

7. STORM 860, Software: "Scanner Control Version 4.1", "Image Quant Version 4.1"
(Molecular Dynamics)
8. Ultrazentrifuge LE- 70 (Beckmann)
9. UV StratalinkerTM 2400 (Stratagene)
10. "Waring Blendor" (Standmixer, Waring Products Division Dynamics Corporation of
America)
11. Weißlichtscanner (Pdi), TINA-Programm (Raytest)

2.12 Spezielle Materialien

1. "Bio-Assay"-Schalen, 22 x 22 cm (Nunc)
2. Dialysierschlauch (Serva)
3. Filterpapier (Whatman)
4. Hybond N+ Nylonmembran (Amersham)
5. Mikrotiterplatten, 384er (Genetix, Nunc)
6. Nitrozellulosemembran BA 85 (Schleicher und Schüll)
7. Phosphor Screen (Imagefolie, Kassette) (Molecular Dynamics)
8. Röntgenfilme (Retina)
9. "SizeSep 400 Spun Columns" (Pharmacia Biotech)
10. Verstärkerfolien (Perlux)
11. Zeichentusche, schwarz (Pelikan)

3. Methoden

3.1 Normalisierung von anti-ABA-scFv transgenen Pflanzen durch Behandlung mit Abscisinsäure

3.1.1 Anzucht der Pflanzen und Behandlung mit Abscisinsäure

Anti-ABA scFv Immunglobulintransgene Pflanzen verschiedener Linien (RA 5/1, RA 16/7 und *in vitro*-Klon RA 27) sowie als Kontrollen anti-Oxazolone scFv transgene Pflanzen (Linien UF 9/13 und 9/38) und Wildtyppflanzen (SNN) wurden in verschiedene Behandlungsexperimente mit Abscisinsäure einbezogen.

Für einen ersten Behandlungsversuch, in dem eine geeignete ABA-Konzentration sowie der zeitliche Ablauf der Behandlung ermittelt werden sollte, wurden Samen von Wildtyp-tabak SNN und der transgenen Linien RA 5/1, RA 16/7, 9/13 und 9/38 zur Keimung auf MS-Medium ausgelegt. Nach einer Woche wurde ein Teil der Sämlinge jeder Linie auf MS-Medium mit Zusatz von 10 μM ABA bzw. 50 μM ABA umgesetzt. Nach 4 Wochen wurden die Pflanzen in Erde getopft und in die Phytokammer überführt. Hier erfolgte die weitere Behandlung durch tägliches Besprühen der Pflanzen mit Wasser oder 10 μM bzw. 50 μM ABA-Lösung über weitere 9 Wochen hinweg. Dabei wurden die Pflanzen so kombiniert, daß jeweils ein Teil der in den ersten vier Wochen unbehandelten und mit ABA in beiden Konzentrationen behandelten Pflanzen in die drei möglichen Besprühgruppen eingeteilt wurden.

In einem zweiten Behandlungsexperiment wurden *in vitro* auf MS-Medium angezogene anti-ABA scFv transgene Pflanzen der Linie RA 27 sowie Wildtyppflanzen SNN in Erde getopft und über 9 Wochen hinweg täglich mit Wasser bzw. 50 μM ABA besprüht.

Weitere Behandlungsexperimente mit RA 27 und dem Wildtyp als Kontrolle, die im Ablauf dem zweiten Experiment entsprachen, wurden durchgeführt, um Pflanzen zur RNA-Isolierung aus Gesamtblatt und Schließzellen sowie zur elektronenmikroskopischen Untersuchung der Schließzellen anzuziehen.

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte in der Phytokammer unter definierten Bedingungen (18°C, 95% relative Luftfeuchtigkeit, Beleuchtungsdauer 16 h, Beleuchtungsintensität 30 % bzw. 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

3.1.2 Biochemische und physiologische Untersuchungen

3.1.2.1 Nachweis des scFv-Proteins mittels "Western blot"

Die Proben für die Bestimmung des scFv-Gehaltes (Conrad et al., 1998) wurden in der 8. bzw. 6. Behandlungswoche (erstes bzw. zweites Behandlungsexperiment) genommen.

Zum Nachweis der rekombinanten Proteine wurden die Blattscheiben (ca. 20 bis 30 mg Frischgewicht) in einem Eppendorf-Gefäß unter Zugabe von 100 μl SDS-Probenpuffer mit Hilfe einer entsprechend geformten Eppendorf-Mikropistille, die in eine Bohrmaschine eingespannt wurde, homogenisiert. Das Homogenisat wurde 10 min gekocht und 15 min bei 14.000 g zentrifugiert (Sambrook et al., 1989). Der Proteingehalte des Überstandes

(gesamtlösliches Protein) wurde mit dem "Bio-Rad-protein assay"-Kit nach Bradford (1976) bestimmt.

