin bekannten Gene homologer Sequenz anderer Organismen ebenfalls eine solche Funktion postuliert werden. Während im Genom der meisten Organismen nur ein einzelnes *sor*-homologes Gene gefunden wurde, konnten in *Saccharomyces cerevisiae* drei Isogene identifiziert werden (*snz1*, *snz2*, *snz3*). Sequenzvergleiche mit konservierten Aminosäuremotiven bekannter Funktion haben bis dato nur eine phosphatbindende Domäne in den Sequenzen der *Sor*-Proteinfamilie (Pfam01680) erkennen lassen. Zahlreiche Berichte deuteten desweiteren darauf hin, daß das Protein in verschiedenen Mikroorganismen entweder während der stationären Wachstumsphase (z. B. *Saccharomyces cerevisiae* [Padilla et al., 1998]) oder nach Stressinduktion (z. B. *Hevea brasiliensis* [Sivasubramaniam et al., 1995], *Aspergillus nidulans* [Osmani et al., 1999], *Cercospora nicotianae* [Ehrenshaft et al., 1998]) exprimiert wird. Das Protein sollte folglich in einem Biosyntheseweg mitwirken, dessen Produkt der Zelle in solchen Situationen dienlich ist. *Bilski et al.* (2000) konnten zeigen, daß Pyridoxin in *Cercospora nicotianae* als effektives Antioxidans bei Singulett-Sauerstoff-Streß des Pilzes wirkt, der durch Cercosporin unter Einwirkung von UV-Strahlung gebildet wird (vgl. *Kapitel 1.4, Seite 11*).

Wenig später wurde in vielen Mikroorganismen und später auch in der Pflanze *Arabidopsis thaliana* ein zweites Gen (*sno*, später zu *pdx2* umbenannt) entdeckt, dessen Aminosäuresequenz ebenfalls hoch konserviert ist und das mit dem Gen der *sor*-Familie coreguliert wird. *Padilla et al.* (1998) und *Galperin et al.* (1997) lokalisierten dieses Gen in zahlreichen Organismen immer in unmittelbarer Nähe des *sor/pdx1*-Gens. Analog zu den drei Isogenen mit *sor*-homologer Sequenz existieren in *Saccharomyces cerevisiae* auch drei *sno*-Isogene (*sno1*, *sno2*, *sno3*). Jeweils in einer Paarung aus *sor* und *sno*-Gen liegen sie auf unterschiedlichen Chromosomen. Wie aufgrund der genetischen Struktur von Eukaryonten und Prokaryonten zu erwarten ist, wird in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* jedes der beiden benachbarten liegenden Gene

von seinem eigenen Promotor reguliert; in Bakterien (*B. subtilis*, *H. influenzae*, *M. leprae*) liegen beide Gene unter der Kontrolle eines einzigen Promotors in einem Operon. In solchen Spezies, die die Biosynthesegene *pdxA* und *pdxJ* tragen, kommen *sno(pdx2)* genauso wie *sor(pdx1)* nicht vor (vgl. *Tabelle 7.1, Seite 149*).

Aufgrund seiner Homologie zur Genfamilie *yaadE*, einem entsprechenden Gen der Purin-/Histidin-Biosynthese mit einer Pyridoxalphosphat-unabhängigen Glutamin-Amidotransferase-Aktivität, wurde für das Genprodukt von *sno* ebenfalls eine solche Aktivität postuliert. Diese nur auf Sequenzvergleichen basierende Vermutung wurde durch Ergebnisse von *Tanaka et al. (2000)* und *Tazuya et al. (1995)* gestützt. Sie unterschieden anhand von Fütterungsexperimenten mit ^{15}N -markierten Aminogruppen-Donatoren Transaminierungs- und Transamidierungsreaktionen in der Pyridoxin-Biosynthese verschiedener Organismen. So zeigten sie, daß solche Organismen, die Gene der *pdxA/pdxJ*-Familie tragen (*Escherichia coli*, *Escherichia aerogenes*, *Pseudomonas putida*), den schweren Stickstoff ausschließlich aus [α -Amino- ^{15}N]-L-Glutaminsäure in das Pyridingerüst des Pyridoxins einbauen; der schwere Stickstoff aus [Amido- ^{15}N]-L-Glutamin wurde nicht in das Molekül inkorporiert. Aufgrund des Wissens um die Pyridoxalphosphat-abhängige Aminotransferase *PdxC/SerC* in der Vitamin B₆-Biosynthese von *Escherichia coli* war dieses Ergebnis zu erwarten. Umgekehrt jedoch konnten diese Forscher bei Organismen, die die Gene der *snz/sno*-Familien tragen, nur den Einbau von schwerem Stickstoff aus [Amido- ^{15}N]-L-Glutamin in das Pyridoxin detektieren (bei *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*). Da der Amido-Stickstoff des L-Glutamins nur durch Transamidierungs-Reaktionen übertragen wird, die nicht Pyridoxalphosphat-abhängig sind, folgerten Tanaka und Tazuya, einen noch unbekanntem Weg des Einbaus des Stickstoffs in das Vitamin und damit der Vitamin B₆-Biosynthese gefunden zu haben.

Aufgrund der engen Verbindung der *sor*- und der *sno*-Gene durch ihre zusammenhängende Lokalisation im Genom der Organismen und die Koregulation ihrer Expression muß die Frage gestellt werden, inwieweit auch die durch diese Gene kodierten Proteine funktionell interagieren. In diesem Zusammenhang muß beachtet werden, daß erste Ergebnisse mit dem rekombinant exprimierten Fusionsprotein *MalE-Sor* aus *Ginkgo biloba* im zellfreien System nach *Fiehe (1999)* keine Steigerung der MPN-Produktion erkennen ließen (vgl. *Kapitel 4.3, Seite 116*). Die Ursache hierfür kann sein, daß die Zugabe von nur einem der beiden natürlicherweise koexprimierten Proteine zu diesem System allein keinen steigernden Effekt bewirken kann, wenn ein Protein einen zweiten funktionellen Partner benötigt (vgl. *Kapitel 4.3, Seite 116*). Diese ersten Beobachtungen werden gestützt durch Versuche von *Padilla et al. (1998)* an einem Zwei-Hybrid-System mit den paralogen Genen aus *Saccharomyces cerevisiae*. Mit diesem System konnte er die Interaktion eines *Snz1*-Proteins der Hefe sowohl mit ei-

nem zweiten *Snz1*- als auch mit einem *Sno1*-Protein nachweisen. Für die Interaktion von *Snz1*- mit dem *Snz2*-Protein – einen Isoenzym des *Snz1* - fand sich keine Evidenz. Padilla und Mitarbeiter schließen aus diesen Ergebnissen, daß die beiden Proteine als Enzymkomplex in Form von Heterooligomeren in der Zelle vorliegen. Ferner gehen sie davon aus, daß aufgrund dieser physikalischen Interaktion, der benachbarten Lage der Gene im Genom der Hefe und ihrer gemeinsamen Regulation beide Proteine in dem gleichen Biosyntheseweg involviert sind. Für die Produktion des Ginkgotoxins im zellfreien System nach *Fiehe (1999)* mit Zusatz von rekombinant exprimierten Proteinen lassen sich unter Einbeziehung dieser Hypothesen die in *Kapitel 4.3 (Seite 116)* dokumentierten Schlußfolgerungen ziehen.

4.1.2 Evidenzen für zwei unabhängige Biosynthesewege des Vitamin B₆ in der Natur

Der in *Escherichia coli* erforschte Biosyntheseweg der B₆-Vitamere auf der Grundlage der *pdx*-Gene wurde zunächst als allgemeingültig angesehen. Durch die neuen Erkenntnisse, die durch die Gene der *sor/pdx1*- und *sno/pdx2*-Familien gewonnen wurden sowie durch die zunehmende Aufklärung der Genome vieler Organismen und deren Vergleich miteinander, stellte sich die Frage, ob noch ein zweiter, „alternativer“ Biosyntheseweg für die B₆-Vitamere in der Natur existiert (vgl. *Kapitel 4.1.1, Seite 111*).

In diesem Zusammenhang stellte *Mittenhuber (2001)* umfangreiche Untersuchungen zum Vorkommen und zur Sequenzhomologie der bisher bekannten Biosynthesegene – sowohl der klassischen *pdx*-Gene als auch der neu entdeckten *sor/sno*-Gene – an. Entgegen den bisherigen Vermutungen sind die aus der Biosynthese von *Escherichia coli* gut bekannten Gene der Familien *pdxA* und *pdxJ* in allen Phyla wenig verbreitet (vgl. *Tabelle 7.1, Seite 149*). Ihr Vorkommen beschränkt sich nach heutigem Kenntnisstand auf gramnegative Bakterien – wahrscheinlich vornehmlich auf fakultativ anaerobe Bakterien sowie aerobe Kokken und Stäbchen („Proteobakterien“). Im Gegensatz dazu sind Homologe der Genfamilien *sor/pdx1* und *sno/pdx2* viel weiter verbreitet als zunächst angenommen. Sie lassen sich in Organismen aus allen drei Domänen des Lebens nachweisen: in Archaeobakterien, in Eubakterien und in Eukaryonten. Desweiteren sind auch Organismen identifiziert worden, denen Homologe beider Gengruppen fehlen. Diese Spezies sollten nicht zur Vitamin B₆-Biosynthese befähigt sein. Genauso sind Organismen bekannt, die sowohl *sor/sno*-homologe als auch *pdxA*-homologe Sequenzen tragen (jedoch nicht *pdxJ*): *Bacillus stearothermophilus* und *Pseudomonas multocida*. Diese sollten gegebenenfalls in der Lage sein, beide Synthesewege zu vollziehen.

Es stellt sich die Frage, warum sich die Natur zwei voneinander unabhängige Synthesewege für den gleichen Stoff leistet. *Mittenhuber (2001)* gibt dazu Erläuterungen: Gramnegative Bakterien („Proteobakterien“, z. B. das Enterobakterium *Escherichia coli*) gehören entwicklungsgeschichtlich zu den jüngeren Organismen der Prokaryonten (*Gupta, 1998*). Von ihnen sind bisher nur sehr wenige bekannt, die *sor/sno*-Sequenzen im Genom tragen: nur *Pasteurella multocida*, *Haemophilus influenza*, *Haemophilus ducreyi* aus der Familie der *Pasteurellaceen*. Stützt man sich bei der Berechnung von Verwandtschaftsbeziehungen auf die durch rRNA-Analysen erhaltenen Daten und legt die von *Woese (1998)* und *Doolittle (1999)* vorgeschlagene Vernetzung der Spezies durch horizontalen und lateralen Genetransfer anstelle einer baumartigen Verzweigung zugrunde, ergibt sich folgendes Bild (nach *Mittenhuber, 2001*): Ein auf *Sor/Sno-basierender* Biosyntheseweg ist wahrscheinlich der zunächst allen Organismen eigene Biosyntheseweg gewesen. Im Laufe der Evolution wurden aus noch unbekanntem Gründen die *sor/sno*-Gene bei einigen Organismen aus der Abteilung der gramnegativen Bakterien deletiert und durch die Gene des *pdxA/pdxJ*-abhängigen Syntheseweges ersetzt. Allein in der Familie der *Pasteurellaceen* sind sie in wenigen Arten erhalten geblieben (s.o.).

Unter diesem Blickwinkel kann auch die unterschiedliche Regulation beider Vitamin B₆-Biosynthesewege neu bewertet werden: Die *sor/sno*-Gene des *sor/sno*-abhängigen Biosyntheseweges sind steßinduzierbar (vgl. *Kapitel 4.1.1, Seite 111*); ganz anders hingegen die Gene *pdxA* und *pdxJ* im *de novo*-Syntheseweg von *Escherichia coli*. Im Genom dieses „modernen“ Bakteriums (*Mittenhuber, 2001*) liegen beide Gene in komplexen Operons mit einer Vielzahl anderer Gene vor, die in fundamentale Zellprozesse involviert sind. Die Biosynthese des Vitamin B₆ ist dadurch an das Zellwachstum gekoppelt.

Der in *Escherichia coli* bekannte *de novo*-Syntheseweg enthält ein Paradoxon: Für die Synthese der Aminosäure 4-Hydroxy-L-Threonin benötigt der Organismus eine Transaminierungsreaktion. Diese wird katalysiert durch eine Pyridoxalphosphat-abhängige Transaminase *SerC* (vgl. *Kapitel 1.2, Seite 3* und *Abbildung 1.3, Seite 5*). Das Vitamin ist somit an seiner eigenen Biosynthese beteiligt. *Mittenhuber (2001)* vermutet daher, daß vor der Einführung des Biosyntheseweges in den Stoffwechsel des Bakteriums das Vitamin bereits vorhanden gewesen sein muß. Diese Annahme scheint für die Gruppe der Enterobakterien nachvollziehbar, leben sie doch im Entium in einem Milieu, dem ständig neue Stoffwechselkomponenten durch Nahrungsaufnahme zugeführt werden - auch Vitamine. Dieser Umstand macht die speziesspezifische Biosynthese - zunächst kodiert durch *sor/sno* Gene - überflüssig. Aufgrund mangelnden Selektionsdrucks könnte dieser ursprünglich vorhandene Stoffwechselweg im Laufe der Evolution verloren gegangen sein. Die Fähigkeit zur Biosynthese auf dem bekannten Weg könnte der Organismus unter sich später ändernden äußeren Einflüssen durch erneu-

ten Selektionsdruck hinzugewonnen haben. Die Tatsache, daß obligat parasitisch lebende Organismen (*Rickettsia*, *Mycoplasma*, *Borrelia* [Ehrenshaft et al., 1999], vgl. auch *Abbildung 7.1*, *Seite 149*) weder Homologe der einen noch der anderen Sequenzfamilie tragen, könnte ein weiterer Hinweis auf die Entstehung des *de novo*-Biosyntheseweges sein: Durch die Bindung an ihren Wirt könnte ein erneuter Selektionsdruck ausgeblieben sein, was sich im Fehlen *pdxA/pdxJ*-homologer Sequenzen im Genom dieser Organismen äußert (Ehrenshaft et al., 1999, und Mittenhuber, 2001).

4.2 Sor-homologe Sequenz aus *Ginkgo biloba*

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, die Existenz einer *sor*-homologen DNA-Sequenz im Genom von *Ginkgo biloba* und die Expression des Gens in Zellsuspensionskulturen der Pflanze nachzuweisen. Die zugehörige cDNA kodiert für ein Protein von 309 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von 32.963 Dalton. Nicht abschließend geklärt werden konnte, ob eine aufgetretene Zweideutigkeit im für die Aminosäure Nr. 129 kodierenden Triplet der cDNA (kodierend für Methionin oder Threonin, siehe *Abbildung 3.7*, *Seite 99*) auf einen Fehler während der Reversen Transkription zurückzuführen ist oder ob die beiden nachgewiesenen Transkripte zwei Isogene repräsentieren. Um letztere Variante nicht auszuschließen, wurden bei der heterologen Expression sowohl in *Escherichia coli* als auch in *Saccharomyces cerevisiae* beide Gene jeweils getrennt exprimiert. Die erhaltenen Proteine können nun auf Ihre Aktivität in dem von Fiehe (1999) entwickelten zellfreien System getestet werden (vgl. auch *Kapitel 4.3.2*, *Seite 118*).

