

# Molekularbiologische und physiologische Untersuchungen zum Phosphattransport bei *Geosiphon pyriformis*

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt  
zur  
Erlangung des akademischen Grades eines  
Doctor rerum naturalium  
genehmigte Dissertation von

Frank Volz  
aus Brensbach / Nieder-Kainsbach

Berichterstatter: Prof. Dr. M. Kluge  
Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Ullrich

Tag der Einreichung: 16. März 2004  
Tag der mündlichen Prüfung: 14. Mai 2004

## Danksagung

Während der Durchführung der vorliegenden Arbeit am Institut für Botanik der Technischen Universität Darmstadt haben mich viele Kolleginnen und Kollegen tatkräftig unterstützt, wofür ich mich herzlich bedanken möchte.

**Ein besonderes „Danke schön!“ gilt:**

**Prof. Dr. Manfred Kluge** für die Überlassung des Themas, das für mich im höchsten Maß fordernd war und die ständige Bereitschaft, sich mit allen auftretenden Problemen konstruktiv auseinanderzusetzen.

**Prof. Dr. Wolfram Ullrich** für die Übernahme des Koreferats.

**Dr. Hans Gehrig**, ohne dessen Zutun diese Arbeit nie zustande gekommen wäre. Er besaß durch seinen Ideenreichtum die Fähigkeit, immer wieder festgefahrene Denkstrukturen aufzubrechen und neue Wege zu eröffnen.

**Dr. Arthur Schüßler**, der die Grundlagen für diese Arbeit gelegt hat und mit dem ich jede Aufgabe bis ins letzte Detail diskutieren konnte. Ihm möchte ich ausserdem für die Unterstützung in allen Rechnerfragen danken.

**Dr. Valentina Heute** für die Unterstützung bei meinen ersten molekularbiologischen Gehversuchen. Ohne Sie hätte ich während meiner Staatsexamensarbeit und auch zu Beginn meiner Dissertation viele Experimente wiederholen müssen, da ich noch nicht alle Tricks und Kniffe im Labor kannte.

**Dr. Melanie Ferschke, Dr. Elke Wolf, Dr. Ute Reck, Holger Martin und Dr. Daniel Schwarzott**, die mir immer wieder Denkanstöße und Hilfen gegeben und einigen Frust aufgefangen haben. Bei Euch habe ich gelernt, dass ein Nachmittagskaffee Probleme zwar nicht löst, aber Ansatzpunkte aufzeigt.

„Meinem“ Diplomanden **Stephan Weinhardt**, der durch seine hervorragenden Arbeiten an den „bacteria-like organisms“ von *Geosiphon pyriformis* sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Die Betreuung eröffnete mir neue Möglichkeiten.

**Karin Faist**, ohne die in den Labors der Arbeitsgruppe Kluge das Chaos ausbrechen würde. Ihre ordnende Hand ist unsichtbar und doch allgegenwärtig.

**Gisela Schaffert, Monika Medina und allen Mitgliedern der AG Kluge** für die Hilfe in allen Verwaltungsfragen und die freundliche Aufnahme und Unterstützung.

**Meinen Eltern**, die mich zu diesem Vorhaben ermutigt haben und mich in schwierigen Zeiten unterstützten. Ohne deren Zutun wäre ich nicht zu dem geworden, der ich heute bin.

**Vivien** für die Unterstützung und unendliche Geduld.

**Der deutschen Forschungsgemeinschaft** für die finanzielle Unterstützung aller Forschungsprojekte des SFB199 und Arbeiten an der Symbiose *Geosiphon pyriformis*.