Die Auftrennung der Proteine (in Abhängigkeit von der scFv-Konzentration 6 bis 40 µg) erfolgte in einem 12,5 %igen Polyacrylamidgel (Sambrook et al., 1989). Um eine spätere Quantifizierung zu ermöglichen, wurde als Standardkontrolle ein gereinigtes scFv-Protein bekannter Konzentration in verschiedenen Verdünnungsstufen aufgetragen. Nach dem Transfer der Proteine auf Nitrozellulose (10 h, 18 V) wurden die Membranen über Nacht bei 4°C in 0,4 %igem Marvel-Puffer (180 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8, 0,4% Marvel) inkubiert. Zur Detektion der scFv-Proteine wurden die Filter zunächst 2 h bei Raumtemperatur mit einem anti-c-myc monoklonalen Antikörper (Munroe und Pelham, 1986) und anschließend 1 h 45 min mit einem anti-Maus-Immunglobulin-Peroxidase-Konjugat (Amersham) inkubiert. Nach dem Waschen konnten die scFv-Proteine auf dem Filter mit Hilfe des "ECL"-Systems (Amersham) enzymatisch detektiert werden. Die Röntgenfilme wurden mit einem Weißlichtscanner eingelesen. Anschließend wurden die scFv-Proteine durch Vergleich mit der Standardkontrolle quantifiziert (TINA-Programm).

3.1.2.2 Bestimmung des Gesamt-ABA-Gehaltes

Die Quantifizierung der Gesamt-ABA-Konzentration erfolgte wie bei Conrad et al. (1998) beschrieben. Die Blattproben wurden im ersten Behandlungsexperiment in der 8. bis 11. Woche (1.ABA-Wert) sowie in der 13. Woche (2.ABA-Wert), im zweiten Behandlungsversuch in der 6. Woche (1.ABA-Wert) bzw. in der 9. Woche (2.ABA-Wert) genommen. Die Blattscheiben der zu testenden Tabakpflanzen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren, pulverisiert und in 1 ml 80 % Aceton resuspendiert. Nach der Extraktion (24 h, 4°C, unter Schütteln im Dunkeln) und der Zentrifugation wurde der ABA-Gehalt des Überstandes in einem ABA-ELISA getestet. In Vorbereitung wurden die ELISA-Platten mit Kaninchen anti-Maus Immunglobulin (Sigma) verdünnt in 0,05 M Carbonatpuffer beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen der Platten erfolgte die Zugabe von Maus anti-ABA monoklonalem Antikörper 15-I-C5 verdünnt in PBST und die Inkubation bei 4°C über Nacht. Nach dem Waschen wurden die Proben bzw. eine Standard (+)-*cis, trans*-ABA (Sigma)- Lösung, vermischt mit ABA-alkalische Phosphatase-Konjugat (Herstellung nach Weiler, 1986) in PBST zugegeben. Es folgte eine Inkubation bei 4°C über Nacht. Die enzymatische Reaktion wurde mit

p-Nitrophenylphosphat (1 g l^{-1} in $0,05 \text{ M}$ Carbonatpuffer) bei 37°C für 1 h durchgeführt. Die optische Dichte wurde bei 405 nm mit einem Dynatech MR 7000 gemessen.

Durch Vergleich der gemessenen optischen Dichte mit der auf jeder ELISA-Platte angelegten Standardkurve (Bereich von 1 bis 200 pg pro Vertiefung) und den Bezug dieses Wertes auf das Frischgewicht der Blattscheiben erhält man den Gesamt-ABA-Gehalt in ng g^{-1} Frischgewicht.

3.1.2.3 Berechnung der theoretisch freien ABA

Die theoretisch freie ABA kann mit Hilfe der folgenden Gleichung nach Neri et al. (1996)

$$K_d = \frac{[\text{scFv}] \times [\text{ABA}]}{[\text{scFv ABA Komplex}]}$$

berechnet werden. Diese Formel resultiert aus der Gleichgewichtsreaktion zwischen dem freien monovalenten Antikörper und dem freien Antigen sowie dem Antigen-Antikörperkomplex. Das Gleichgewicht wird durch die Dissoziationskonstante K_d charakterisiert.