Das *sor(pdx1)*-homologe Gen aus *Ginkgo biloba* ist eines der ersten aus diesem Organismus klonierten Gene (vgl. Schepmann, 2001 und Matsuda, 2001). Dementsprechend zeigt sich das Wissen um die Regulation der Genexpression der Pflanze lückenhaft. Die geringen Mengen der von den Zellkulturen produzierten Vitamere und des Sekundärmetaboliten Ginkgotoxin (MPN, Arenz, 1996) lassen eine geringe Expression der beteiligten Biosynthesenzyme vermuten. Zum Nachweis der Transkription des Gens wurde mRNA aus Zellkulturen kurz vor dem Auftreten maximaler MPN-Konzentrationen im Kulturmedium isoliert - also zu einem Zeitpunkt, zu dem eine maximale Anzahl von Transkripten erwartet werden konnte. Dennoch war nur ein äußerst schwaches Signal bei dem Nachweis der *sor*-homologen mRNA durch die Northern-Analyse und die RACE-PCR zu detektieren. Obwohl diese Beobachtungen keine exakte Quantifizierung der Genexpression zulassen, so korrelieren sie zumindest mit den anhand der Ginkgotoxin-Produktion der Zellkulturen aufgestellten Vermutungen.

Eine andere Ebene der Expressionskontrolle eines Gens ist die Kontrolle der Proteinsynthese, d. h. der Translation. Die Initiation der Translation ist ein komplizierter Mechanismus, der bei Prokaryonten einfacher verläuft als bei Eukaryonten. Neben den Untereinheiten des Ribosomens und einiger Initiationsfaktoren (IF1-3) ist eine von *Shine und Dalgarno (1975)* gefundene konservierte Basenfolge in bakterieller RNA von zentraler Bedeutung, die komplementär zu einem bestimmten Bereich der tRNA der Startaminosäure (Formyl-Methionin: fMet) ist. Diese nach den Entdeckern benannte, purinbasenreiche Shine-Dalgarno-Sequenz ermöglicht das Anlagern der tRNA_{fMet} an den Translationskomplex. Die Basenfolge (AGG A/TGG, oder modifiziert) liegt im Bereich von 3-10 Basen vor dem ATG-Transkriptionsstartcodon. Im Gegensatz dazu fand *Kozak (1987, 1991)* in der mRNA von Eukaryonten an ähnlicher Position eine andere konservierte Region: CC A/G CC ...ATG G. Sie stellte fest, daß zwei Purinbasen in einem bestimmten Abstand um das ATG-Triplett herum für eine effektive Translation benötigt werden: ein A oder G eingerahmt von Doppel-C vor dem Start-ATG und ein G, das direkt auf das Start-ATG folgt.

Die *Abbildung 7.2 (Seite 144)* zeigt das 5'-Ende der aus *Ginkgo biloba* klonierten *sor*-homologen cDNA. Im Bereich um den Translationsstart (Base 207-209) sind die nach Shine-Dalgarno und Kozak benannten Nukleotide gekennzeichnet. Bemerkenswerterweise findet sich weder exakt das eine noch das andere Motiv in dieser cDNA wieder. Die Basensequenz vor dem Startcodon ähnelt der für *Escherichia coli* erwarteten Shine-Dalgarno Sequenz (AAGGTGG). Andererseits besitzt die cDNA das für die effiziente eukaryontische Translation wichtige Guanin nach dem ATG (...ATG GCC ...). Es scheint eine gemischte Initiationssequenz vorzuliegen. Da jedoch umfangreiche Daten zur eukaryontischen Translationskontrolle fehlen, können zunächst keine weiteren Schlüsse gezogen werden.

4.3 Funktionsnachweis des Sor-Proteins: Zellfreies System nach Fiehe (1999) und Komplementierungsversuche mit *Cercospora nicotianae*

Um Informationen über die Funktion des durch die *sor*-homologe cDNA aus *Ginkgo biloba* kodierten Proteins zu erhalten, wurde zwei unterschiedliche Ansätze gewählt. Durch Komplementation von *sor*⁻-Mutanten von *Cercospora nicotianae* mit der *Ginkgo-sor*-DNA wurde ein Ansatz auf genetischer Ebene gewählt. Durch das Verwenden des rekombinant exprimierten Sor-Proteins im zellfreien System nach *Fiehe (1999)* stand ein Nachweissystem auf Proteinebene zur Verfügung.

4.3.1 Komplementation von *Cercospora nicotianae*-Mutanten

Ehrenschaft (1999) war es gelungen, *sor*⁻Mutanten des Pilzes zu erzeugen, die Pyridoxin-abhängig wachsen. Diese Auxotrophie ließ sich durch die Transformation mit dem organismeneigenen Gen sowie mit dem *sor*-homologen Gen aus *Phaseolus vulgaris* komplementieren (Dr. C. Pidgeon, persönliche Mitteilung). In einer analog zu dieser Komplementation geplanten Versuchsreihe sollte die *sor*⁻Mutante mit dem aus *Ginkgo biloba* klonierten *sor*-homologen Gen in geeigneter Weise transformiert werden. Das *Ginkgo*-Gen sollte in der Lage sein, die Mutation zu ersetzen und eine Pyridoxin-Prototrophie des Organismus herzustellen (vgl. Kapitel 3.4, Seite 107).

Nach der Transformation der *Cercospora*-Mutante mit dem *Ginkgo*-Gen konnte wider Erwarten keine Pyridoxin-Prototrophie erzeugt werden. Die erhaltenen Klone wuchsen nicht besser, als die entsprechenden Kontrollen ohne Gen (siehe Kapitel 3.4, Seite 107). Aufgrund dieser Ergebnisse muß festgestellt werden, daß das *sor*-homologe *Ginkgo*-Gen möglicherweise das *Cercospora*-eigene, mutierte Gen nicht ersetzen kann. Obwohl Ehrenschaft die Beteiligung des *sor1(pdx1)*-Gen an der Vitamin-B₆-Biosynthese in *Cercospora nicotianae* nachweisen konnte, läßt sich daraus nicht schlußfolgern, daß das durch unsere *Ginkgo*-Sequenz kodierte Protein nicht in die Vitamin B₆-Biosynthese in *Ginkgo biloba* involviert ist.

Denn für die negativen Ergebnisse dieses Komplementationsexperimentes lassen sich mehrere Gründe in Betracht ziehen: Eine Assoziation des rekombinanten *Ginkgo-Sor*-Gens mit einem weiteren an der Biosynthese beteiligten Gen (*Sno*) könnte nicht möglich sein. Padilla et al. (1998) konnten in Hefe nachweisen, daß das *Snz1*-Protein (eines von drei Isoenzymen [*Snz1*, *Snz2*, *Snz3*] in *Saccharomyces cerevisiae*) mit dem *Sno*-Protein assoziiert vorliegt. Wird durch mangelnde Affinität des heterologen *Ginkgo*-Proteins zum *Sno*-Protein von *Cercospora nicotianae* eine solche essentielle Assoziation verhindert, muß davon ausgegangen werden, daß es nicht zur Pyridoxin-Biosynthese kommt. Phänotypisch könnte sich das in einer Pyridoxin-Auxotrophie äußern.

Aufgrund der großen Homologie der *Sor*-homologen Protein-Sequenzen von *Cercospora nicotianae*, *Phaseolus vulgaris* und *Ginkgo biloba* und aufgrund des bereits erfolgreich durchgeführten Komplementationsversuches des mutierten *Cercospora*-Gens mit dem homologen Gen aus *Phaseolus vulgaris* sollte man davon ausgehen, daß die Proteine untereinander austauschbar sind (siehe Proteinvergleich [Abbildung 3.7, Seite 99 und Tabelle 3.2, Seite 100]). Vergleicht man jedoch den Codongebrauch der drei Organismen einerseits für alle aus der Spezies bekannten Leserahmen und andererseits speziell für die *sor*-homologen Sequenzen (siehe Abbildung 7.2, Seite 144), zeigen sich einige Unterschiede: *Ginkgo biloba* benutzt zur Kodierung einiger Aminosäuren (z. B. Argenin, Glycin, Lysin) die zur Verfügung stehenden Triplets

in anderer Häufigkeit als *Cercospora nicotianae* - dieser Unterschied tritt seltener beim Vergleich von *Phaseolus vulgaris* mit *Cercospora nicotianae* auf. Der unterschiedliche Gebrauch der Codons kann nach der Transformation des Pilzes mit einer heterologen DNA-Sequenz zu Problemen bei der Translation der mRNA führen, die in einer unvollständigen Proteinbiosynthese und damit in der Bildung eines Fehlproteins resultieren. Ein solches biosynthetisch nicht aktives Protein könnte sich phänotypisch in einer mangelnden Pyrrodoxin-Prototrophie des Organismus äußern.

Unabhängig von dieser Problematik muß ferner berücksichtigt werden, daß die eingeführte Fremd-DNA in der Pilzzelle einer Restriktion unterliegen kann, die die Nucleinsäure zerstört und auf diese Weise die Expression verhindert. Es konnte weder festgestellt werden, ob die transformierte Sequenz in den erzeugten Klonen erhalten bleibt noch ob es zur Synthese des für die Vitamin B₆-Bildung nötigen *Sor*-Proteins kommt. Somit läßt sich kein endgültiger Grund für das Versagen des Komplementationstestes mit dem *sor*-homologen Gen aus *Ginkgo biloba* benennen.

4.3.2 Zellfreies System nach Fiehe (1999)

Das sowohl in *Escherichia coli* als auch in *Saccharomyces cerevisiae* heterolog exprimierte Protein soll in Enzyminkubationen des zellfreien Systems zur Produktion von Ginkgotoxin nach Fiehe (1999) eingesetzt werden. Überprüft werden soll, ob das Protein einen Einfluß auf die Biosynthese der B₆-Vitamine hat, was sich in einer erhöhten Bildung des Ginkgotoxins äußern sollte. Erste Versuche mit dem Zusatz des im prokaryontischen Wirt exprimierten Proteins (Fusionsprotein *MalE-Sor*) lassen keine signifikante Steigerung der MPN-Produktion erkennen. Endgültige Ergebnisse werden von Versuche erwartet, die derzeit in der Arbeitsgruppe durchführt werden.

Bewirkt das rekombinante Protein, anders als erwartet, keinen steigernden Einfluß auf die MPN-Produktion des zellfreien Systems, können mehrere Gründe dafür in Betracht kommen – die Annahme vorausgesetzt, das Protein besitzt die postulierte Aktivität:

Ähnlich dem Vitamin B₆-Biosyntheseweg in *Escherichia coli* sollte auch ein alternatives Syntheschema mehrschrittig zusammengesetzt sein. Aufgrund der Ergebnisse von Padilla et al. (1998) an verschiedenen Hefestämmen ist davon auszugehen, daß ein weiteres, mit dem *Sor*-Protein assoziiertes Protein (*Sno*; ein Protein, für das eine Amido-Transferase-Aktivität postuliert wird) direkt an der Synthesefolge beteiligt ist. Beide Proteine scheinen ein Heterodimer oder -Oligomer mit mehreren katalytischen Zentren (vgl. Kapitel 4.1.1, Seite 111) zu bilden. Überträgt man die von Padilla und Mitarbeitern an der Hefe gefundenen Daten auf die Pflanze *Ginkgo biloba* und auf das zellfreie Synthesystem nach Fiehe (1999), sollten auch dort beide Proteine in dem

für die Biosynthese optimalen Verhältnis assoziiert vorliegen. Das Zufügen eines einzelnen, rekombinant exprimierten Proteins sollte dann keine Auswirkungen auf die enzymatische Bildung des Zielproduktes Ginkgotoxin haben, weil das Partnerprotein zur Bildung der Heteromers nicht in der benötigten Menge zur Verfügung steht. Eine Steigerung der MPN-Syntheseleistung im zellfreien System ließe sich nur dann herbeiführen, wenn auch das *Sno*-Protein dem System zugesetzt wird (siehe auch *Kapitel 4.5, Seite 128*).

4.4 Welches Biosynthesystem benutzt *Ginkgo biloba*?

Zu Beginn der zu dieser Dissertation durchgeführten Arbeiten stellte sich die Frage, welchen Biosyntheseweg der Organismus *Ginkgo biloba* zur Bildung der Vitamere der B₆-Gruppe verwendet. *Arenz (1996)* und *Fiehe (1999)* konnten in Experimenten mit [U-¹³C₆]-D-Glucose an der Pflanze das gleiche Einbaumuster des Kohlenstoffisotops in das Vitamin nachweisen, das die Arbeitsgruppe von Spenser zuvor bei analogen Fütterungen mit *Escherichia coli* fand. Auch *Gupta et al. (2001)* erhielten für Pyridoxamin aus *Saccharomyces cerevisiae* dieses Muster (vgl. *Abbildung 1.5, Seite 9*). Diese Ergebnisse legten die Vermutung nahe, alle Organismen – auch die Pflanze *Ginkgo biloba* – betrieben die Vitamin B₆-Biosynthese auf die gleiche Weise wie das Bakterium *Escherichia coli*.

Mit der Entdeckung der Mevalonat-unabhängigen Terpenbiosynthese durch die Arbeitsgruppe von Rohmer (*Lois et. al., 1998*) trat die Pentose 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat als möglicher Precursor in den Mittelpunkt des Interesses. Dieser kann durch das Enzym Desoxy-D-xylulose-Synthase (*Dxs*) gebildet werden (vgl. *Abbildung 1.4, Seite 7*). Die Sequenz des zugrundeliegenden Gens *dxs* ist in Pflanzen und Mikroorganismen hochkonserviert. Auch in *Ginkgo biloba* konnte im Rahmen dieser Arbeit eine solchen Gensequenz nachgewiesen werden. Auf der Grundlage von Aminosäuresequenzvergleichen bekannter *Dxs*-Sequenzen wurden Oligonukleotide synthetisiert, die einen zentralen Bereich von 550 bp der Sequenz einschlossen. In einer PCR mit genomischer DNA aus *Ginkgo biloba* wurde ein DNA-Teilfragment des Gens erhalten, das hohe Homologie zu den bereits bekannten *dxs*-Sequenzen anderer Organismen aufwies (Daten nicht beschrieben). Es ist davon auszugehen, daß auch *Ginkgo biloba* eine Desoxy-D-xylulose-Synthase besitzt. Da der Organismus auch andere terpenoide Strukturen (z. B. Ginkgolide, Bilobalid) synthetisiert, ist es wahrscheinlich, daß das Gen an den Syntheseschritten dieser Verbindungen beteiligt ist. Anders als am bakteriellen System, in dem der Einbau von 1-Desoxy-D-xylulose-5-

phosphat in das Vitamin nachgewiesen wurde (Laber et al., 1999), konnte Fiehe (1999) diese Ergebnisse in der Pflanze *Ginkgo biloba* nicht bestätigen (vgl. Kapitel 1.4, Seite 11).