## Inhaltsverzeichnis

Danksagung.....	2
Inhaltsverzeichnis .....	3
Abkürzungsverzeichnis .....	5
Abbildungs-, Tabellen- und Formelverzeichnis.....	7
<b>1 Zusammenfassung .....</b>	<b>9</b>
<b>2 Einleitung.....</b>	<b>11</b>
2.1 Phosphatstoffwechsel und -homeostase bei Pflanzen und Pilzen .....	11
2.2 Schwierigkeiten bei Phosphataufnahme durch Pflanzen und Strategien zu ihrer Lösung.....	12
2.3 Arbuskuläre Mykorrhiza als wichtige Anpassung an Phosphatmangel .....	14
2.4 <i>Geosiphon pyriformis</i> (Kütz.) v. Wettstein .....	16
2.4.1 Beschreibung des Systems.....	16
2.4.2 <i>Geosiphon</i> als Modell für die AM – Stand der Forschung.....	17
2.5 Zielsetzung .....	19
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>20</b>
3.1 Materialien.....	20
3.1.1 Arbeits- und Verbrauchsmaterial.....	20
3.1.2 Chemikalien .....	20
3.1.3 Kit-Systeme.....	20
3.1.4 Puffer und Lösungen .....	21
3.1.5 DNA-Längenstandards.....	29
3.1.6 Enzyme.....	30
3.1.7 Restriktionsenzyme .....	30
3.1.8 Bakterienstämme .....	31
3.1.9 Phagenstämme .....	31
3.1.10 Vektoren.....	31
3.1.11 Oligonucleotide.....	36
3.1.12 Organismen .....	38
3.2 Methoden.....	41
3.2.1 Agarosegelelektrophorese .....	41
3.2.2 Visualisierung aufgetrennter Nukleinsäurefragmente .....	42
3.2.3 DNA-Isolationsmethoden .....	42
3.2.4 RNA-Isolationsmethoden.....	44
3.2.5 Enzymatische Reaktionen .....	45
3.2.6 Transformation von <i>E. coli</i> .....	50
3.2.7 $\alpha$ -Komplementationstest .....	50
3.2.8 „Übernacktkulturen“ .....	51
3.2.9 Isolation von Plasmid-DNA.....	51
3.2.10 Sequenzierung mit PE Applied Biosystems ABI-Sequencer .....	52
3.2.11 Sequenzanalyse.....	53
3.2.12 Reinigung von DNA .....	54
3.2.13 Aufbau und Screening von Genbanken .....	55
3.2.14 Analyse von Phosphataufnahme und -stoffwechsel durch Inkubation von <i>Geosiphon pyriformis</i> -Blasen und <i>Nostoc punctiforme</i> -Zellen mit $^{32}\text{P}_i$ .....	61
<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>65</b>
4.1 Aufbau und Screening von Genom- und cDNA-Genbanken .....	65
4.1.1 Aufbau einer Genombank mit dem Lambda ZAP II Predigested EcoR I/CIAP-Treated Vector Kit.....	65
4.1.2 Aufbau einer cDNA-Genbank mit dem ZAP-cDNA Synthesis Kit.....	66
4.1.3 Screening der genomischen DNA-Genbank.....	67
4.1.4 PCR aus der Phagensuspension der genomischen DNA-Genbank.....	68
4.2 Molekularbiologische Charakterisierung pilzlicher Gene .....	69
4.2.1 <i>high-affinity</i> -Phosphat-Transportergen .....	69
4.2.2 Charakterisierung des <i>high-affinity</i> Phosphattransporter-Fragments pFV 14.1 .....	71

4.3	Molekularbiologische Charakterisierung bakterieller Gene.....	75
4.3.1	Grund für die Untersuchung von bakteriellen Genen .....	75
4.3.2	Vermeidung von Kontaminationen bei der Charakterisierung bakterieller Gene aus „bacteria-like organisms“ (BLOs) aus Sporen von <i>Geosiphon pyriformis</i> .....	77
4.3.3	Nachweis des bakteriellen Ursprungs der charakterisierten Gene .....	77
4.3.4	Phylogenetische Einordnung der BLOs von <i>Geosiphon pyriforme</i> mit dem 16 S-rRNA Gen als molekularem Marker.....	78
4.3.5	ABC-Typ Hexosetransporter .....	81
4.4	Untersuchungen zur Aufnahme und Metabolisierung von anorganischem Phosphat durch <i>Geosiphon pyriformis</i> .....	82
4.4.1	Abhängigkeit der Markierungsmuster von der Inkubationsdauer mit <sup>32</sup> P <sub>i</sub> .....	84
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>96</b>
5.1	Molekularbiologische Untersuchungen .....	96
5.1.1	Aufbau und Screening von genomischen und cDNA-Genbanken.....	96
5.1.2	Molekularbiologische Charakterisierung pilzlicher Gene .....	98
5.1.3	Molekularbiologische Charakterisierung bakterieller Gene.....	100
5.2	Physiologische Untersuchungen zum Phosphatstoffwechsel.....	104
5.3	Ausblick .....	107
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>108</b>
<b>Zitat</b>	<b>.....</b>	<b>120</b>
<b>Curriculum vitae.....</b>	<b>.....</b>	<b>121</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>.....</b>	<b>122</b>

Der Anhang befindet sich als Datei auf dem beiliegenden Datenträger.