Zur Lösung der Gleichung wurden die Werte für die Konzentration des scFv (in % TSP) sowie für Gesamt-ABA (in ng g^{-1} Frischgewicht) in Molaritäten umgerechnet. Für die Berechnungen wurde die Dichte der Blätter der von Wasser gleichgesetzt. Somit ist mol / kg equivalent zu M .

Die Dissoziationskonstante K_d des anti-ABA scFv-Antikörpers gegenüber freier ABA ($1,5 \times 10^{-9} \text{ M}$) wurde mittels Kompetitions-ELISA des aus Tabakblättern isolierten und affinitätsgereinigten scFv-Proteins bestimmt (Artsaenko et al., 1995).

Der Gehalt an theoretisch freier ABA resultiert aus der Subtraktion der Konzentration des scFv-ABA-Komplexes von der Gesamt-ABA-Konzentration.

3.1.2.4 Gaswechselfmessungen

Das physiologische Verhalten der Tabakpflanzen wurde anhand von Gaswechselfmessungen im ersten Behandlungsversuch in der 9. bis 13. Woche, im zweiten Experiment in der 8. bis 9. Woche untersucht.

Die Messungen der Transpirationsraten wurden von M. Peisker am IPK Gatersleben, wie in Wigger et al. (in Vorbereitung) beschrieben, durchgeführt. Die stomatären Leitfähigkeiten in Abhängigkeit von der Kohlendioxidkonzentration und der Lichtintensität wurden aus der Transpirationsrate und der Blattemperatur in Anlehnung an von Caemmerer und Farquhar (1981) berechnet.

Die Gleichgewichtswerte für die Transpirationsrate und die stomatäre Leitfähigkeit der Blätter wurden zunächst bei einer konstanten Photonenfluxdichte von $370 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und zwischen 600 und 330 ppm variierenden Kohlendioxidgehalten bestimmt. Anschließend wurden die Messungen bei CO_2 -Konzentrationen von etwa 330 ppm und variierenden Photonenfluxdichten zwischen 650 und $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durchgeführt.

3.2 Molekularbiologische Standardprozeduren

Plasmid- und Cosmidpräparationen

Die Präparation von Plasmid-DNA im kleinen ("Minipreps") und im größeren ("Midipreps") Maßstab durch alkalische Lyse wurde in Anlehnung an Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Die Cosmidpräparationen erfolgten unter Verwendung des "Qiagen Mini"- bzw. "Midi"-Kits nach den entsprechenden Empfehlungen für Cosmidisolationen.

Isolation der Gesamt-DNA aus *E.coli*

Das Bakterienpellet aus 10 ml Übernachtskultur wurde zentrifugiert, in 500 μl TE-Puffer resuspendiert und mit 28 μl Lysozym-Lösung (10 mg/ml) sowie 17 μl RNase A (5 mg/ml) für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 500 μl 1,6 % N-laurylsarcosyl in TE-Puffer und 6 μl Proteinase K (10 mg/ml) zugegeben und bei 50°C bis zur Klärung der Lösung inkubiert. Es schlossen sich die folgenden Extraktionsschritte an: 2 x Phenol, 2 x Phenol/Chloroform, 1 x Chloroform. Die Gesamt-DNA wurde mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetatlösung und 2,5 Volumen Ethanol 1 h bei -80°C ausgefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen und in 80 μl TE-Puffer resuspendiert.

Elektrophoresen, DNA-Transfer und DNA-Quantifizierung

Die Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophoresen sowie der DNA-Transfer von Agarosegelen auf Nitrozellulose oder Nylonmembranen unter alkalischen Bedingungen ("Blotting") wurden nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt.

Für die Extraktion und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der "DNA Gel Extraction Kit" (Qiagen) verwendet.

Die Quantifizierung der DNA erfolgte im Ethidiumbromid-Platten-Test (Handbuch "cDNA-Synthesis Kit", Stratagene).

Sequenzierungen

Die DNA-Sequenzierungen wurden von S. König am IPK Gatersleben unter Verwendung von Fluorescein-markierten Primern mit einem A.L.F. DNA-Sequencer (Pharmacia) durchgeführt.

3.3 Cosmidbank TLC

3.3.1 Isolation hochmolekularer genomischer DNA

Zur Präparation hochmolekularer genomischer DNA aus Wildtyp-Tabakblättern wurde eine modifizierte Methode nach Thompson et al. (1983) genutzt. 6 x 10 g Blattmaterial junger *in vitro*-Wildtyppflanzen SNN wurde in flüssigem Stickstoff zu feinem Puder zermörsert, in jeweils 70 ml Extraktionspuffer aufgenommen und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das resultierende Lysat wurde zunächst mit Phenol, zweimal mit Phenol/Chloroform und anschließend mit Chloroform extrahiert. Die wäßrige Oberphase wurde in einer Petrischale mit dem gleichen Volumen an Ethanol überschichtet und die ausfallende hochmolekulare DNA mit einem Glasstab aufgewickelt. Die DNA wurde über Nacht bei 4°C in einem mit 0,1 % SDS versetzten TE-Puffer gelöst.