Weitere nicht veröffentlichte Ergebnisse untermauern dieses Bild. In Zusammenarbeit mit Frau S. Lohmann wurde das Genom von *Ginkgo biloba* nach homologen Sequenzen der *pdxB*-Familie durchsucht. Ähnlich wie bei der Suche nach der *dxs*-homologen Sequenz wurden auch hier, ausgehend von Proteinsequenzvergleichen bekannter *PdxB*-Proteine, Oligonukleotide für konservierte Regionen des Gens synthetisiert. Diese wurden in eine PCR mit genomischer DNA aus *Ginkgo biloba* eingesetzt. Es gelang nicht, ein DNA-Fragment zu polymerisieren. Da die Dehydrogenase *PdxB* in *Escherichia coli* einen Schritt in der Synthese der Pyridoxinvorstufe 4-Hydroxy-L-threonin-phosphat katalysiert, der nicht durch Enzyme anderer Stoffwechselwege übernommen wird, sollte auch in *Ginkgo biloba* ein Gen für dieses Protein existieren, wenn die Biosynthese auf dem aus *Escherichia coli* bekannten Wege verläuft. Aus dem negativen Ergebnis dieser Versuche kann nicht ohne weiteres geschlossen werden, *Ginkgo biloba* besitze keine *pdxB*-homologe Sequenz in seinem Genom. Es muß auch in Betracht gezogen werden, daß die PCR-Versuche in Folge einer Fehlpaarung der verwendeten Oligonukleotide ein falsch negatives Ergebnis lieferten. Die Wahrscheinlichkeit mit der dieses auftritt, läßt sich jedoch nicht quantifizieren. Zusammen mit den Beobachtungen von Fiehe (1999) an Zellkulturen von *Ginkgo biloba* und am zellfreien System runden diese Erkenntnisse das Bild ab. Die Pflanze *Ginkgo biloba* synthetisiert Vitamin B₆ aller Wahrscheinlichkeit nach auf einem anderen Weg als das Bakterium *Escherichia coli*. Desweiteren stellen 1-Desoxy-L-xylulose-phosphat und wahrscheinlich auch 4-Hydroxy-L-threonin in der Pflanze keine biosynthetischen Vorstufen des Vitamins dar.

Obwohl die Sequenzfamilie der *sor*-Gene schon seit einigen Jahren bekannt ist, konnten erst die Ergebnisse aus Versuchen an *Cercospora nicotianae* bei der Zuordnung der Genfunktion helfen (Ehrenshaft et al., 1999, 2000). Diese Ergebnisse sowie die an der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gefundenen Daten deckten die Existenz eines neuen, „alternativen“ Biosyntheseweges auf (vgl. Kapitel 4.1.2, Seite 113). Obwohl der Funktionsnachweis des aus der Pflanze *Ginkgo biloba* klonierten Gens noch aussteht, sollte davon ausgegangen werden, daß es die gleiche Funktion besitzt wie das homologe Gen aus *Cercospora nicotianae*. Da ein direkter Nachweis mittels Aktivitätstest aufgrund des mangelnden Wissens um die Substrate des Enzyms zur Zeit noch nicht möglich ist, muß dieser Nachweis indirekt erfolgen. Ansätze zu möglichen indirekten Nachweismethoden und deren Problematik werden in Kapitel 4.3 (Seite 116) diskutiert.

4.4.1 Hypothesen zur Vitamin B₆-Biosynthese in *Ginkgo biloba*

4.4.1.1 Ergebnisse verschiedener Tracer-Experimenten

Im Laufe der Biosyntheseforschung am Vitamin B₆ wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen (Spenser und Mitarbeiter, Tazuya und Mitarbeiter sowie Leistner und Mitarbeiter) Experimente mit isopenmarkierten Vorstufen mit dem Ziel durchgeführt, die Biochemie des Syntheseweges zu verstehen. In diesem Kapitel werden die aus den Experimenten an verschiedenen Organismen erhaltenen Markierungsergebnisse zusammengestellt. Spenser und Mitarbeiter führten umfangreiche Versuche am Bakterium *Escherichia coli* (Hill et al., 1996) durch. Sie zeigten, daß 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat und 4-Hydroxy-L-threonin die zentralen Vorstufen der Biosynthese des Pyridoxins dieses Bakteriums sind. Die Abbildungen 4.1 bis 4.3 (Seite 122 bis 124) zeigen die in *Escherichia coli* erhaltenen Positionsmarkierungen des Moleküls. Aufgrund identischer Einbauergebnisse mit [U-¹³C]-D-Glucose an *Escherichia coli* sowie *Saccharomyces cerevisiae* und *Ginkgo biloba* wurde zunächst von einer in allen drei Organismen gleichartigen Biosynthese ausgegangen. Untersuchungen von Gupta et al. (2001) zeigen jedoch signifikante Unterschiede der Positionsmarkierungen zwischen dem Bakterium und der Hefe (vgl. Abbildung 4.1 und 4.2). Zuvor hatte schon Fiehe (1999) anhand radioaktiv markierter 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphates zeigen können, daß diese Pentose in *Ginkgo biloba* nicht als Precursor des Pyridoxins dienen kann (siehe Abbildung 4.2, Seite 123). Gupta et al. (2001) schlagen vor, daß die nicht-desoxygenierte Pentose Xylose in der Hefe den „linken Molekülteil“ (Kohlenstoffatome 2', 2, 3, 4, 4') von Pyridoxamin bildet. Unklar ist jedoch, ob der Zucker vor dem Einbau modifiziert wird.

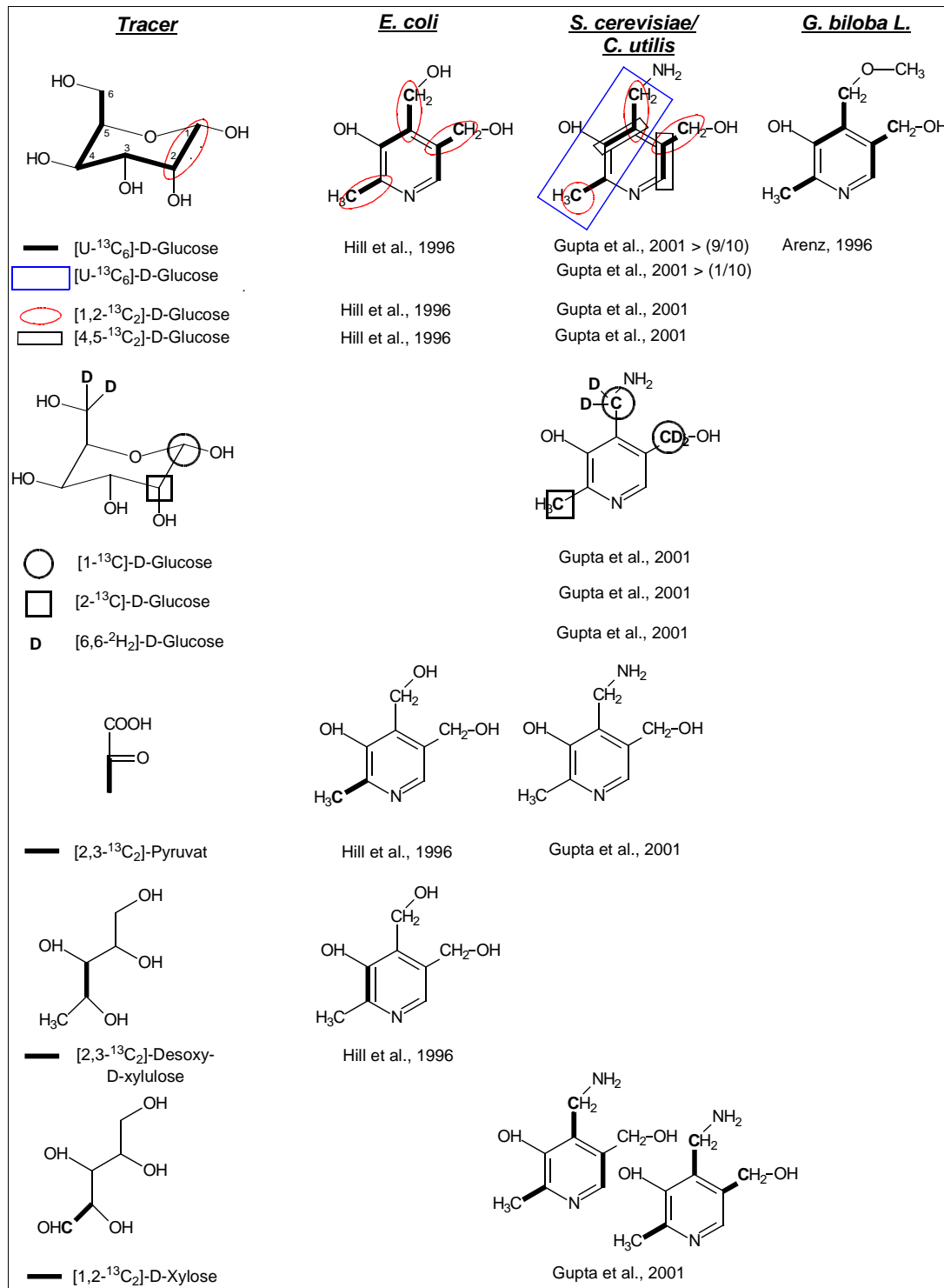


Abbildung 4.1 Ergebnisse der Tracer-Studien verschiedener Arbeitsgruppen an *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Ginkgo biloba* (Teil 1)

Ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen den Biosynthesewegen der Hefe

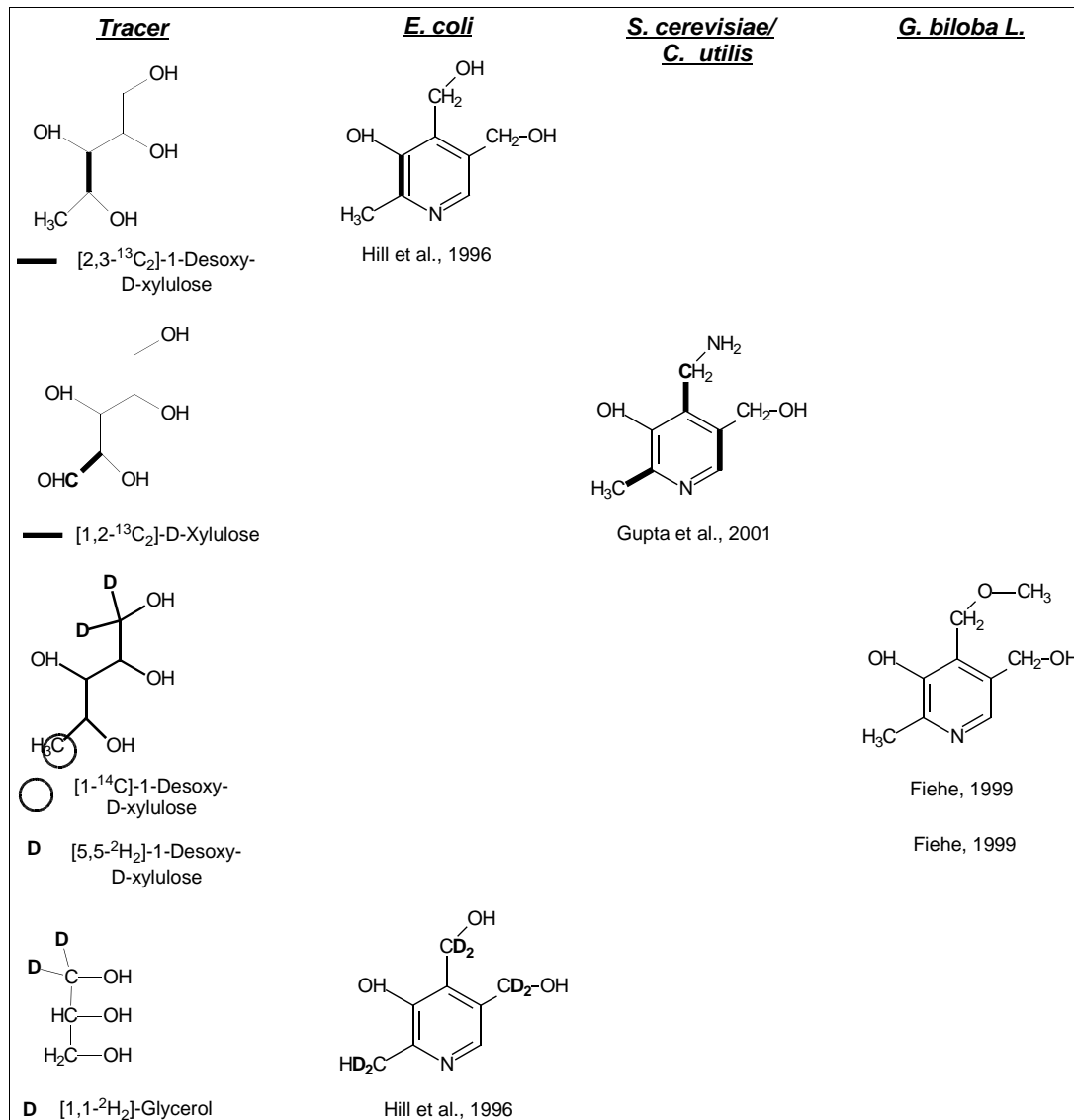


Abbildung 4.2 Ergebnisse der Tracer-Studien verschiedener Arbeitsgruppen an *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Ginkgo biloba* (Teil 2)

und des Bakteriums liegt in der Genese des Pyridin-Stickstoffs (vgl. *Abbildung 4.3*, Seite 124). *Tazuya et al. (1995)* konnten zeigen, daß die schon charakterisierte Transaminase *SerC* (*Drewke et al., 1996*) in *Escherichia coli* nur den α -Amino-Stickstoff des Glutamins in das Gerüst des Vitamins überträgt. Eine andere Situation liegt bei der Hefe vor. Durch eine Transamidierungsreaktion wird dort der Amido-Stickstoff des Glutamins übertragen. Diese Ergebnisse stimmen überein mit den aus den genetischen Experimenten erhaltenen Aussagen. Während in *Escherichia coli* *serC* für eine Transaminase kodiert, wird in Organismen mit alternativer Biosynthese, zu denen auch *Saccharomyces cerevisiae* gezählt werden muß, für das Genprodukt von *sno* eine Amidotransferase-Aktivität postuliert (*Ehrenshaft et al., 2001*).

Ausgehend von den in *Abbildungen 4.1 bis 4.3* zusammengefaßten Ergebnissen der Tracer-Studien sowie der Ergebnisse und Diskussionsansätze aus Molekularbiologischen Experimenten (vgl. *Kapitel 4.1 bis 4.3*) scheinen mehrere Biosynthesemodelle denkbar. Diese sollen in den *Kapitel 4.4.1.2 und 4.4.1.3 (Seite 125)* vorgestellt werden.