<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>Anhang 1</b>
7.1	Sequenzalignments.....	Anhang 1
7.2	Computergestützte Bildbearbeitung eingescannter Autoradiogramme .....	Anhang 1
7.2.1	Grundlagen.....	Anhang 1
7.3	Bildanalyse über direkte Graustufenzählung mittels BioPic.....	Anhang 2
7.3.1	Beschreibung der Programmstruktur und -funktionen .....	Anhang 2
7.3.2	BioPic – Bedienung des Programms .....	Anhang 3
7.3.3	Stärken und Schwächen des Programms .....	Anhang 6
7.4	Bestimmung der relativen Verbindungsanteile mittels PaintShopPro 7.0 und Scion Image Beta 4.0.2.....	Anhang 6
7.4.1	Methode .....	Anhang 6
7.4.2	Arbeitsschritte .....	Anhang 7
7.4.3	Vergleich der Ergebnisse aus Szintillationszählung und Bildauswertung.....	Anhang 11
7.4.4	BioPic - Quelltext des Programms.....	Anhang 14

## Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
<sup>32</sup> P	Phosphor-Radioisotop der relativen Masse 32
A	Adenin
aa	Aminosäure
agl-Operon	$\alpha$ -glucoside utilization-operon (aus <i>Sinorhizobium meliloti</i> )
Amp	Ampicillin
ASCII	American Standard Code for Information Interchange
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bidest	doppelt (zweistufig) destilliert
BLAST	basic local alignment search tool
BLO	bacteria-like organism
bp	Basenpaare
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
CPM	counts per minute
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
demin	demineralisiert
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA (DNS)	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FG	Frischgewicht
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung
G-HCl	Guanidinium-Hydrochlorid
G-SCN	Guanidinium-Thiocyanat
I	Inosin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
Kana	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare (1000 bp)
K <sub>M</sub>	Michaeliskonstante
KOAc	Kaliumacetat
lac Z	$\beta$ -Galaktosidase-Gen
LB	Luria Bertoni
LM	Laufmittel für Dünnschichtchromatographie
M	Molar (mol/l)
MES	2-N-Morpholinoethansulfonsäure
M-MLV	Meloney Murine Leukemia Virus
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA (mRNS)	messenger Ribonukleinsäure
NaOAc	Natriumacetat
NCBI	National Center for Biotechnology Information

---

NH <sub>4</sub> OAc	Ammoniumacetat
NUP	Nested Universal Primer
NZY	„ <u>N</u> Z amine“ = Kaseinhydrolysat; „ <u>Y</u> east extract“ = Hefeextrakt
Oligonukleotid	Oligodesoxyribonukleotid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
P <sub>i</sub>	(anorganisches) Ortho-Phosphat
RACE	rapid amplification of cDNA ends
RNA (RNS)	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	reverse Transkription
RTase	reverse Transkriptase
S	Svedberg-Einheit
SDS	Natrium-Dodecylsulfat (Natrium-Laurylsulfat, Natrium-Laurylsarcosinat)
ss	einzelsträngig
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat (Sodiumchloride-Sodiumcitrate)
SSPE	Natriumchlorid-Natriumphosphat-EDTA (Sodiumchloride-Sodiumphosphate-EDTA)
STET	Saccharose-Triton-EDTA-TRIS-HCl
STETL	Saccharose-Triton-EDTA-TRIS-HCl-Lysozym
T	Thymin
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	TRIS-EDTA
Tet	Tetracyclin
TLC	thin layer chromatography
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
UP	Universal Primer
UPM	Universal Primer Mix
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen (Volumenprozent)
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid

# Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

## Abbildungsverzeichnis

<u>Abb. 1:</u>	Phosphor-Stoffkreislauf in der Umwelt .....	12
<u>Abb. 2:</u>	Schematische Darstellung einer arbuskulären Mykorrhiza mit möglichen Stellen des Stoffaustauschs .....	14
<u>Abb. 3:</u>	Blasen von <i>Geosiphon pyriformis</i> auf natürlichem Substrat .....	16
<u>Abb. 4:</u>	Vereinzelte Spore von <i>Geosiphon pyriformis</i> , lichtmikroskopische Aufnahme .....	17
<u>Abb. 5:</u>	Vektorkarte pCR 2.1 Original .....	33
<u>Abb. 6:</u>	Vektorkarte pCR 4-TOPO for Sequencing .....	34
<u>Abb. 7:</u>	Vektorkarte pBluescript SK Phagemid .....	35
<u>Abb. 8:</u>	Blasen von <i>Geosiphon pyriformis</i> in Wasser .....	39
<u>Abb. 9:</u>	Kultur von <i>Nostoc punctifome</i> auf Agar.....	40
<u>Abb. 10:</u>	Schematische Darstellung des Aufbaus einer genomischen DNA-Bank .....	55
<u>Abb. 11:</u>	Schematische Darstellung des Aufbaus einer cDNA-Bank .....	56
<u>Abb. 12:</u>	Direkte PCR aus der genomischen DNA-Genbank mit den Primern NS1 und NS2.....	66
<u>Abb. 13:</u>	Gesamt-RNA von <i>G. pyriformis</i> .....	67
<u>Abb. 14:</u>	Größenvergleich der Fremd-DNA in angereicherten Phagenklonen durch direkte PCR aus der genomischen DNA-Genbank .....	68
<u>Abb. 15:</u>	Direkte PCR aus der genomischen DNA-Genbank mit Primern P18 und P19 zur Insertkontrolle.....	69
<u>Abb. 16:</u>	Gelbild der ersten und verschachtelten PCR für pFV14.1 .....	70
<u>Abb. 17:</u>	Lage des Teilfragments pFV 14.1 anhand eines Strukturmodells, Modell der Sekundärstruktur des Pho84-Proteins von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	71
<u>Abb. 18:</u>	Vergleich der Proteinsequenzen der Phosphattransporterfragmente .....	72
<u>Abb. 19:</u>	Alignment von pFV14.1 (GeoPT).....	73
<u>Abb. 20:</u>	Phylogenetische Beziehung des Fragments aus <i>Geosiphon pyriformis</i> zu anderen P <sub>i</sub> -Transportern ...	74
<u>Abb. 21:</u>	Schema der direkten PCR aus der genomischen DNA-Genbank von <i>Geosiphon pyriforme</i> .....	75
<u>Abb. 22:</u>	BLOs in <i>Geosiphon pyriformis</i> .....	77
<u>Abb. 23:</u>	Gelbilder einer parallelen PCR für das 16 S-rRNA- und Hexosetransporter gen .....	78
<u>Abb. 24:</u>	phylogenetische Einordnung der 16 S-rRNA-Gensequenz aus <i>Geosiphon pyriforme</i> .....	80
<u>Abb. 25:</u>	agl-Operon von <i>Sinorhizobium meliloti</i> .....	81
<u>Abb. 26:</u>	Autoradiogramm eines zweidimensionalen Dünnschichtchromatogrammes eines Extraktes von <i>Geosiphon</i> -Blasen, die für 1min im Licht mit <sup>32</sup> P <sub>i</sub> inkubiert wurden. Phosphatkonzentration: 5.4nM	84
<u>Abb. 27:</u>	Relativer Anteil der Markierung des anorganischen Phosphats (P <sub>i</sub> ) in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer .....	85
<u>Abb. 28:</u>	Relativer Anteil der Markierung des ATP an den markierten organischen Phosphatverbindungen in Abhängigkeit von der <sup>32</sup> P-Inkubationsdauer .....	87
<u>Abb. 29:</u>	Relativer Anteil der Markierung der 3-Phosphoglycerinsäure an den markierten organischen Phosphatverbindungen in Abhängigkeit von der <sup>32</sup> P-Inkubationsdauer.....	88
<u>Abb. 30:</u>	Relativer Anteil der Markierung der Zuckermono- und -diphosphate an den markierten organischen Phosphatverbindungen in Abhängigkeit von der <sup>32</sup> P-Inkubationsdauer.....	89
<u>Abb. 31:</u>	Autoradiogramme von 2D-Dünnschichtchromatogrammen, die Beispiele von unterschiedlichen Markierungsmustern aus Pulse-Chase-Experimenten zeigen.....	91
<u>Abb. 32:</u>	Relative Anteile von Markierung in P <sub>i</sub> im Vergleich zu organischen Verbindungen bei <i>Geosiphon</i> [a] und <i>Nostoc</i> [b] in Abhängigkeit von der Dauer des Chase .....	92
<u>Abb. 33:</u>	Vergleich der Markierungsmuster (organische Phosphorverbindungen) bei <i>Nostoc</i> und <i>Geosiphon</i> im Verlauf des Chase .....	93
<u>Abb. 34:</u>	Relativer Anteil der Markierung in Zuckermono- und -diphosphaten an den markierten organischen Phosphatverbindungen im Vergleich <i>Geosiphon/Nostoc</i> .....	94
<u>Abb. 35:</u>	Relative Anteile der Markierung von α-Glycerophosphat [a] und 3-Phosphoglycerinsäure [b] an den markierten organischen Phosphatverbindungen, bei <i>Geosiphon</i> bzw. <i>Nostoc</i> .....	95
<u>Abb. 36:</u>	phylogenetische Einordnung der bakteriellen Endosymbionten aus den <i>Gigasporaceae</i> .....	102