Die hochmolekulare DNA wurde in einer Cäsiumchlorid-Ethidiumbromid-Gradienten-Zentrifugation (Refraktionsindex 1,3860; Sambrook et al., 1989) für 24 h bei 45.000 rpm und 15°C gereinigt. Nach Entnahme der chromosomalen hochmolekularen DNA-Fraktion wurde das Ethidiumbromid durch fünfmaliges Ausschütteln mit n-Butanol sowie das Cäsiumchlorid durch eine ausgedehnte Dialyse (1 x 1h, 3 x 24h) in TE-Puffer bei 4°C entfernt (Sambrook et al., 1989). In einer Pulsfeld-Gelelektrophorese (Rotaphor; Sambrook

et al., 1989) konnte eine Größe der genomischen Fragmente von ca. 150 kb nachgewiesen werden. Die hochmolekulare DNA wurde in Vorbereitung auf die Ligation partiell mit MboI gespalten. In einer Testrestriktion konnten Enzymkonzentration (0,1 U / μ g DNA) und Reaktionszeit (10 min) optimiert werden.

3.3.2 Herstellung und erste Charakterisierung der Cosmidbank

Die Cosmidbank TLC ("tobacco leaf cosmids", Tabakblatt-Cosmide) wurde mit Hilfe des "SuperCos 1 Cosmid Vector Kits" und des "Gigapack II XL"-Verpackungsextraktes der Firma Stratagene hergestellt. Die Vorgehensweise entsprach den Empfehlungen der Herstellerfirma.

Die genomischen Fragmente wurden mit CIAP dephosphoryliert und mit dem vorbereiteten SuperCos 1 Cosmid-Vektor in 7 Ansätzen mit T4 DNA-Ligase zu hochmolekularen Concatemeren ligiert. Mit Hilfe des Verpackungsextraktes wurde die genomische DNA in 42 Ansätzen gröbenselektiv (40-50 kb) in λ -Phagenpartikel verpackt. Bakterielle Wirtszellen XL1-Blue MR wurden mit den Phagenpartikeln infiziert und amplifiziert. Die Lagerung der Cosmidbank erfolgte in Aliquoten bei -80°C .

Für einen ersten Test auf Rekombinanz der Cosmidklone wurde von 18 zufällig ausgewählten Klonen die Gesamt-DNA isoliert, mit EcoRI gespalten, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und die Membran mit radioaktiv markierter genomischer Tabak-DNA hybridisiert (siehe 3.7.1) .

3.3.3 Ordnen der Cosmidbank durch "Picking" und "Spotting"

Das Ordnen von 54.000 Cosmidklonen durch "Picking" und "Spotting" wurde mit Unterstützung des Ressourcenzentrums des MPI für Molekulare Genetik in Berlin durchgeführt.

Die Bakteriensuspension wurde auf einen Titer von ca. 5000 cfu / ml eingestellt und in 1 ml-Aliquoten auf 22 x 22 cm große Agarplatten (1YT-Agar, 50 μ g / ml Ampicillin) ausplattiert. Um eine gleichmäßige Verteilung der Kolonien zu erzielen, wurden zum Ausplattieren Glasperlen (5 mm Durchmesser) verwendet. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei 37°C . Mit Hilfe von sterilisierbaren Nadeln eines "Picking"-

Roboters (entwickelt am MPI für Molekulare Genetik, Berlin) wurden die Bakterienkolonien von den Agarplatten in die Vertiefungen von 384er Mikrotiterplatten (Flüssigmedium: 2YT, 1 x HMF, 50 µg / ml Ampicillin) überführt. Dabei werden die Kolonien vom Roboter mittels einer Kamera visualisiert und entsprechend ihrer Form und Größe ausgewählt. Die Inkubation der Mikrotiterplatten erfolgte über Nacht bei 37°C, die weitere Lagerung bei – 80°C.

Von den 144 "gepickten" Mikrotiterplatten ("master plates", Originalplatten) wurden durch manuelle Replikation drei Kopien hergestellt.