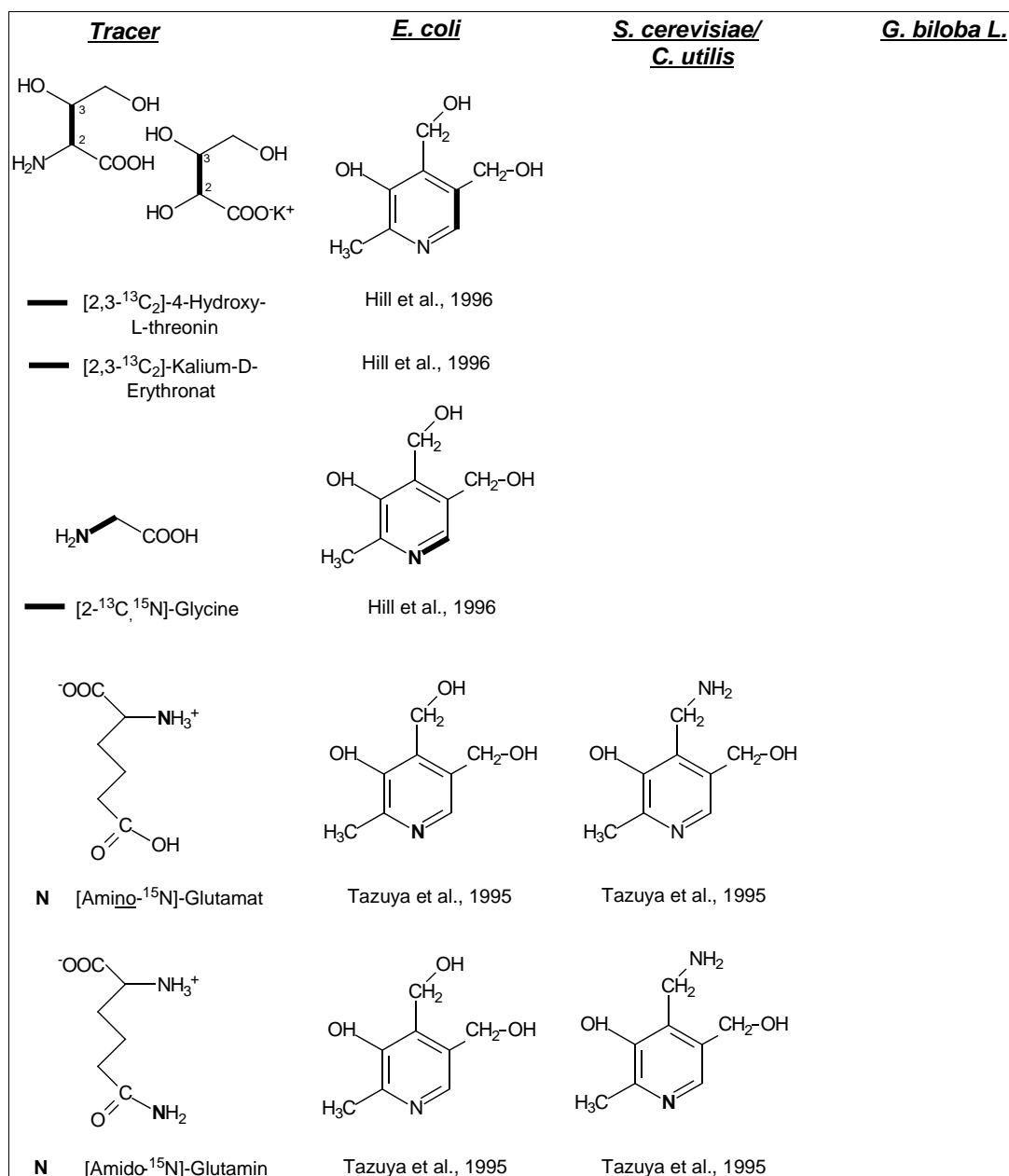


Abbildung 4.3 Ergebnisse der Tracer-Studien verschiedener Arbeitsgruppen an *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Ginkgo biloba* (Teil 3)

4.4.1.2 **ATP zum Molekülaufbau – Pyridoxin-Biosynthese analog der Histidin-Biosynthese**

Gupta et al. (2001) konnten den Einbau von $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ -Xylose in das Grundgerüst des Pyridoxamins nachweisen. Sie beschreiben ferner, daß das erste Produkt mit einer Pyridin-Grundstruktur in der Biosynthese daher ein 2-Hydroxy-Pyridin sein muß (*Zeidler et al., 2002*). *Fiehe (1999)* stellte bei Versuchen an einem zellfreien System aus *Ginkgo biloba* fest, daß unter Einfluß von ATP die Bildung von Ginkgotoxin gegenüber der ATP-freien Inkubation erhöht ist. Dieses Ergebnis läßt sich in zweierlei Hinsicht deuten: Zunächst könnte ATP verwendet werden, um einen im Verlauf der Biosynthese gebildeten Zucker zu phosphorylieren. Für die Verwendung von ATP als Phosphorylierungsreagenz spricht ebenfalls, daß der Zusatz von Hexokinase zum System die Ginkgotoxinbildung gegenüber dem alleinigen ATP-Einsatz steigert (persönliche Mitteilung von Herrn N. Mujahed).

Ebenso kann postuliert werden, daß ATP als Kohlenstoffquelle zum Aufbau des Pyridinringsystems des Vitamins fungiert. Ein der Biosynthese des Histidin analoger Mechanismus ist denkbar. Die Bildung dieser Aminosäure geht von der aktivierten Ribose 5-Phosphoribosyl- α -pyrophosphat (PRPP) und ATP aus (vgl. z. B. *Voet, 1995, Seite 777, Fig. 24-52*). Über eine neunschrittige Reaktionsfolge wird die Aminosäure geformt. Nach der Kondensation der beiden Startermoleküle erfolgt zunächst eine Spaltung der Guanin-Bindung der Adeninbase sowie die Ringöffnung der Ribose des PRPP zu einer substituierten Aminopentose. Durch eine Transamidierung wird ein Stickstoff in das Molekül eingeführt, bevor der Ringschluß zum Imidazolring erfolgt. Erst dann wird das spätere α -Kohlenstoffatom transaminiert sowie der benachbarte Kohlenstoff zur Säure oxidiert.

Um auf einen der Histidin-Biosynthese analogen Pyridoxin-Biosyntheseweg zu prüfen, könnte dem zellfreien System nach *Fiehe (1999)* $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ -ATP zugesetzt werden. Die aus dem gespaltenen Adenin des ATP stammende radioaktive Markierung müßte in das Pyridingerüst des Ginkgotoxins eingebaut werden. Erste Versuche mit $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ -ATP in diesem System konnten diese Hypothese nicht bestätigen (persönliche Mitteilung von Herrn N. Mujahed).

4.4.1.3 **Pentose oder Pentulose als Vorstufe – Pyridoxin-Biosynthese analog der Purinbiosynthese**

Ebenso ist die Biosynthese des Vitamin B₆ aufbauend auf einem Startermolekül in Analogie zur Biosynthese der Purine denkbar (vgl. *Abbildung 4.4, Seite 127*). Ausgehend von der aktivierten Ribose 5-Phosphoribosyl- α -pyrophosphat (PRPP) könnte eine durch *Sno* katalysierte Transamidierung am C-1-Kohlenstoffatom zum β -5-Phos-

phoribosylamin erfolgen. Diese Reaktion führt wie in der Purinsynthese zu einer Konformationsumkehr an diesem Kohlenstoffatom. Auf diesem Aminozucker wird das Kohlenstoffgerüst des Pyridoxins sequentiell aus einer Pentose bzw. Pentulose (vgl. *Gupta et al., 2001*, und *Zeidler et al., 2002*) und einer Triose aufgebaut. Die Reaktionsfolge des Ringaufbaus kann hypothetisch folgendermaßen formuliert werden: Zunächst kondensiert eine Pentulose oder Pentose, möglicherweise Xylulose (oder Xylulose-5-Phosphat) mit dem β -ständigen Amin des Aminozuckers unter Bildung eines Imins und formt die „linke“ Molekülhälfte des Vitamins. Im folgenden kommt es zusammen mit einer aktivierten Triose (z. B. Dihydroxyacetonphosphat oder Glycerinaldehyd-3-phosphat) zur Zyklisierung. Die gleichzeitige Abspaltung des Riboseträgeranteils führt zur Aromatisierung des Pyridinderivates.

Die Aminosäuresequenz der Amidotransferase *Sno* besitzt große Homologie zu den im Purin- und Histidinstoffwechsel involvierten Amidotransferasen der Proteinfamilie *YaadE* (vgl. *Mittenhuber, 2001*). Daher kann genauso wie bei den zuvor genannten Synthesewegen auch im Syntheschema des Vitamin B₆ postuliert werden, daß der Amido-Stickstoff vom Glutamin auf einen aktivierten Precursor (PRPP) und nicht direkt auf eine Pentose übertragen wird.

Durch die Anwendung der gHMBC-NMR-Technik, gelang es *Gupta et al. (2001)* bei Versuchen mit [U-¹³C]-D-Glucose das Einbaumuster im Pyridoxinmolekül in *Escherichia coli* von dem in *Saccharomyces cerevisiae* zu unterscheiden (vgl. *Abbildung 4.1, Seite 122*). 90 % der detektierten Moleküle besaßen das gleiche Einbaumuster, nur 10 % ein abweichendes. Nach Meinung der Autoren kann diese Abweichung durch den Einbau einer intakten C-5-Einheit in die „linke Molekülhälfte“ begründet werden. Tatsächlich lassen sich beide Einbauschemata physiologisch nachvollziehen. Die Intakte C-5-Einheit sollte demnach aus dem direkten Einbau einer Pentose oder Pentulose in das Vitamin herrühren. Erwartungsgemäß sollte dieser Anteil sehr gering sein. Der Hauptteil der Pentose wird wahrscheinlich durch den Pentosephosphatweg abgebaut. In diesem degradiert der Zucker zur Triose Glycerinaldehyd-3-phosphat und einem C-2-Körper, der über Sedoheptulose-7-phosphat in Fructose-6-phosphat eingehen kann. Durch die Umkehrung dieser Reaktionsfolge oder durch den Calvin-Zyklus kann aus beiden Fragmenten wieder Xylulose entstehen (vgl. *Voet, Seite 618, Fig. 21-23 und Fig. 22-25, Seite 650*). Durchlaufen die eingesetzte Pentulose (oder Pentose) diese Stoffwechselreaktionen, sollte anteilig überwiegend Pyridoxamin entstehen, bei dem keine Kopplung zwischen den Kohlenstoffatomen C-2 und C-3 festgestellt werden kann.

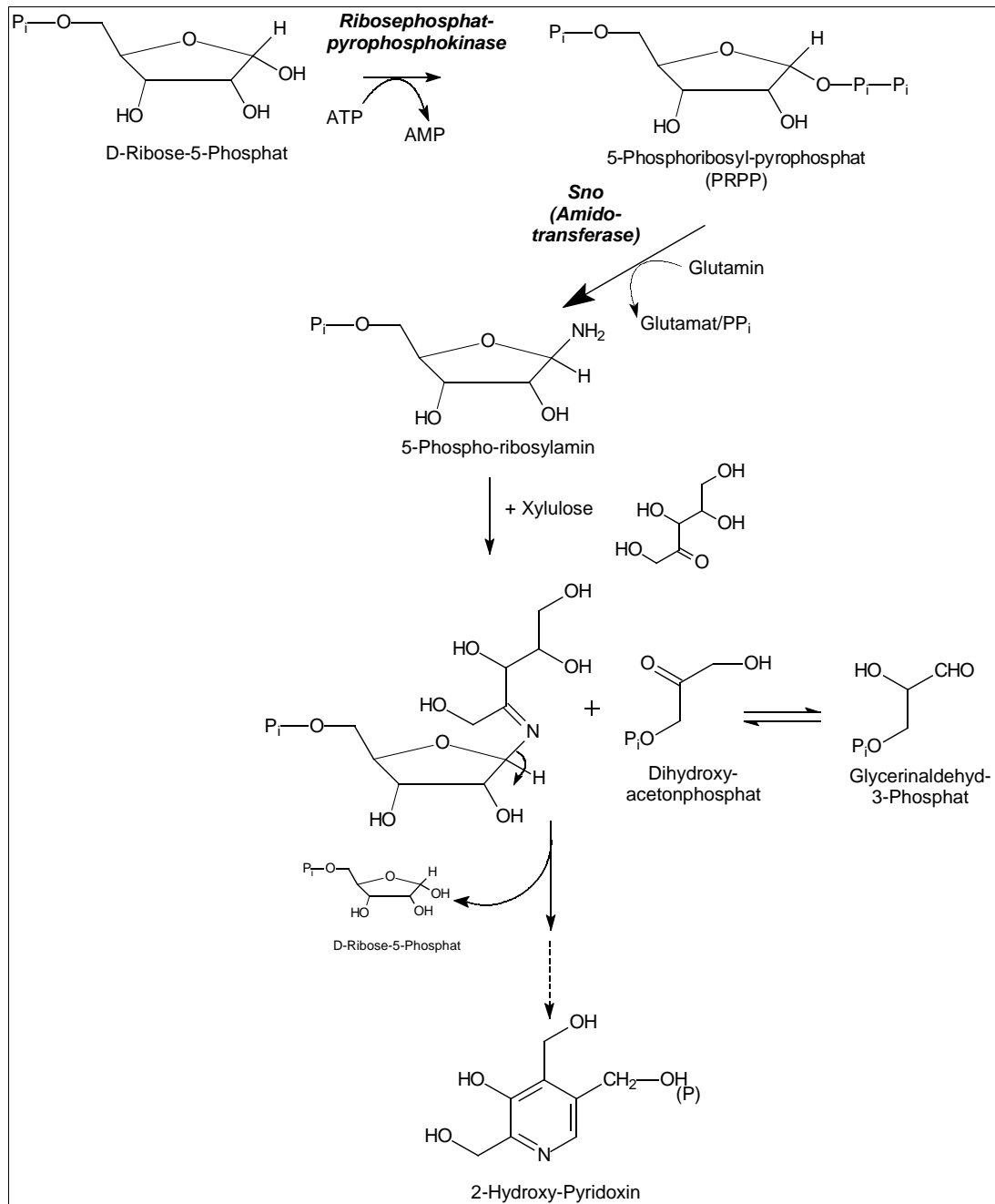


Abbildung 4.4 Postulierter Biosyntheseweg des Pyridoxins in den Organismen, die *pdx1/pdx2*-Gene tragen

Die Zusammenstellung erfolgte auf der Grundlage der in den Abbildungen 4.1 (Seite 122) bis (Seite) dargestellten Ergebnisse aus den Tracer-Studien an prokaryontischen und eukaryontischen Systemen. Das auf diese Weise gebildete 2-Hydroxy-Pyridoxin könnte in der von Zeidler *et al.* (2002) beschriebenen Weise in das erste biosynthetisch aktive Vitamin überführt werden (Erläuterungen dazu im Text).

Postuliert man eine Pentulose und nicht eine Pentose als Kohlenstoffeinheit für die Bildung des linken Molekülteils, sollte das erste Vitamin B₆-Derivat der *de novo*-Synthese 2-Hydroxy-Pyridoxin (in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* 2-Hydroxy-Pyrido-

xamin) sein. Der 2'-Alkohol könnte in der von Zeidler und Mitarbeitern postulierten Weise durch Dehydratisierung eliminiert werden. Auch eine Oxidation des Kohlenstoffatoms C-4' zum Aldehyd Pyridoxal ist in diesem Schritt denkbar (vgl. *Zeidler et al., 2002*).

4.5 Ausblick

Für das auf der Pflanze *Ginkgo biloba* beruhende System sind verschiedene Ansätze denkbar, die helfen sollten, die Vitamin B₆- Biosynthese besser zu verstehen. In *Kapitel 4.5.1 (Seite 128)* sollen mögliche Versuchsansätze auf genetischer Ebene vorgestellt werden. In *Kapitel 4.5.2 (Seite 129)* werden biochemische Versuchsansätze diskutiert.