**Tabellenverzeichnis**

<u>Tab. 1:</u>	Primer für das Phosphattransportergen von <i>Geosiphon pyriformis</i> .....	36
<u>Tab. 2:</u>	RACE- und RT-Primer .....	37
<u>Tab. 3:</u>	Primer für das bakterielle 16 S-rRNA-Gen (für bacteria-like organisms in <i>Geosiphon pyriformis</i> )....	37
<u>Tab. 4:</u>	Primer für das bakterielle Zuckertransportergen (für bacteria-like organisms in <i>Geosiphon pyriformis</i> ) .....	37
<u>Tab. 5:</u>	Standard-Sequenzierprimer.....	38
<u>Tab. 6:</u>	Ergebnis der BLASTx-Datenbankrecherche mit dem Fragment pFV 14.1.....	70
<u>Tab. 7:</u>	Ergebnis der BLASTx-Datenbankrecherche mit dem Fragment pFV 40.1.....	76

# 1 Zusammenfassung

Phosphat als ein für die Pflanzen essentielles Element wird von diesen in den meisten Fällen über symbiotische Mykorrhizapilze aufgenommen, die an bzw. in den Wurzeln von ca. 80 - 90 % aller Landpflanzen (SMITH & READ, 1997) leben. Das Untersuchungsobjekt der vorliegenden Arbeit, *Geosiphon pyriformis*, stellt insofern eine Besonderheit dar, als es einerseits als ein ursprünglicher Vertreter der arbuskulären Mykorrhizapilze (AM-Pilze) einzustufen ist (u. a. SCHÜßLER ET AL., 2001; SCHWARZOTT ET AL., 2001), andererseits aber eine Endosymbiose mit dem Cyanobakterium *Nostoc punctiforme* eingeht. *Geosiphon pyriformis* kann aus verschiedenen Gründen als Modellsystem für die AM angesehen werden, vor dem Hintergrund der speziellen Anpassung der Symbiose *Geosiphon pyriformis* an Phosphat-Mangelbedingungen sollten die molekularen und physiologischen Mechanismen der Aufnahme von Phosphat und ggf. anderer Nährstoffe untersucht und mit denen der AM-Pilze verglichen werden.

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit konnte aus *Geosiphon pyriformis* eine genomische DNA-Genbank aufgebaut und so eine von den schwierigen Kulturen der Symbiose unabhängige Grundlage für die Bearbeitung weiterer molekularbiologischer Fragestellungen gelegt werden. Aus dieser Genbank konnten sowohl ein 340 bp langes Teilfragment eines Gens für einen *high-affinity* Phosphattransporter, als auch ein 463 bp langes Teilfragment eines bakteriellen Gens für einen ABC-Typ-Hexosetransporter amplifiziert und charakterisiert werden.

Die weitere Analyse des Phosphattransporter-Genfragments im Vergleich zu anderen pilzlichen und pflanzlichen Phosphattransportergenen zeigte, dass die Divergenz der Gensequenzen innerhalb des Reiches der Pilze deutlich größer war als zwischen Pflanzen. So waren die berechneten genetischen Distanzen von pilzlichen Genen, deren Genprodukten die gleichen Funktionen und ähnliche Substratspezifität zugeschrieben werden, erheblich größer als die Distanzen zwischen pflanzlichen Genen aus einer Art, deren Genprodukte deutlich unterschiedliche Substratspezifität aufweisen. Erstmals konnte innerhalb eines genomischen DNA-Fragments eines pilzlichen Phosphattransportergens eine mögliche Intronsequenz charakterisiert werden.