Die 54.000 genomischen Klone der dritten Kopie (Q03), nun in geordneter Form in 144 Mikrotiterplatten vorliegend, wurden mit Hilfe eines "Spotting"-Roboters (entwickelt am MPI für Molekulare Genetik, Berlin) auf zwei Chargen von Nylon N+ -Membranen (22 x 22 cm) überführt. Die Koloniefilter wurden im Spottingmuster 5 x 5 hergestellt, d.h. die kleinste Spotting-Einheit besteht aus einem Quadrat von 25 "Spots". Die zentrale Position der einzelnen Quadrate, belegt mit einem Tinten-"Spot", dient als Orientierungshilfe. Diese Tintenpunkte bilden auf dem Koloniefilter ein 48 x 48 Muster, wobei jeder Tintenpunkt von 12 verschiedenen jeweils doppelt "gespotteten" Klonen umgeben ist. Das Doppel-"spotting" ist wichtig, um positive Signale von Hybridisierungsartefakten unterscheiden zu können. Folglich enthält jeder Koloniefilter 27.000 jeweils doppelt "gespottete" Cosmidklone. Aus der Anordnung jedes Klonpaares bezüglich des Tintenpunktes und der Position auf den Filtern kann eindeutig Rückschlus auf die Position dieses Klons innerhalb der Mikrotiterplatten gezogen werden.

Anschließend wurden die Filter auf Agarplatten (1YT- Agar, 50 µg / ml Ampicillin) aufgelegt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die Cosmidbank ist unter der Bezeichnung TLC 126 am RZPD (Ressourcenzentrum, Primärdatenbank) in Berlin in Form von hochdichten Koloniefiltern und Einzelklonen erhältlich.

3.3.4 Prozessierung der Koloniefilter (Cosmide und Plasmide)

Die Prozessierung der Koloniefilter erfolgte nach einer modifizierten Methode nach Hoheisel et al. (1991). Zur Denaturierung und Neutralisierung wurden die mit Kolonien bewachsenen Membranen auf mit den jeweiligen Lösungen angefeuchtetes Filterpapier gelegt. Die Denaturierung erfolgte zunächst 4 min bei Raumtemperatur, dann weitere

4 min bei 95°C. Es folgte eine vierminütige Neutralisierung bei Raumtemperatur. Zur Proteolyse wurden die Filter 30 bis 40 min untergetaucht in 600 ml Pronase-Puffer mit 0,25 mg / ml Pronase bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Filter 2 Tage bei Raumtemperatur getrocknet, UV-behandelt ("auto-cross-link", 120 mJ) und zwischen trockenem Filterpapier gelagert.

3.4 Präparation der komplexen cDNA

3.4.1 Präparation epidermaler Fragmente

Die Präparation der epidermalen Fragmente erfolgte in Anlehnung an Kopka et al. (1997). Von vier bis fünf Tabakpflanzen wurden die Blätter, mit Ausnahme der sehr jungen und seneszenten, geerntet, die Hauptadern entfernt und die Blattstücke in destilliertem Eiswasser gesammelt. Die Blattstücke wurden im 1l-Becher eines "Waring Blendor"-Standmixers durch vier Pulse der Stufe "high" für 15 s mit jeweils 15 s Pause zerkleinert. Anschließend wurde die Suspension durch ein 220 µm-Nylonsieb filtriert und der Überstand mehrmals mit destilliertem Eiswasser gespült. Es folgte eine weitere Zerkleinerung des Überstandes in einem 250 ml-Becher des "Waring Blendors" durch fünf Pulse der Stufe "low" für 15 s mit jeweils 15 s Pause. Die Suspension wurde durch ein 220 µm-Nylonsieb filtriert und der Überstand mit destilliertem Eiswasser gespült. Die erhaltenen epidermalen Fragmente wurden unter einem Mikroskop auf Kontaminationen durch Mesophyll untersucht, ausgewogen und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.4.2 GTC- RNA- Extraktion

Für die Isolation der Gesamt-RNA aus Blättern und epidermalen Fragmenten wurde eine modifizierte Methode nach Chomczynski et al. (1987) verwendet.

Das Blattmaterial wurde unter Zugabe einer Spatelspitze DTT-Pulver auf 1 bis 3 g Probe in flüssigem Stickstoff zermörsert.

Für die RNA-Extraktion aus epidermalen Fragmenten erfolgte die Zerkleinerung in gefrorenem Zustand in einer Kugelmühle (Retsch) für 5 min unter Zugabe einer Spatelspitze DTT.