4.5.1 Versuchsplanung auf genetischer Ebene

Im Zentrum weiterer genetischer Untersuchungen zur Biosynthese der Vitamere vom B₆-Type muß die Isolierung einer *sno*-homologen Sequenz aus dem Organismus stehen. Aufgrund der in *Kapitel 4.1 (Seite 111)* diskutierten Daten zu den *sor/sno*-Genen ist zu erwarten, daß auch die Pflanze *Ginkgo biloba* eine solche Sequenz in ihrem Genom besitzt. Zu ihrer Isolierung ist die Anwendung verschiedener Techniken denkbar.

Aufgrund der auch für dieses Gen wahrscheinlichen niedrigen Expressionsrate muß eine Technik verwendet werden, die es ermöglicht, niedrig exprimierte Transkripte nachzuweisen. Dies kann durch die RACE-PCR erfolgen, wenn, wie im Fall des in dieser Arbeit klonierten *sor*-Gens, eine zentrale Sequenz von mindestens 100bp des Gens bekannt ist. Diese zentrale Sequenz muß vorher durch PCR-Versuche aus genomischer DNA oder RNA des Organismus erhalten werden. Dazu müssen degenerierte Oligonukleotide auf der Grundlage konservierter Regionen der Sno-Proteinsequenz synthetisiert werden.

Nach dem Erhalt der gesamten cDNA-Sequenz durch RACE-PCR kann der offene Leserahmen in verschiedenen Systemen als Fusionsprotein überexprimiert werden. Das aufgrund des Fusionsanteils mittels Affinitätschromatographie gereinigte Protein kann im zellfreien System nach *Fiehe (1999)* zusammen mit dem im Rahmen dieser Arbeit exprimierten *Sor*-Protein eingesetzt werden.

Zur Klonierung einer *sno*-homologen cDNA aus *Ginkgo biloba* kann auch die Hefe-Zwei-Hybrid-Technik zum Einsatz kommen. Diese bietet den Vorteil, Gene aus einem

cDNA-Pool selektieren zu können, deren Genprodukt Affinität zu einem bekannten Protein aufweisen. Da aufgrund zahlreicher Daten (vgl. *Kapitel 4.1, 111*) angenommen werden muß, daß auch in *Ginkgo biloba* Sor- und Sno-Proteine Heterooligomere bilden, sollte sich die *sno*-cDNA der Pflanze mit diesem System selektieren lassen.

Steht die *sno*-cDNA zur Verfügung, kann ihre Funktion analog zu der in dieser Arbeit isolierten *sor*-Sequenz überprüft werden. Neben der Expression des Gens und dem Einsatz des Proteins im zellfreien System besteht auch die Möglichkeit, *sno*-Mutanten des Pilzes *Cercospora nicotianae* in geeigneter Weise mit dem *Ginkgo*-Gen zu komplementieren. Da dieser indirekte Funktionsnachweis aufgrund der in *Kapitel 4.3 (Seite 116)* diskutierten Gründe im Fall des *sor*-Gens nicht positiv verlief, ist es fraglich, ob die Testung einer anderen Sequenz aus dem gleichen Organismus Erfolg verspricht.

4.5.2 Versuchsplanung auf biochemischer Ebene

Enzymatischer Zugang

Sowohl im Zusammenhang mit den molekularbiologischen Experimenten als auch unabhängig davon sind auf biochemischer Ebene Versuche sinnvoll. Im Zentrum dieser können Experimente am zellfreien System stehen.

Wie im *Kapitel 4.3 (Seite 116)* beschrieben, ist die Steigerung der Biosynthese des Ginkgotoxins in diesem System nicht allein durch Zusatz von *Sor* erreichbar, wenn dieses Protein in enger Wechselwirkung mit *Sno* steht. Daher erscheint es sinnvoll, beide Proteine gemeinsam dem zellfreien System zuzusetzen und die Bildung von Ginkgotoxin zu beobachten. Dies kann jedoch mit dem *Sno*-Protein aus *Ginkgo biloba* erst nach der Klonierung des offenen Leserahmens erfolgen.

Als kurzfristige Ersatzlösung erscheint es möglich, ein heterologes Protein für diese Zwecke zu verwenden. Die Proteinsequenz eines solchen Fremdproteins sollte eine möglichst hohe Homologie zum Protein aus *Ginkgo biloba* besitzen. Da dessen Aminosäuresequenz noch nicht bekannt ist, muß für Homologievergleiche die Sequenz des *Sor*-Proteins herangezogen werden. Nach den in *Abbildung 3.7 (Seite 99)* und *Tabelle 3.2 (Seite 100)* dargestellten Berechnungen besitzen die Aminosäuresequenzen der *Sor*-homologen Proteine aus *Hevea brasiliensis* und *Ginkgo biloba* die höchste Homologie zueinander. Davon ausgehend, daß dies auch bei den *Sno*-Proteinsequenzen der beiden Organismen der Fall ist, sollte für einen kurzfristigen gewünschten Einsatz eines *Sno*-homologen Fremdproteins im zellfreien System das Protein von *Hevea brasiliensis* verwendet werden. Grundsätzlich ist jedoch dem Organismen-eigenen Protein der Vorzug zu geben.

Unabhängig davon, ob in das zellfreie System ein Fremdprotein oder das *Ginkgo*-eigene *Sno*-Protein eingesetzt wird, gilt es, die Wechselwirkungen zwischen den *Sor*- und *Sno*-Proteinen zu untersuchen. Die von *Padilla et al. (1998)* vorgestellten Daten von Versuchen an einem Hefe-Zwei-Hybrid-System geben erste Ansatzpunkte dazu. Mit einem solchen System wäre es nicht nur möglich, die *sno*-homologe cDNA aus *Ginkgo biloba* zu isolieren (siehe *Kapitel 4.5.1, Seite 128*); es könnte auch verwendet werden, um die Affinität der beiden Proteine zueinander zu untersuchen. Diese Anwendung ist möglich, wenn ein Reportersystem zum Einsatz kommt, dessen Produkt zum Beispiel über photometrische Verfahren halbquantitativ ausgewertet werden kann. Ein solches Verfahren sollte Auskunft darüber geben können, zu welchen Proteinen das *Sno*-Protein aus *Ginkgo biloba* Affinität besitzt.

Diese Fragestellung kann auch durch ein zellfreies Affinitätstestsystem beantwortet werden, in dem ein *Sor*-Glutathion-S-Transferase-(GST)-Fusionsprotein als Affinitätsmatrix dient. Dazu ist es nötig das zu untersuchende Protein –in diesem Fall *Sno*– durch ein *in vitro*-Transcriptions-Translationssystem radioaktiv-markiert (z. B. ^{35}S -Methionin) zu synthetisieren. Nach der Bildung des Komplexes aus *Sor*-GST-Fusionsprotein mit dem radioaktiv-markierten *Sno*-Protein kann dieser über Affinitätschromatographie an eine Glutathionmatrix gereinigt werden. Die Quantifizierung der auf diese Weise immobilisierten Radioaktivität sollte Rückschlüsse auf das Mengenverhältnis zwischen *Sor* und dem daran gebundenen *Sno* erlauben.

Tracer Studien

Ein weiteres Augenmerk liegt auf der Testung alternativer Vorstufen zum Aufbau des Pyridoxin-Grundgerüsts im zellfreien System. Ausgehend von dem in *Kapitel 4.4.1.3 (Seite 125)* postulierten Mechanismus der alternativen Biosynthese sind mehrere Optionen denkbar:

Gupta et al. (2001) konnten in *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida utilis* den Einbau einer Pentose bzw. einer Pentulose in das Pyridoxamin nachweisen. Aufgrund der Ketogruppe an Position C-2 scheint die Pentulose Xylulose prädestiniert für die Reaktion mit einem PRPP-aktivierten Amin (vgl. *Abbildung 4.4, Seite 127*). Da zum Aufbau des übrigen Ringsystems drei weitere Kohlenstoffatome benötigt werden, erscheinen Triosen bzw. Vorstufen, die nach Modifizierung (z. B. enzymatischer Decarboxylierung) C_3 -Einheiten freisetzen, besonders geeignet. In Anbetracht der Tatsache, daß im zellfreien System die Zugabe von Glycerinaldehyd-3-phosphat bzw. Dihydroxyacetonphosphat eine Steigerung der Ginkgotoxin-Bildung bewirken, sollten zunächst diese Vorstufen getestet werden.

Alle in Frage kommenden Precursoren sollten zunächst radioaktiv-markiert (vorzugsweise ^{14}C -markiert) eingesetzt werden, um die nötige Empfindlichkeit des Nach-

weissystems zu gewährleisten. Wenn der Einbau einer Vorstufe in das Pyridoxin-Grundgerüst beobachtet werden kann, erscheint auch der Einsatz der entsprechenden ^{13}C -markierten Verbindung sinnvoll, um Aussagen über die Position der Vorstufe im Zielmolekül zu erhalten. Um markiertes Ginkgotoxin in einer Menge zu erhalten, die eine NMR-analytische Untersuchung ermöglicht, sollten diese Experimente an Zellkulturen der Pflanze durchgeführt werden.

Auf enzymatischer Ebene gilt es, die Beteiligung eines Enzyms an der Biosynthese nachzuweisen, für das eine Amidotransferase-Aktivität postuliert wird. Dabei kann der Einsatz des Amidotransferase-Hemmstoffes Acivicin (*Smulski et al., 2001*) – einem Glutamin-analogen Chloro-isoxazol - von Vorteil sein. Acivicin ist geeignet, die Enzymaktivität einer Amidotransferase, nicht aber von Aminotransferasen, zu inhibieren. Setzt man diese Substanz dem zellfreien System zu, sollte sie die Bildung des Ginkgotoxins vollständig unterbinden. Bei Synthese von Pyridoxal sollte hingegen unbeeinflusst bleiben, wenn der Enzymrohextrakt aus *Escherichia coli* anstelle des aus den Samen von *Ginkgo biloba* gewonnenen Extraktes verwendet wird. Die an der Biosynthese des Vitamins im Enterobakterium beteiligte Transaminase *SerC* (vgl. *Abbildung 1.3, Seite 5*) sollte nicht durch Acivicin beeinflusst werden.

Unabhängig von der Verwendung des Amidotransferase-Hemmstoffes Acivicin kann der Mechanismus der Stickstofffixierung auch durch den Einsatz von ^{15}N -markierten Vorstufen untersucht werden. Diese Experimente könnten in analoger Weise zu den Versuchen von *Tazuya et al. (1995)* durchgeführt werden. Der Zusatz von [Amido- ^{15}N]-Glutamin zum zellfreien System von Fiehe sollte nur unter Verwendung des Enzymextraktes aus *Ginkgo biloba* zum Einbau des schweren Stickstoffs in das Ginkgotoxin führen. Unter Verwendung eines Enzymrohextraktes aus *Escherichia coli* dürfte sich kein Einbau finden lassen. Genau der umgekehrte Fall sollte auftreten, wenn dem System jeweils [Amino- ^{15}N]-Glutamin zugesetzt würde. Da in dem in *Kapitel 4.4.1.3 (Seite 125)* für *Ginkgo biloba* postulierten Syntheseweg keine Aminotransferase zugegen ist, dürfte sich der schwere Stickstoff nicht im Ginkgotoxin finden lassen. Das schwere Isotop im Analyten sollte sich nach HPLC-Trennung der Vitamere durch MALDI-TOF-Spektroskopie nachweisen lassen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Mit den Ergebnissen zur Biosynthese des Vitamin B₆ in verschiedenen Organismen haben sich in den letzten Jahren zahlreiche neue Aspekte eröffnet. Ging man zuvor davon aus, alle zur Biosynthese befähigten Organismen synthetisierten diese Stoffe auf die gleiche Weise, wissen wir heute, daß es zumindest zwei unterschiedliche Biosynthesewege in der Natur gibt. Diese sollten sich sowohl in ihren genetischen Grundlagen als auch in ihrer Biochemie grundsätzlich unterscheiden.

Zahlreiche Argumente sprechen dafür, daß *Ginkgo biloba* zu der Gruppe von Organismen zählt, die die Biosynthese auf eine andere als der bisher aus dem Enterobakterium *Escherichia coli* bekannten Weise durchführt. Zur Aufklärung dieses neuen Syntheseweges fehlen noch zahlreiche Informationen: Mit Sicherheit kann zunächst die Beteiligung des *sor(pdx1)*-Genes bestätigt werden; die Funktion des Genproduktes ist noch unklar.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, ein Gen aus der Pflanze *Ginkgo biloba* - *Ginkgoaceae* - zu klonieren, dessen Sequenz große Homologie zu den bekannten *sor/pdx1*-Genen aufweist. Es konnte sowohl in einem prokaryontischen als auch eukaryontischen Wirt exprimiert werden; es gelang, das aus der prokaryontischen Expression erhaltene Protein, teilweise zu reinigen. Es steht für den Einsatz im zellfreien System nach *Fiehe (1999)* zur Verfügung.

In verschiedenen Organismen wird mit dem *sor*-Gen das *sno*-Gen koreguliert; die Annahme einer Amidotransferase-Aktivität für dessen Genprodukt bleibt zur Zeit noch hypothetisch und bedarf weiterer Untersuchungen. Ferner ist noch nicht abschließend geklärt, ob weitere Gene für Enzyme dieses Stoffwechselweges kodieren.

Die Biochemie dieses alternativen Vitamin B₆-Syntheseweges ist weitgehend unerforscht. Zwar haben Spenser und Mitarbeiter Hinweise darauf, daß eine Pentose zur Bildung des Pyridinringes beiträgt, doch sind noch weitere Kohlenstoffeinheiten zum Aufbau des Grundgerüsts nötig. Ebenso sind die beteiligten Enzyme, sofern sie bekannt sind, uncharakterisiert.

6 LITERATUR

- ALTENBUCHNER, J. AND CULLUM, J.** (1984): DNA amplification and an unstable arginine gene in *Streptomyces lividans*, 66. *Mol. Gen. Genet.* **195**, 134-138.
- ARENZ, A.** (1996): Zur Biosynthese von Pyridoxin (Vitamin B₆) im Enterobakterium *Escherichia coli* sowie zum Vorkommen und zur Biosynthese von 4'-O-Methylpyridoxin – einem B₆-Antivitamin – in höheren Pflanzen (*Ginkgo biloba* L. und *Albizia Tanganyicensis* Bak. F.), *Dissertation, Inst. f. Pharm. Biologie, Uni Bonn*
- ARENZ, A., KLEIN, M., FIEHE, K., GROSS, J., DREWKE, C., HEMSCHIEDT, T., LEISTNER, E.** (1996): Occurrence of Neurotoxic 4'-O-Methylpyridoxine in *Ginkgo biloba* Leaves, *Ginkgo* Medikations and Japanese *Ginkgo* Food, *Planta Med.* **62**: 548-551.
- BERTRAM, S., GASSEN, H.G.** (1991): Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- BILSKI, P., LI M., EHRENSHAFT, M., DAUB, M.E., CHIGNELL, C.F.** (2000): Vitamin B₆ (Pyridoxine) and Its Derivatives Are Efficient Singlet Oxygen Quenchers and Potential Fungal Antioxidants, *Photochemistry and Photobiology* **71 (2)**: 129-134.
- BLIN, N., STAFFORT, W.** (1976): A general method for isolation of high molecular weight DNA from eucaryotes, *Nucleic acid Reseach* **3**: 2303-2308.
- BRADFORD, M.** (1976): A rapid and sensitive method for quantifications of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, *Anal. Biochem.* **72**, 248-245.
- BRAUN, E.L., FUGE, E.K., PADILLA, P.A., WERNER-WASHBURNE, M.** (1996): A stationary-phase gene in *Saccharomyces cerevisiae* is a member of a novel, highly conserved gene family, *Journal of Bacteriology* **178**: 6865-6872
- BUSS, K., DREWKE, C., LOHMANN, S., PIWONSKA, A., LEISTNER, E.** (2001): Properties and Interaction of Heterologously Expressed Glutamate Decarboxylase Isoenzymes GAD_{65kDa} and GAD_{67kDa} from Human Brain with Ginkgotoxin and Its 5'-Phosphate, *J. Med. Chem.* **44**: 3166-3174.