Das hier charakterisierte bakterielle Zuckertransporter-Genfragment konnte im Rahmen einer innerhalb dieser Dissertation angeleiteten Diplomarbeit den in Sporen und Hyphen von AM-Pilzen lebenden „*bacteria-like organisms*“ (BLOs) von *Geosiphon pyriformis* zugeordnet werden. Die zu diesem Zweck zusätzlich durchgeführte Analyse der 16 S-rRNA-Gene führte zu grundlegenden Hinweisen über die taxonomische Stellung der BLOs von *Geosiphon pyriformis* innerhalb des Reichs *Bacteria*.

Zur weiteren Analyse des Phosphatmetabolismus der Symbiose *Geosiphon pyriformis* wurden  $^{32}\text{P}_i$ -Tracerexperimente durchgeführt und diskutiert, die zur Etablierung der Methode und ersten Aussagen bezüglich der unterschiedlichen Stoffwechselreaktionen der Symbiose und der Symbiosepartner in Abhängigkeit von den Versuchsbedingungen führten.

So ist eine hohe Substrataffinität des  $\text{P}_i$ -Aufnahmesystems von *Geosiphon pyriformis* wahrscheinlich, da die Aufnahme des Tracers aus einer Lösung mit extrem niedrigem Phosphatgehalt (max. 5,4 nM) nachgewiesen werden konnte. Die übrigen Experimente wurden bei einem Gesamtposphatgehalt von 10  $\mu\text{M}$  durchgeführt. Insbesondere die Pulse-

Chase-Experimente zeigten erhebliche Unterschiede zwischen Blasen von *Geosiphon pyriformis* und freilebenden Zellen des Endosymbionten *Nostoc punctiforme* auf. So erfolgte die Weitergabe des Tracers aus dem  $P_i$ -Pool der Blasen erheblich schneller und an eine größere Zahl von Metaboliten. Im Vergleich der Applikation des Tracers im Licht bzw. im Dunkeln bei *Geosiphon*-Blasen zeigten sich deutlich höhere Markierungen bei Produkten des Calvin-Zyklus im Licht, die auf die photosynthetisch aktiven endosymbiontischen *Nostoc*-Zellen zurückgeführt werden konnten.

Bei der genauen Bestimmung der Substrataffinität sowie anderer Kenngrößen des Phosphatstoffwechsels blieben allerdings noch viele Fragen offen. Insbesondere scheiterten wiederholt Versuche am mangelnden Versuchsmaterial, da die Kultur der Symbiose *Geosiphon pyriformis* sich nach wie vor als äußerst schwierig erwies.

## 2 *Einleitung*

### 2.1 **Phosphatstoffwechsel und -homeostase bei Pflanzen und Pilzen**

Phosphor ist in der Natur ubiquitär. In seiner häufigsten Verbindungsform, den Phosphaten, ist das Element Phosphor in allen Gewässern ebenso zu finden wie im Boden, in Mineralien sowie in Verbindungen, die für alle lebenden Organismen essentiell sind:

- Nukleosidphosphatketten bilden das strukturelle Rückgrat der DNA und RNA und damit des genetischen Apparates.
- Phospholipide sind die Grundbausteine der Biomembranen.
- Der Kohlenhydratstoffwechsel ist stets über Phosphate energetisiert. Überhaupt beruht die Energieübertragung und -bereitstellung im zellulären System auf der hydrolytischen Spaltung energiereicher Phosphatbindungen, z. B. des ATP.
- Elementare Steuerprozesse für zahlreiche Zellfunktionen werden über Proteinphosphorylierungen und -dephosphorylierungen ausgeführt (RANJEVA & BOUDET, 1987).