Das Probenmaterial wurde in 5 bis 6 Volumen GTC-Lysepuffer (4 M Guanidiniumthiocyanat, 25 mM Natriumcitrat pH 7, 0,5 % N-laurylsarcosyl) überführt. Im Anschluß an eine Ansäuerung mit 1/10 Volumen 2 M Natriumacetat pH 4 wurde eine Extraktion mit 1 Volumen Phenol und 0,2 Volumen Chloroform-Isoamylalkohol durchgeführt. Die Proben wurden 15 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert (4000 x g, 20 min, Raumtemperatur). Es schloß sich eine zweimalige Extraktion des wäßrigen Überstandes mit Chloroform-Isoamylalkohol an. Die mit Hilfe von Isopropanol (über Nacht, 4°C) ausgefällte RNA wurde zentrifugiert und das Pellet in 1-2 ml TES- Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8, 0,5 % SDS) bei 65°C resuspendiert. Der zentrifugierte Überstand wurde mit 2 Volumen 4 M Lithiumacetat über Nacht bei 4°C gefällt. Nach einer Zentrifugation wurde das RNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und in DEPC-Wasser resuspendiert. Die Quantifizierung der Gesamt-RNA erfolgte durch Messung der OD bei 260 nm, die Reinheit wurde durch das Verhältnis OD_{260} / OD_{280} beurteilt.

Die gelelektrophoretische Auftrennung der Gesamt-RNA erfolgte nach einer Denaturierung mit Glyoxal und Dimethylsulfoxid (Sambrook et al., 1989).

3.4.3 Reinigung der mRNA

Die Reinigung der polyadenylierten mRNA aus der Gesamt-RNA erfolgte an Oligo (dT)-Zellulose ("mRNA Purification Kit", Pharmacia).

3.4.4 Synthese der komplexen cDNA

Für die Synthese der doppelsträngigen cDNA aus polyadenylierter RNA wurde der "cDNA Synthesis Kit" der Firma Stratagene verwendet. Die Erst- und Zweitstrangsynthese wurde dem Handbuch der Herstellerfirma entsprechend durchgeführt. Jeweils 5 µg mRNA wurde in Anwesenheit von Nukleotiden, dem Erststrangpuffer und dem Linker-Primer mit MMLV-Reverser Transkriptase in einzelsträngige cDNA umgeschrieben (1 h, 37°C). Der Zweitstrang wurde in einer Reaktion mit DNA-Polymerase I synthetisiert (2,5 h, 16°C).

In einem Versuch zur Modifikation der cDNA-Synthese wurden für die Erststrangsynthese ein Oligo (dT)₂₅ -Primer (Pharmacia) sowie die bei höheren Temperaturen (42°C) aktive "Expand Reverse Transcriptase" (Boehringer Mannheim) verwendet.

Die komplexe cDNA wurde in Aliquoten bei -80°C gelagert.

3.5 Stomata cDNA-Bank TStP

3.5.1 Herstellung der Stomata cDNA-Bank TStP

Wildtyppflanzen SNN wurden als *in vitro*- Klone auf MS-Medium angezogen und anschließend in Erde 5 Wochen im Gewächshaus kultiviert. Die Präparation der epidermalen Fragmente, die GTC-RNA-Extraktion und mRNA-Reinigung sowie die cDNA-Synthese erfolgten wie unter 3.4 beschrieben. Nach dem "Blunting" der Enden wurde die cDNA mit Hilfe von "Size Sep 400 Spun Columns" (Pharmacia) größenfraktioniert, in den Uni-ZAP XR-Vektor (Stratagene) kloniert und mit Hilfe des "Gigapack III Gold"-Verpackungsextraktes in λ -Phagenpartikel verpackt.

Ein Teil der Phagenbank wurde einer Massen-Excision mit Hilfe des ExAssist-Helferphagen unterzogen und die erhaltenen Phagemide (Vektor pBluescript[®] SK(+/-)) in SOLR-*E.coli*-Zellen transformiert. 27.000 der resultierenden bakteriellen cDNA-Klone wurden durch "Picking" und "Spotting" geordnet.

3.5.2 Ordnen der cDNA-Bank durch "Picking" und "Spotting"

Das Ausplattieren von etwa 5000 Klonen pro Agarplatte erfolgte wie in 3.3.3 beschrieben. Mit Hilfe des "BioPick"-Roboters (BioRobotics) wurden 27.000 schließzellspezifische cDNA-Klone in insgesamt 72 Mikrotiterplatten (384er Format) überimpft. Von diesen Originalplatten (TStP 1–72) wurde unter Verwendung des Replikationsprogrammes des "BioGrid"-Roboters (BioRobotics) eine Kopie (Copy TStP 1–72) angelegt. Diese Kopie diente als Vorlage zum "Spotting" und zur Entnahme interessanter cDNA-Klone.