- CANE, D.E., HSUING, Y., CORNISH, J.A., ROBINSON, J.K., SPENSER, I.D.** (1998): Biosynthesis of vitamin B₆: The oxidation of 4-(phosphohydroxy)-L-threonine by PdxA, *J. Am. Chem. Soc.* **120**: 1936-1937
- CANE, D.E., DU, S., ROBINSON, J.K., HSUING, Y., SPENSER, I.D.** (1999): Biosynthesis of vitamin B₆ conversion of 1-deoxy-D-xylulose 5'-phosphate to pyridoxol phosphate, *J. Am. Chem. Soc.* **121**: 7722-7723
- DAUB, M. E., EHRENSHAFT, M.** (2000): The Photoactivated Cercospora Toxin Cercosporin: Contributions to Plant Disease and Fundamental Biology, *Annu. Rev. Phytopathol.* **38**: 461-490
- DEMPSEY, W.B.** (1969): Characterisation of pyridoxine auxotrophs of *Escherichia coli*: P1 Transduction, *J. Bacteriol.* **97**: 1403-1410
- DIEFFENBACH, C.W., DVEKSLER, C.S.** (1995): PCR Primer, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (CSHL), New York.
- DOOLITTLE, W.F.** (1997): Phylogenetic classification and the universal tree, *Science* **284**: 2124-2129
- DREWKE, C., NOTHEIS, C., HANSEN, U., LEISTNER, E., HEMSCHIEDT, T., HILL, R.E., SPENSER, I.D.** (1993): Growth response to 4-hydroxy-L-threonine of *Escherichia coli* mutants blocked in the vitamin B₆ biosynthesis. *FEBS Letters* **318**: 125-128
- DREWKE, C., KLEIN, M., CLADE, D., ARENZ, A., MÜLLER, R., LEISTNER, E.** (1996): 4-O-Phosphoryl-L-threonine, a substrate of the *pdxC* (*serC*) gene product involved in vitamin B₆ biosynthesis, *FEBS Letters* **390**: 175-182.
- EHRENSHAFT, M., JENNS, A.E., CHUNG, K.R., DAUB, M.E.** (1998): *SOR1*, a Gene Required for Photosensitizer and Singlet Oxygen Resistance in *Cercospora* Fungi, is Highly Conserved in Divergent Organisms, *Molecular Cell* **1**: 603-609.
- EHRENSHAFT, M., KUANG-REN, C., JENNS, A. E., DAUB, M. E.** (1999): Functional characterisation of *SOR1*, a gene required for resistance to photosensitizing toxins in the fungus *Cercospora nicotianae*, *Current Genetics* **34**: 478-485
- EHRENSHAFT, M., BILSKI, P., LI, M. L., CHIGNELL, C. F., DAUB, M. E.** (1999): A highly conserved sequence is a novel gene involved in *de novo* vitamin B₆ biosynthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 9374-9378

- EHRENSHAFT, M., DAUB, M., E.** (2001): Isolation of PDX2, a Second Novel Gene in the Pyridoxine Biosynthesis Pathway of Eukaryotes, Archaeobacteria and a Subset of Eubacteria, *Journal of Bacteriology* **183 (11)**: 3383-3390
- FIEHE, K.** (1999): Versuche zur Entwicklung eines zellfreien Systems, das Ginkgotoxin enzymatisch produziert, *Dissertation, Inst. f. Pharm. Biologie, Uni Bonn*
- FIEHE, K., ARENZ, A., DREWKE, C., HEMSCHIEDT, T., WILLIAMSON, T., LEISTNER, E.** (2000): Biosynthesis of 4'-O-Methylpyridoxine (Ginkgotoxin) from Primary Precursors, *J. Nat. Prod.* **63**: 185-189.
- FROHMANN, M.A., DUSH, M.K., MARTIN, G.** (1988): Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8997-9002.
- GALPERIN, M.Y. AND KOONIN, E.V.** (1998): Sequence analysis of an exceptionally conserved operon suggests enzymes for a new link between histidine and purine biosynthesis, *Mol. Mikrobiology* **24**: 443-445
- GUPTA, R.N., HEMSCHIEDT, T., SAYER, B.G., SPENSER, I.** (2001): Biosynthesis of Vitamin B₆ in Yeast: Incorporation Pattern of Glucose, *J. Am. Chem. Soc.* **123**: 11353.11359,
- GUPTA, R.S.,** (1998): What are Archaeobacteria: life's third domain or monoderm prokaryotes related to gram-positiv bacteria? A new proposal for the classification of prokaryotic organisms, *Mol. Microbiol.* **29**: 695-707
- GUPTA, R.S.,** (1998): Protein phylogenesis and signature sequences: reappraisal of evolutionary relationships among archaeobacteria, eubacteria and eukaryotes, *Microbiol. Mol. Biol.* **62**: 1435-1491
- HAYASHI, H.** (1995): Pyridoxal Enzymes: Mechanistic Diversity and Uniformity, *J. Biochem.* **188**: 463-473
- HILL, R.E., SPENSER, I.D.** (1986): Biosynthesis of vitamin B₆. In "Coenzymes and Cofaktors" (D. Dolphin, R.Poulson and O. Avramovic, Editoren), Vol. 1, Seite 417-476, Wiley, New York
- HILL, R.E., SPENSER, I.D.** (1996): Biosynthesis of vitamin B₆. In „*Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*“ (F.C. Neidhardt *et al.*, Editoren), 2. Editon, Vol. 1, Seite 695-703. American Society for Microbiology, Washington, DC.

- HÖLZL, J.** (1992): Inhaltsstoffe von *Ginkgo biloba*, *Pharmazie unserer Zeit* **21**: 215-233.
- HORTON, R. W., CHAPMANN, A. G., MELDRUM, B. S.** (1982): The Convulsant Action of Hydrazides and Regional Changes in Cerebral γ -Aminobutyric Acid and Pyridoxal-Phosphat Concentrations, *J. Neurochem* **33**: 745-749.
- ISLER, O., BRUBACHER, G., GHISLA, S., KRÄUTLER, B.** (1988): Vitamine, Bd. 2. Wasserlösliche Vitamine, New York, Thieme-Verlags GmbH: 193-229
- KOZAK, M.** (1987): An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs, *Nucleic acids Research* **15 (20)**: 8125-8148
- KOZAK, M.** (1991): An analysis of vertebrate mRNA sequences: initiation of translational control. *J. Cell Biol.*, **115**: 887-903.
- LAM, H.-M., WINKLER, M.E.** (1990): Metabolic relationship between pyridoxine (vitamin B₆) and serine biosynthesis in *Escherichia coli* K-12, *J. Bacteriol.* **172**: 6518-6528.
- LANGE, B.M., WILDING, M.R., McCASKILL, D., CROTEAU, R.** (1998): A family of transketolases that direct isoprenoid biosynthesis via a mevalonat independent pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 2100-2104.
- LOIS, L.M., CAMPOS, N., PUTRA, S.R., DANIELSSEN, K., ROHMER, M., BORONAT, A.** (1998): Cloning and characterisation of a gene from *Escherichia coli* encoding a transketolase like enzyme that catalyzes the synthesis of D-1-Deoxyxylulose 5'-phosphate, a common pyridoxol precursor for isoprenoid, thiamine, and pyridoxol biosynthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 2105-2110.
- LEISTNER, E.** (1993): Die Entwicklung des Sekundärstoffwechsels – Prinzipien der chemischen Evolution, veranschaulicht an Beispielen von Aromatisierungsmechanismen, *Arch. Pharm.* **326**: 853-856.
- LOH, E.Y., ELLIOT, J.F., CWIRLA, S., LANIER, L.L. DAVIS, M.M.** (1989): Polymerase chain reaction with single-sided specificity: analysis of T cell receptor delta chain, *Science* **243**, 217-220.
- LION, T., HAAS, O.A.** (1990): Nonradioactive labeling of probe with digoxigenin by PCR, *Analytikal biochemistry* **188**, 335-337
- MELZHEIMER, V.** (1992): *Ginkgo biloba* L. aus Sicht der systematischen und angewandten Botanik, *Pharmazie unserer Zeit* **21**: 206-214

- MITTENHUBER, G.** (2001): Phylogenetic Analyses and Comparative Genomics of Vitamin B₆ (Pyridoxine) and Pyridoxal Phosphate Biosynthesis Pathways, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3 (1)**: 1-20
- MURASHIGE, T., SKOOG, F.** (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant* **15**, 473-479.
- NOTHEIS, C., DREWKE, C., LEISTNER, E.** (1995): Purification and characterisation of the pyridoxol-5'-phosphate:oxygen oxidoreductase (deaminating) from *E. coli*, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **83**: 984-990
- OHARA, O., DORIT, R., GILBERT, W.**, (1989): One-sided polymerase chain reaction: the amplification of cDNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 5673-5677.
- OSMANI, A.H., MAY, G.S., OSMANI, S.A.** (1999): The Extremely Conserved *pyroA* Gene of *Aspergillus nidulans* is Required for Pyridoxine Synthesis and is Required Indirectly for Resistance to Photosensitizers, *Journal of Biological Chemistry* **274 (33)**: 23565-23569.
- PADILLA, P.A., FUGE, E.K., CRAWFORD, M. E., ERRETT, A., WERNER-WASHBURNE, M.** (1998): The Highly Conserved, Coregulated *SNO* and *SNZ* Gene Family in *Saccharomyces cerevisiae* Respond to Nutrient Limitation, *Journal of Bacteriology* **180(21)**: 5718-5726.
- PALL, M.L., BRUNELLI, P.**: A series of six compact fungal transformation vectors containing polylinkers with multiple unique restriction sites, Internet: www.fgsc.net/fgn/pall.html
- ROA, B.B., CONOLLY, D.M., WINKLER, M.E.** (1989): Overlap between *pdxA* and *ksgA* in the complex *pdxA-ksgA-apaG-apaH* operon of *Escherichia coli* K-12, *J. Bacteriol.* **171**: 4767-4777.
- ROHMER, M., SEEMANN, M., HORBACH, S., BRINGER-MEYER, S., SAHM, H.** (1996): Glycerinaldehyd 3-phosphat and Pyruvat as Precursors of Isoprenic Units in an Alternative Non-mevalonat Pathway for Terpenoid Biosynthesis, *J. Am. Chem. Soc.* **118 (11)**: 2564-2566.
- RÖMPP, H. (BEGR.), FALBE, J., REGITZ, M (HERG.)** (1995): Römpp Chemie Lexikon, 9. Auflage (Paperback), Stuttgart, New York, Thieme Verlags GmbH: 3697-3699, 4945-4946

- SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B., EHRLICH, H.A.**, (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA Polymerase, *Science* **239**, 487-491
- SAMBROOK, FRITSCH, MANNIATIA** (1989): *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (CSH), New York.
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R.** (1977): DNA sequencing with chain termination inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- SASAKI, K., HATTA, S., WADA, K., OSHIKA, H., HAGA, M.** (1995): Anticonvulsant activity of bilobalide, a sesquiterpene in *Ginkgo biloba* L. leaves, against chemical-induced and electoshock-induced convulsions in mice, *Re. commun. Biol. Psychol. Psychiat* **20 (3,4)**: 145-156
- SASAKI, K., HATTA, S., WADA, K., OSHIKA, H., HAGA, M.** (1997): Bilobalide, a constituent of *Ginkgo biloba* L., potentiates drug-metabolizing enzyme activities in mice: possible mechanisms for anticonvulsant activity against 4'-O-Methylpyridoxine-induced convulsions, *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology* **96 (1)**: 45-56.
- SCHEPMANN, H.G., PANG, J., MATSUDA, S.P.T.** (2001): Cloning and characterisation of *Ginkgo biloba* levopimaradiene synthase which catalyses the first committed step in ginkgolide biosynthesis, *Arch. biochem. Biophys.* **392 (2)**: 263-269.
- SCHLEGEL, H.** (1985): *Allgemeine Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 6. Auflage
- SCHOENLEIN, P.V., RAO, B.B., WINKLER, M.E.** (1989): Divergent transcription of *pdxB* and *serA* gene products in *Escherichia coli* K-12, *J. Bacteriol.* **171**: 6084-6092.
- SHINE, J., DALGARNO, L.** (1975): Terminal-sequence analysis of bacterial ribosomal RNA. Correlation between the 3'-terminal-polypyrimidine sequence of 16-S RNA and translational specificity of the ribosome, *Eur. J. Biochem.* 1975 Sep 1;57(1):221-30.
- SHINE, J., DALGARNO, L.** (1975): Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes, *Nature* **254(5495)**:34-38.
- SIVASUBRAMANIAM, S., VANNIASINGHAM, V.M., TAN, C.T., CHUA, N.H.** (1995): Characterisation of *HEVER*, an novel stress-induced gene from *Hevea brasiliensis*, *Plant Molecular Biology* **29**: 173-178.

- SMULSKI, D.R., HUANG, L.L., McCLUSKEY, M.P., GLADNICK REEVE, M.J., VOLLER, A.C., VAN DYK, T.K., LAROSSA, R.A.** (2001): Combined, Functional Genomic-Biochemical Approach to Intermediary Metabolism: Interaction of Acivicin, a Glutamine Amidotransferase Inhibitor, with *Escherichia coli* K-12, *J. Bacteriology* **183** (11): 3353-3364.
- SOUTHERN, E.M.** (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gelelectrophoresis, *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517
- SPRENGER, G.A., SCHÖRKEN, U., WIEGERT, T., GROLLE, S., DE GRAAF, A.A., TAYLOR, S.V., BEYGLE, T.P., BRINGER-MEYER, S., SAHM, H.** (1997): Identification of a thiamine dependent synthase in *Escherichia coli* required for the formation of the 1-deoxyxylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamine, and pyridoxol, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 12857-12862.
- STRYER, L.** (1996): Biochemie, 4. Auflage, Berlin, Oxford, Spektrum: 667
- TANAKA, K., TAZUYA, K., YAMADA, K., KUMAOKA, H.** (2000): Biosynthesis of Pyridoxine: Origin of the Nitrogen Atom of Pyridoxine in Microorganisms, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **46**: 55-57
- TAZUYA, K., ADACHI, Y., MASUDA, K., YAMADA, K., KUMAOKA, H.** (1995): Origin of the nitrogen atom of Pyridoxine in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochimica et Biophysica Acta* **1244**: 113-116
- VOET, D., VOET, J. G.**: Biochemistry, Second Edition, 1995, John Wiley & Sons, Inc.
- WADA, K., SHNELL, E.E.** (1961): The enzymatic oxidation of pyridoxine and pyridoxamine phosphates, *J. Biol. Chem.* **236**: 330-331
- WADA, K., ISHIGAKI, S., UEDA, K., SAKATA, M., HAGA, M.** (1985): An antivitamin B₆, 4'-methoxypyridoxine, from the seeds of *Ginkgo biloba* L., *Chem. Pharm. Bull.* **33**: 3555-3557.
- WOESE, C.** (1998): The universal ancestor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 6854-6859
- YANG, Y., ZAOH, G., MAN, T.-K., WINKLER, M.E.** (1998b): Involvement of *gapA* and *epd* (*gapB*)-encoded dehydrogenase in pyridoxal 5'-phosphate coenzyme biosynthesis in *Escherichia coli* K-12, *J. Bacteriol.* **180**: 4294-4299.

- YAGI, M., WADA, K., SAKATA, M., KOKUBO, M., HAGA, M.,** (1993): Studies on the constituents of edible and medicinal plants. IV. Determination of 4'-methylpyridoxine in the serum of the patient with gin-nan food poisoning, *Yakugaku Zhassi* **113**: 596-599.
- YANAI, A., MINAMI, M., TAKANO, Y., ENDO, T., HAMAUE, M., WADA, K., TAKE, Y., HAGA, M., MORII, K., TOGASHI, H., YOSHIOKA, M., SAITO, H.** (1990): 4'-O-Methylpyridoxine-Induced Convulsion in Guinea Pigs and Rats, *Life Sci. Adv.* **107**: 1499-1500.
- ZAOH, G., PEASE, A.J., BHARANI, N., WINKLER, M.E.** (1995): Biochemical characterisation of *gapB*-encoded erythrose 4-phosphate dehydrogenase of *Escherichia coli* K-12 and its possible role on pyridoxal 5'-phosphate biosynthesis, *J. Bacteriol.* **177**: 2804-2812
- ZAOH, G., WINKLER, M.E.** (1996): 4-Phospho-hydroxy-L-threonine is an obligatory intermediate in pyridoxal 5'-phosphate coenzyme biosynthesis in *Escherichia coli* K-12, *FEMS Microbiol. Letters* **135**: 275-280.
- ZENK, M.H., EL-SHAGI, H., SCHULTE, U.** (1975): Anthraquinone production by cell suspension cultures of *Morinda citrifolia*, *Plant Med.* **28**: 79-101.
- ZEIDLER, J., ULLAH, N., GUPTA, R.N., PAULOSKI, R. M., SAYER, B. G., SPENSER, I.D.** (2002): 2'-Hydroxypyridoxol, a Biosynthetic Precursor of Vitamins B₆ and B₁ in Yeast, *J. Am. Chem. Soc.* **124**: 4542-4543.

7 ANHANG

7.1 Datenerhebungen im Rahmen der Klonierung des *sor*-homologen Gens aus *Ginkgo biloba*

7.1.1 Primerdiagramm

In der *Abbildung 7.1* ist die relative Lage der zur Klonierung der verschiedenen DNA- und RNA-Fragmente benötigten Oligonukleotide gezeigt. Die Oligonukleotide sind entsprechend ihrer Funktion oder ihrem Namen nach *Tabelle 2.2, Seite 16*, gekennzeichnet. Bei der Lage der vektorbezogenen Primer wurde davon ausgegangen, daß ein Fragment in jeden der in den *Tabellen 2.3 und 2.4 (Seite 18f)* verzeichneten Vektoren ligiert werden kann. Die Lage der Standardsequenzierprimer (T_3 , T_7 , M_{13rev} , M_{13fwd}) ist abhängig von der Orientierung des jeweiligen Polylinkers und kann anhand der Vektorkarten (siehe *Kapitel 7.2, Seite 152*) ermittelt werden.

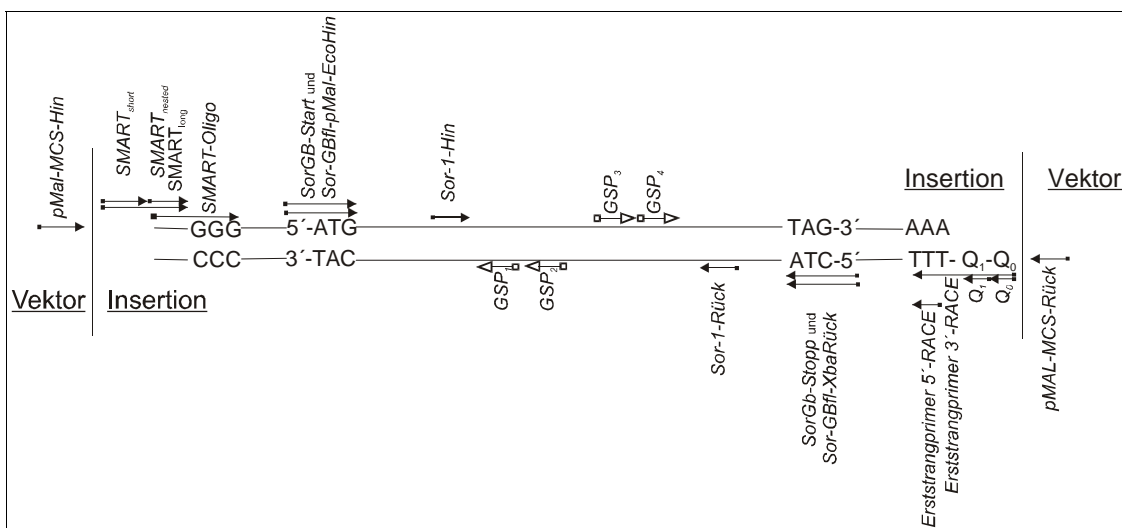


Abbildung 7.1 „Primerdiagramm“ der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide

7.1.3 *sor*-cDNA aus *Ginkgo biloba*

	10	20	30	40
Consensus	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTAACAAGGCA			
SorGB5´ (1>596) →	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTAACAAGGCA			
	50	60	70	80
Consensus	GAGTACGCGGGGATTGTACATTTACGTCTTCTATTTTCTT			
SorGB5´ (1>596) →	GAGTACGCGGGGATTGTACATTTACGTCTTCTATTTTCTT			
	90	100	110	120
Consensus	CTTGCTTCCTCAAGGTGTGTGCAGTTAAGCAAAAACCGAGA			
SorGB5´ (1>596) →	cttGCTTCCTCAAGGTGTGTGCAGTTAAGCAAAAACCGAGA			
	130	140	150	160
Consensus	AGCGTTTTGAGCCAGCTTTCCTTCAAACCCCATCAAGGAA			
SorGB5´ (1>596) →	AGCGTTTTGAGCCAGCTTTCCTTCAAACCCCATCAAGGAA			
	170	180	190	200
Consensus	ATAGGGTTTTAGATCCAGGAGTTACTTTGTTTGAAGGTGGT			
SorGB5´ (1>596) →	ATAGGGTTTTAGATCCAGGAGTTACTTTGTTTGAAGGTGGT			
pwoGbfl (1>931) →	ATAGGGTTTTAGATCCAGGAGTTACTTTGTTTGAAGGTGGT			
	210	220	230	240
Consensus	CATGGCCAGCGACGGAGTTGTGACAGTTTATGGCGACGGTG			
SorGB5´ (1>596) →	CATGGCCAGCGACGGAGTTGTGACAGTTTATGGCGACGGTG			
pwoGbfl (1>931) →	ATGGCCAGCGACGGAGTTGTGACAGTTTATGGCGACGGTG			
	250	260	270	280
Consensus	CCATAACTGACACAAAGGTATCTTCGTATGCAGTCAAGGTT			
SorGB5´ (1>596) →	CCATAACTGACACAAAGGTATCTTCGTATGCAGTCAAGGTT			
pwoGbfl (1>931) →	CCATAACTGACACAAAGGTATCTTCGTATGCAGTCAAGGTT			
	290	300	310	320
Consensus	GGTTTGGCTCAAATGCTTAGAGGGGGAGTTATCATGGATGT			
SorGB5´ (1>596) →	GGTTTGGCTCAAATGCTTAGAGGGGGAGTTATCATGGATGT			
pwoGbfl (1>931) →	GGTTTGGCTCAAATGCTTAGAGGGGGAGTTATCATGGATGT			

Abbildung 7.3 *sor*-cDNA aus *Ginkgo biloba* (Teil 1 von 4)

Consensus (aus den Einzelsequenzen errechnete cDNA-Sequenz), SorGB5´ (aus der SMART-RACE-PCR erhaltene Sequenz), pwoGbfl (der mit einer Proofreading-Polymerase amplifizierte ORF), GB1H1R (aus der PCR mit genomischer DNA und aus der RT-PCR erhaltenes zentrales Fragment), SorGB3´ (aus der 3´-RACE-PCR erhaltene Sequenz): Start- (ATG) und Stoppcodon (TAG) des *sor*-ORF sind **fett** gedruckt, die nach Shine und Dalgarno (1975) und Kozak (1987, 1991) postulierte Ribosomenbindestelle ist **kursiv-fett** gekennzeichnet.

		330	340	350	360	
Consensus		TGTCAATGCTGAACAGGCTAGAATAGCCGAAGAGGCAGGGG				
SorGB5´	(1>596) →	TGTCAATGCTGAACAGGCTAGAATAGCCGAAGAGGCAGGGG				
pwoGbfl	(1>931) →	TGTCAATGCTGAACAGGCTAGAATAGCCGAAGAGGCAGGGG				
		370	380	390	400	410
Consensus		CTACTGCTGTAATGGCACTGGAGCGTGTCCCTGCTGATATA				
SorGB5´	(1>596) →	CTACTGCTGTAATGGCACTGGAGCGTGTCCCTGCTGATATA				
pwoGbfl	(1>931) →	CTACTGCTGTAATGGCACTGGAGCGTGTCCCTGCTGATATA				
		420	430	440	450	
Consensus		AGAGCTCAAGGAGGAGTTGCACGAATGAGCGATCCTGGCCT				
SorGB5´	(1>596) →	AGAGCTCAAGGAGGAGTTGCACGAATGAGCGATCCTGGCCT				
pwoGbfl	(1>931) →	AGAGCTCAAGGAGGAGTTGCACGAATGAGCGATCCTGGCCT				
		460	470	480	490	
Consensus		CATTAAAGAAATCAAAGTGCCGTGACAATCCCTGTCATGG				
SorGB5´	(1>596) →	CATTAAAGAAATCAAAGTGCCGTGACAATCCCTGTCATGG				
pwoGbfl	(1>931) →	CATTAAAGAAATCAAAGTGCCGTGACAATCCCTGTCATGG				
GB1H1R	(1>459) ←	TGCTGAGACGATTCCGGTGATGG				
		500	510	520	530	
Consensus		CCAAGGCTAGAATAGGTCATTTTGTGGAAGCGCAAATCCTT				
SorGB5´	(1>596) →	CCAAGGCTAGAATAGGTCATTTTGTGGAAGCGCAAATCCTT				
pwoGbfl	(1>931) →	CCAAGGCTAGAATAGGTCATTTTGTGGAAGCGCAAATCCTT				
GB1H1R	(1>459) ←	CCAAGGCTAGAATAGGTCATTTTGTGGAAGCGCAAATCCTT				
		540	550	560	570	
Consensus		GAAGCCATTGGTATTGATTACATTGATGAGAGTGAAGTACT				
SorGB5´	(1>596) →	GAAGCCATTGGTATTGATTACATTGATGAGAGTGAAGTACT				
pwoGbfl	(1>931) →	GAAGCCATTGGTATTGATTACATTGATGAGAGTGAAGTACT				
GB1H1R	(1>459) ←	GAAGCCATTGGTATTGATTACATTGATGAGAGTGAAGTACT				
		580	590	600	610	
Consensus		CACTCCTGCAGATGATATGCACCATATCAACAAGCATAATT				
SorGB5´	(1>596) →	CACTCCTGCAGATGATATGCAC				
pwoGbfl	(1>931) →	CACTCCTGCAGATGATATGCACCATATCAACAAGCATAATT				
GB1H1R	(1>459) ←	CACTCCTGCAGATGATATGCACCATATCAACAAGCATAATT				
		620	630	640	650	
Consensus		TTCGTATTCCTTTTGTGTGTGGATGTCGGAACCTCGGGGAG				
pwoGbfl	(1>931) →	TTCGTATTCCTTTTGTGTGTGGATGTCGGAACCTCGGGGAG				
GB1H1R	(1>459) ←	TTCGTATTCCTTTTGTGTGTGGATGTCGGAACCTCGGGGAG				
		660	670	680	690	
Consensus		GCGCTGAGAAGGATTGCCGAAGGGGCTGCTATGATCAGGAC				
pwoGbfl	(1>931) →	GCGCTGAGAAGGATTGCCGAAGGGGCTGCTATGATCAGGAC				
GB1H1R	(1>459) ←	GCGCTGAGAAGGATTGCCGAAGGGGCTGCTATGATCAGGAC				

Abbildung 7.4 *sor*-cDNA aus *Ginkgo biloba* (Teil 2 von 4)

		700	710	720	730	
Consensus		TAAAGGAGAAGCTGGTACCGGAAATGTTATTGAGGCAGTGA				
pwoGbfl	(1>931) →	TAAAGGAGAAGCTGGTACCGGAAATGTTATTGAGGCAGTGA				
GB1H1R	(1>459) ←	TAAAGGAGAAGCTGGTACCGGAAATGTTATTGAGGCAGTGA				
		740	750	760	770	
Consensus		GGCATGTGAGGTCTGTCTTGGGCGATATAAGGAAGCTTCAG				
pwoGbfl	(1>931) →	GGCATGTGAGGTCTGTCTTGGGCGATATAAGGAAGCTTCAG				
GB1H1R	(1>459) ←	GGCATGTGAGGTCTGTCTTGGGCGATATAAGGAAGCTTCAG				
		780	790	800	810	820
Consensus		AGTTTGGATGACGATGAAGTGTTCATTTCGCAAACAGAT				
pwoGbfl	(1>931) →	AGTTTGGATGACGATGAAGTGTTCATTTCGCAAACAGAT				
GB1H1R	(1>459) ←	AGTTTGGATGACGATGAAGTGTTCATTTCGCAAACAGAT				
		830	840	850	860	
Consensus		TGCTGCTCCCTATGAGCTTGTGAGGCAAACCAAACAGTTGG				
pwoGbfl	(1>931) →	TGCTGCTCCCTATGAGCTTGTGAGGCAAACCAAACAGTTGG				
GB1H1R	(1>459) ←	TGCTGCTCCCTATGAGCTTGTGAGGCAAACCAAACAGTTGG				
SorGB-3'	(1>530) ←	CAAACAGTTGG				
		870	880	890	900	
Consensus		GACGGCTTCCGTGTGAATTTTGGCGCAGGAGGTGTGCT				
pwoGbfl	(1>931) →	GACGGCTTCCGTGTGAATTTTGGCGCAGGAGGTGTGCT				
GB1H1R	(1>459) ←	GACGGCTTCCGTGTGAATTTTGGCGCAGGAGGTGTGCT				
SorGB-3'	(1>530) ←	GACGGCTTCCGTGTGAATTTTGGCGCAGGAGGTGTGCT				
		910	920	930	940	
Consensus		ACACCCGCTGATGCTGCCTTGATGATGCAGTTGGGTTGTGA				
pwoGbfl	(1>931) →	ACACCCGCTGATGCTGCCTTGATGATGCAGTTGGGTTGTGA				
GB1H1R	(1>459) ←	ACACCCGCTGATGC-AAAGGGA--AT-CAA				
SorGB-3'	(1>530) ←	ACACCCGCTGATGCTGCCTTGATGATGCAGTTGGGTTGTGA				
		950	960	970	980	
Consensus		TGGAGTTTTTGTGGCTCTGGTGTGTTCAAAGTGGCGATC				
pwoGbfl	(1>931) →	TGGAGTTTTTGTGGCTCTGGTGTGTTCAAAGTGGCGATC				
SorGB-3'	(1>530) ←	TGGAGTTTTTGTGGCTCTGGTGTGTTCAAAGTGGCGATC				
		990	1000	1010	1020	
Consensus		CAGCTCGTCGGGCTCGAGCTATTGTGCAGGCTGTTACTCAC				
pwoGbfl	(1>931) →	CAGCTCGTCGGGCTCGAGCTATTGTGCAGGCTGTTACTCAC				
SorGB-3'	(1>530) ←	CAGCTCGTCGGGCTCGAGCTATTGTGCAGGCTGTTACTCAC				
		1030	1040	1050	1060	
Consensus		TATAATGATCCCATATCTAGCTGAGGTTAGCTGCAGTCT				
pwoGbfl	(1>931) →	TATAATGATCCCATATCTAGCTGAGGTTAGCTGCAGTCT				
SorGB-3'	(1>530) ←	TATAATGATCCCATATCTAGCTGAGGTTAGCTGCAGTCT				