Mit Hilfe des "BioGrid"-Roboters wurden die 27.000 Klone jeweils in Doppel-"Spots" auf Nylon N+-Membranen übertragen (Spottingdichte 5 x 5). Im Gegensatz zu den Cosmidfiltern wurden die Tintenpunkte nicht zentral, sondern neben der unteren linken Ecke der einzelnen 5 x 5 Quadrate plaziert. Die Inkubation der Filter erfolgte über Nacht bei 37°C . Die Prozessierung der Koloniefilter wurde wie in Kapitel 3.3.4 beschrieben durchgeführt.

3.6 cDNA-Plasmid-"Arrays" für die "reversed Northern"-Analyse

Von den durch "reversed Northern" zu testenden cDNA-Klonen wurden zunächst Plasmid-Präparationen in größerem Maßstab (50 ml Anzuchtvolumen, Ausbeute mind. 150 µg Plasmid) nach der Methode der alkalischen Lyse (Sambrook et al., 1989) hergestellt.

Die Konzentration der isolierten Plasmide wurde einheitlich auf 1,5 µg/µl eingestellt.

Die Plasmide wurden in jeweils drei Verdünnungsstufen (Konzentrationen 1,5 µg/µl, 750 ng/µl und 375 ng/µl) und Volumina von 85 µl in die Vertiefungen von Mikrotiterplatten (384er Format) eingefüllt. Als "Leitklone", die in der Hybridisierung ein sehr starkes Signal geben, wurden für Blatt ein Cab 21-Transkript und für Schließzellen eine cDNA, codierend für ein prolinreiches Protein StGCPRP (Konzentration 500 ng/µl und 50 ng/µl), ausgewählt. Um eine gute Orientierung auf dem zu erstellenden Filter zu ermöglichen, wurden einige Vertiefungen der Mikrotiterplatten mit Tinte (Zeichentusche, Pelikan) gefüllt.

Mit Hilfe des "BioGrid"-Roboters wurden die Plasmide im Muster 2 x 2 auf Nylon N+-Membranen übertragen. Um die DNA-Menge auf dem Filter zu erhöhen, wurde jede Verdünnungsstufe achtmal auf dieselbe Stelle der Nylonmembran "gespottet". Anschließend wurden die Filter kurz getrocknet, 3 min auf mit Denaturierungslösung angefeuchtetem Filterpapier denaturiert und zweimal 3 min neutralisiert. Nach dem Trocknen bei Raumtemperatur erfolgte die UV-Behandlung ("auto-cross-link") und die Lagerung zwischen trockenem Filterpapier. Die Mikrotiterplatten wurden bei -80°C gelagert.

3.7 Hybridisierungen und Auswertung

3.7.1 Hybridisierung der Kolonie- und Plasmid-Filter mit radioaktiv markierten Sonden

Die Koloniefilter wurden in 2 x SSC eingeweicht und vorsichtig von Zellresten befreit.

Die Vorhybridisierung erfolgte über Nacht oder mindestens 6 h bei 65°C in Church-Puffer. Unter Verwendung des "MegaprimeTM DNA Labelling Systems" (Amersham) wurden die als Sonden dienende komplexen cDNAs und Plasmid- bzw. Cosmid-Inserts radioaktiv mit [$\alpha^{32}\text{P}$] dATP (Blatt) bzw. [$\alpha^{33}\text{P}$] dATP oder [$\alpha^{33}\text{P}$] dCTP (epidermale

Fragmente) markiert. Die Abtrennung der freien Nukleotide von der markierten DNA erfolgte in Acrylex-Säulen. Nach der Denaturierung (10 min 100°C) wurde die radioaktiv markierte Sonde der Hybridisierungslösung (Church-Puffer, 100 µg / ml denaturierte Heringssperma-DNA, 1/10 Volumen 10 % Blockierungsreagens) zugesetzt. Die Hybridisierung erfolgte ca. 24 h bei 65°C. Die hybridisierten Filter wurden nach folgendem Protokoll gewaschen:

- viermal kurz mit Waschlösung 1 (2 x SSC, 0,5 % SDS) bei Raumtemperatur,
- zweimal mit Waschlösung 2 (1 x SSC, 0,1 % SDS) für ca. 1 h bei 65°C,
- bei Bedarf weiter mit Waschlösung 3 (0,2 x SSC, 0,5 % SDS) bei 65°C.