Abbildung 7.5 *sor*-cDNA aus *Ginkgo biloba* (Teil 3 von 4)

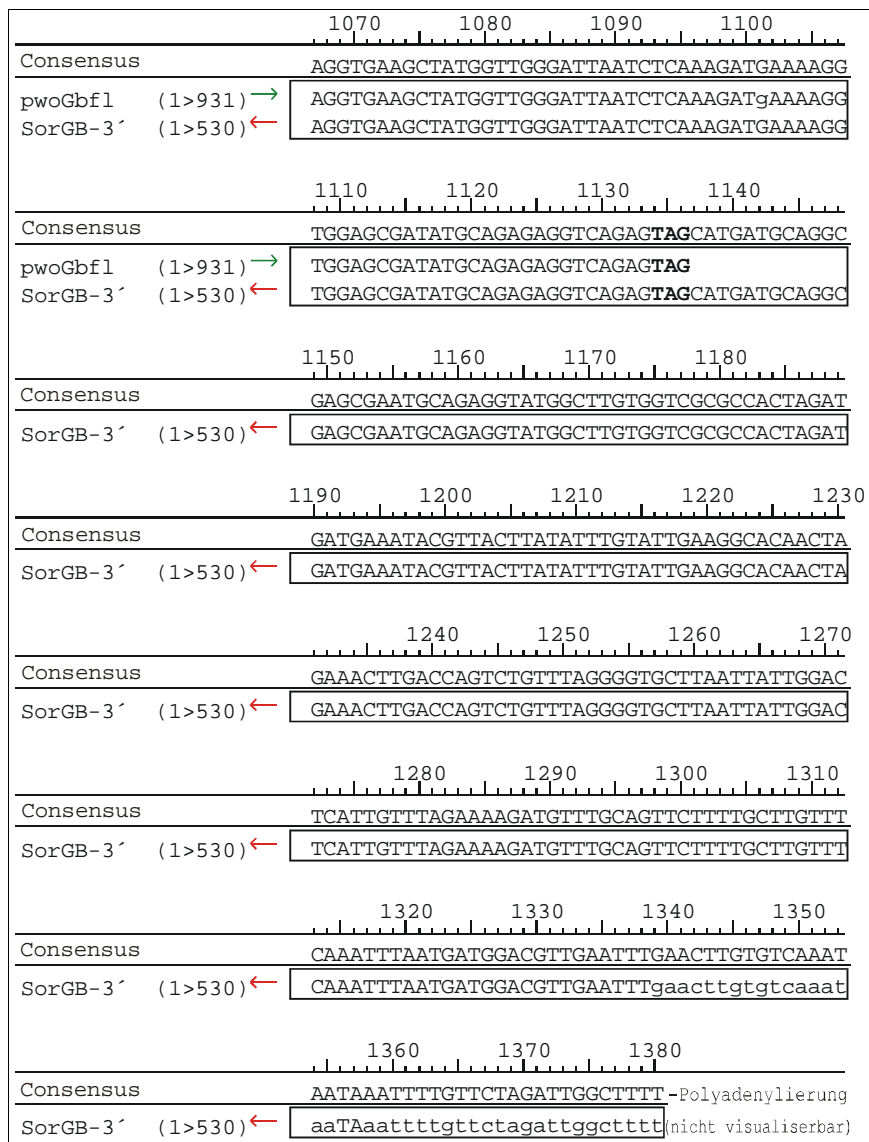


Abbildung 7.6 sor-cDNA aus *Ginkgo biloba* (Teil 4 von 4)

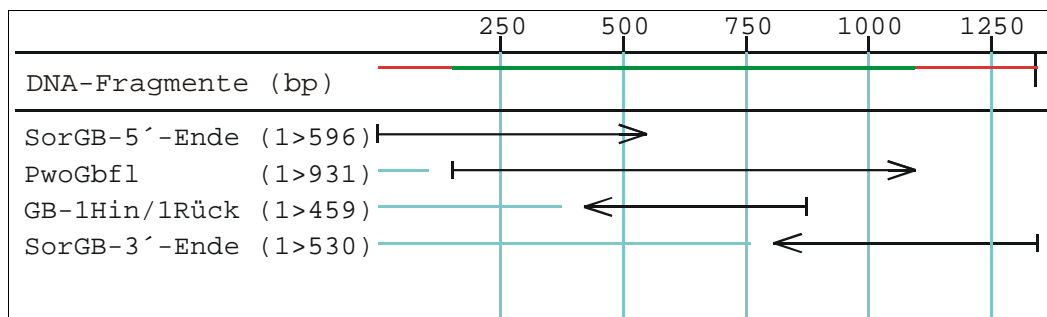


Abbildung 7.7 Lage der in Abbildung 7.3 bis 7.6 (Seite 145 bis 148) dargestellten Sequenzfragmente zueinander.

7.1.4 Vorkommen *sor/sno*- und *pdxA/J*-homologer Sequenzen in den Phyla (Abteilungen) und Ordnungstypen

Tabelle 7.1 Vorkommen der *sor(pdx1)*-, *sno(pdx2)*- bzw. *pdxA/pdxJ*-homologer Sequenzen in den Genomen von Organismen aus verschiedenen Phyla

Organismengruppen, deren Mitglieder Homologe einer Sequenzfamilie im Genom tragen sind markiert: **rot** = in einem Organismus dieser Gruppe wurden *sor/pdx1*- und/oder *sno/pdx2*-homologe Sequenzen nachgewiesen; **blau** = in einem Organismus dieser Gruppe wurden *pdxA/pdxJ*-homologe Sequenzen nachgewiesen; **rot-blau** = in einem Organismus dieser Gruppe wurden sowohl *sor/sno*- als auch *pdxA/pdxJ*-homologe Sequenzen nachgewiesen; unterstrichen = in einem Organismus dieser Gruppe sind nachweislich keine zu den genannten Sequenzfamilien homologe DNA-Sequenz gefunden worden; die Tabelle basiert auf Daten von Ehrenshaft (1999), Osmani (1999), Braun (1996), Mittenhuber (2001) sowie eigener Datenbankrecherchen.

<i>Taxon/Abteilungen</i>	<i>Untergruppierung</i>	<i>Beispiele</i>
Archaea		
1. Crenarchaeota	Thermophile und Schwefelabhängige	
2. Euryarchaeota	Methanobakterien:	<i>Methanobacterium</i> , <i>Methanococcus</i> , <i>Pyrococcus</i>
	Halophile:	<i>Halobacterium</i>
Bakterien		
1. grampositive Bakterien	1.1 Kokken	<i>Streptococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Enterococcus</i>
	1.2 nicht sporenbildende Stäbchen	Lactobacillen, <i>Listeria</i>
	1.3 sporenbildende Stäbchen	<i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i>
	1.4 Coryneforme (incl. Actinomyceten)	Propionsäurebakterien, <i>Corynebacterium</i> , <i>Arthobacter</i> , Actinomycetales (<i>Mycobacterium</i> , Actinomyceten, Streptomyceten, Nocardiaceen)
	1.5 Mycoplasmen	Mycoplasmataceen (<i>M. pneumoniae</i> , <i>M. genitalium</i>)

<i>Taxon/Abteilungen</i>	<i>Untergruppierung</i>	<i>Beispiele</i>
Bakterien		
2. gramnegative Bakterien	2.1 Anaerobe Stäbchen und Kokken	Veillonellaceen und Bacteroidaceen (<i>Porphyromonas</i>)
	2.2 Fakultativ anaerobe	Enterobaktreien (<i>Enterobacter</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Proteus</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> , <i>Shigella</i> , <i>Yersinia</i>) Pasteurellaceen (<i>Pasteurella</i> , <i>Haemophilus</i>), Vibrionen (<i>Vibrio</i>) Aeromonadaceen (<i>Aeromonas</i>), <i>Photobacterium</i> , <i>Flavobacterium</i>
	2.3 Aerobe Kokken und Stäbchen	Neisseriaceen (<i>Moraxella</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Paracoccus</i>), Pseudomonadaceen (<i>Pseudomonas</i> , <i>Xanthomonas</i> , <i>Zoogloea</i> , <i>Acetobacter</i>), Acetobacteraceen + Rhizobiaceen (<i>Rhizobium</i> , <i>Agrobacterium</i>), Methyloomonadaceen (<i>Methylococcus</i> , <i>Bordetella</i>), Legionellaceen, <i>Francisella</i>
	2.4 Spirillen	Spirillaceen, Campylobacteriaceen (<i>Campylobacter</i>), <i>Helicobacter</i>
	2.5 Spirochaeten (helikal, spiralig gewachsene)	Spirochaetaceen (<i>Spirochaeta</i> , <i>Borellia</i>), Trepomenataceen (<i>Trepomena</i>)
	2.6 Anhängseltragende Bakterien	<i>Gallionella</i> , <i>Nevskia</i> , <i>Caulobacter</i> , <i>Pedomicrobium</i>
	2.7 Scheidenbakterien	<i>Sphaerotilus</i> , <i>Leptothrix</i>
	2.8 Cytophagales	Beggiatoaceen, <i>Thiothrix</i> ,
	2.9 Myxobacterales	<i>Myxococcus</i> , <i>Chondromyces</i>
	2.10 Rickettsiales (obligat parasitische Bakterien)	Rickettsiaceen (<i>Rickettsia</i>), Chlamydiaceen (<i>Chlamydia</i>)
	2.11 Chemolithoautotrophe Bakterien	Nitrobacteriaceen (<i>Nitrosomas</i> , <i>Nitrobacter</i>)
	2.12 Photoautotrophe Rhodospirillales	Rhodospirillaceen, Chromatiaceen, Chlorobiaceen, Chloroflexaceen
3. Cyanobacteriota	3.1 Coccogoneae	Chroococcales (<i>Synechococcus</i> , <i>Synechocystis</i> , <i>Microcystis</i>), Chamaesiphonales, Pleurocapsales
	3.2 Hormogoneae	Oscillatoriales, Nostocales, Stigonematales

Taxon/Abteilungen	Untergruppierung	Beispiele
Eukaryonten		
5. Abtl.: Eumycota	3. Klasse: Ascomyceten	<i>Aspergillus</i> , <i>Candida</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Schizosaccharomyces</i> , <i>Penicillium</i>
13. Abtl.: Rhodophyta		
14. Abtl.: Chlorophyta		
15. Abtl.: Bryophyta, Moose		z. B. Funariaceen (<i>Physcomitrella</i>)
16. Abtl.: Pteridophyta, Farne		
17. Abtl.: Spermatophyta	1. Unterabtl.: Coniferophytina (Nadelblättrige Nacktsamer)	Ginkgoopsida (<i>Ginkgo</i>), Nadelhölzer
	2. Unterabtl.: Fiederblättrige Nacktsamer	Samenfarne ...
	3. Unterabtl.: Angiospermen	
	<ul style="list-style-type: none"> • Zweikeimblättrige, Einfurchenpollen • Zweikeimblättrige, Dreifurchenpollen • Einkeimblättrige 	<p>Winteraceen, Lauraceen, Ilicaceen, Piperaceen.</p> <p>Ranunculuidae, Caryophyllidae (<i>Stellaria</i>), Rosidae (<i>Arabidopsis</i>, <i>Brassica</i>, <i>Hevea</i>, <i>Phaseolus</i>), Asteridae.</p> <p>Alismatidae, Aridae, Liliidae, Arecidae, Commelinidae (<i>Oryza</i>).</p>

7.2 Karten der verwendeten Vektoren

7.2.1 Karten der Klonierungs- und Sequenzierungsplamide

7.2.1.1 *pBluescript® II SK(-) und pBlueT*

Die Angaben befinden sich auf der beiliegenden CD-ROM unter /literatur/Stratagene.

7.2.1.2 *pGem3Zf(+)*®

Die Angaben befinden sich auf der beiliegenden CD-ROM unter /literatur/Promega.

7.2.1.3 *pCR®2.1-TOPO*

Die Angaben befinden sich auf der beiliegenden CD-ROM unter /literatur/Invitrogen.

7.2.1.4 *pGem-Teasy*®

Die Angaben befinden sich auf der beiliegenden CD-ROM unter /literatur/Promega.

7.2.2 Expressionsplasmide

7.2.2.1 *pBargpe1*

Daten zum Vector sind im Internet unter www.fgsc.net/fgn/pall.html erhältlich. Die Internetseite mit Stand vom 10.07.2002 ist ferner auf der CD unter /literatur/pBargpe abgelegt

7.2.2.2 *pMal-c2*®, NEB

Die Angaben befinden sich auf der beiliegenden CD-ROM unter /literatur/NEB.

7.2.2.3 pQE30_{Yeast}®30

Die Angaben befinden sich auf der beiliegenden CD-ROM

7.3 Herstellerangaben

7.3.1 Herstellerangaben – DNA-Extraktion aus Agarose-Gel

Die Angaben befinden sich als pdf-Datei auf der beiliegenden CD-ROM unter /literatur/Qiagen.

7.3.2 Herstellerangaben – Wizard-Plus® Plasmid Isolierung, Promega

Die Angaben befinden sich als pdf-Datei auf der beiliegenden CD-ROM unter /literatur/Promega.

7.3.3 Herstellerangaben – TOPO TA Cloning®, Invitrogen

Die Angaben befinden sich als pdf-Datei auf der beiliegenden CD-ROM unter /literatur/Invitrogen.

7.3.4 Herstellerangaben – pGemT-Easy® Cloning, Promega

Die Angaben befinden sich als pdf-Datei auf der beiliegenden CD-ROM unter /literatur/Promega.

7.3.5 Herstellerangaben – QuickPrep® Micro mRNA Purification Kit, Pharmacia Biotech

Die Angaben befinden sich als pdf-Datei auf der beiliegenden CD-ROM unter /literatur/Amersham.

7.3.6 Herstellerangaben – Ready To Go RT-PCR Beads, Pharmacia Biotech

Die Angaben befinden sich als pdf-Datei auf der beiliegenden CD-ROM unter /literatur/Amersham.