Die Exposition erfolgte auf einer Phosphor-Imagefolie (Molecular Dynamics, bei ³²P etwa 1 bis 2 Tage, bei ³³P ca. 4 bis 5 Tage, Raumtemperatur) bzw. auf Röntgenfilm mit Verstärkerfolie bei -80°C.

Zwischen den einzelnen Hybridisierungen wurden die radioaktiv markierten Sonden durch "Strippen" von den Membranen entfernt:

- 5 min Striplösung 1 (2 x SSC) bei 80-90 °C,
- 20 min Striplösung 2 (0,4 M NaOH, 0,1 % SDS) bei 65°C,
- zweimal 15 min Striplösung 3 (0,1 M Tris-HCl pH 7,4, 2 x SSC, 0,1 % SDS) bei Raumtemperatur.

Die Lagerung der Membranen erfolgte in 2 x SSC bei 4°C.

3.7.2 Hybridisierung von Plasmidfiltern mit nichtradioaktiv markierten Sonden

Für nichtradioaktive Hybridisierungen wurde die Sonden-DNA mittels "DIG DNA Labelling and Detection Kit" (Boehringer Mannheim) mit Digoxigenin-dUTP markiert. Die Hybride konnten über die Bindung eines Anti-Digoxigenin-alkalische Phosphatase-Konjugates und die sich anschließende enzymatische Spaltung des AttoPhos-Substrates (Boehringer Mannheim) nachgewiesen werden. Das fluoreszierenden Spaltungsprodukt wurde durch Einscannen am STORM 860 (Molecular Dynamics) bei einer Anregungswellenlänge von 440 nm detektiert.

Vorhybridisierungen, Hybridisierungen, Strippen und Lagerung der Membranen erfolgten wie unter 3.7.1 dargelegt.

3.7.3 Qualitative und quantitative Auswertung der Images

Die exponierten Phosphor-Imagefolien wurden mit dem Programm "Scanner Control Version 4.1" des STORM 860 (Molecular Dynamics) eingelesen. Dafür wurde am Phosphorscanner 100 Micron (100 Datenpunkte / cm) als Parameter für die Pixelgröße (Bildpunktgröße) eingestellt. Die entstehenden "gel"-Dateien (16 bit) besitzen eine Größe von ca. 13 MB. Im Programm "Image Quant Version 4.1" (Molecular Dynamics) wurde eingestellt, wie die als radioaktives Signal detektierten Pixelintensitäten auf dem Bildschirm angezeigt werden sollten. Den stärksten radioaktiven Signalen ("High"-Wert) wird Schwarz und den schwächsten radioaktiven Signalen ("Low-Wert") Weiß zugeordnet, so daß ein Graustufenbild entsteht. Die Bilddateien hochdichter Koloniefilter wurden in das 8 bit-Format konvertiert ("tif"-Dateien) und qualitativ (visuell) im Bildbearbeitungsprogramm "Photoshop"(Microsoft) analysiert und miteinander verglichen.

Für die quantitative Analyse der hochdichten cDNA-Koloniefilter sowie der "reversed Northern"-Filter (als 16 bit "gel"-Dateien) wurde das Programm "Array Vision" verwendet. Entsprechend den Spottingmustern auf den Filtern (5 x 5 bei Koloniefiltern bzw. 2 x 2 beim "reversed Northern") werden spezielle Gitter konstruiert, die durch sogenannte Primär- und Sekundärelemente definiert werden. Als Primärelemente werden die einzelnen Quadrate bezeichnet, die 2 x 2 bzw. 5 x 5 Klone enthalten. Sekundärelemente sind die innerhalb dieser Quadrate angeordneten Klone. Obwohl die Kolonie- und cDNA-"Spots" in regelmäßigen Mustern angeordnet sind, lassen sich Abweichungen innerhalb eines Filters bzw. zwischen verschiedenen Filtern technisch nicht vermeiden (z.B. durch ungleichmäßige Anordnung der einzelnen Nadeln im "Spotting"-Werkzeug, Verzerrung der Filter während der Exposition). Daher wurden die flexiblen Gitter jedem einzelnen Filtern manuell (bei hochdichten Klonanordnungen) oder automatisch ("Autoalignment", bei weniger dichten "Spots") angepaßt. Auf diese Weise kann die Signalintensität jedes einzelnen "Spots" gemessen werden. Erfasst wurden zunächst die Mittelwerte der Pixelintensitäten jedes "Spots", multipliziert mit dessen Fläche. Der lokale Hintergrund wurde als Begrenzungsfläche der einzelnen Primärelemente definiert und anteilmäßig vom Intensitätswert abgezogen.