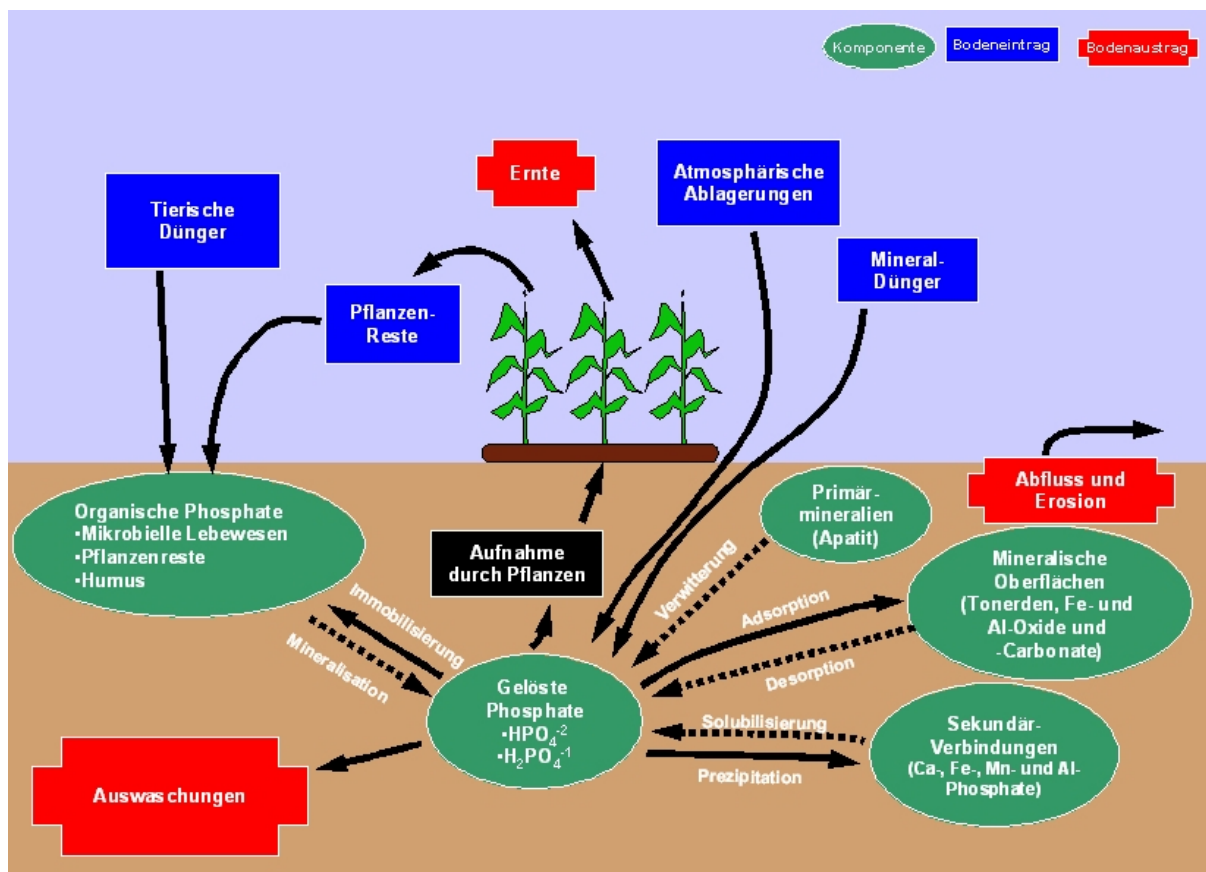
Insbesondere für die Produzenten von Biomasse am Beginn der Nahrungskette ist es wichtig, mineralische oder organisch gebundene Phosphate aus dem Boden aufzunehmen und dem Metabolismus zur Verfügung zu stellen. Berechnungen des amerikanischen Potash & Phosphate Institutes gehen davon aus, dass allein in den USA jährlich 750.000 Tonnen Phosphat durch die drei häufigsten Nutzpflanzen Mais, Weizen und Luzerne aus dem Boden mobilisiert werden ([HTTP://WWW.PPI-PPIC.ORG](http://www.ppi-ppic.org), 2002). Dabei ist zu beachten, dass die verfügbare Konzentration von Phosphaten im Boden in der Regel sehr gering ist. Hochrechnungen gehen von einer Konzentration von freiem Phosphat in der Größenordnung von 10  $\mu\text{M}$  aus (MARSCHNER, 1995; SCHACHTMAN ET AL., 1998). Damit wird deutlich, dass Pflanzen vergleichsweise riesige Mengen von Phosphaten aus einer verhältnismäßig armen Quelle anzureichern vermögen. In anderen Worten: „Die Effizienz der Phosphataufnahme durch Pflanzen garantiert das Leben, jedenfalls der höheren Organismen, auf der Erde“ (MIMURA, 1999).

Da Phosphate eine so wichtige Rolle im zellulären System spielen, und sie außerdem eine Schnittstelle zwischen anorganischem und organischem Stoffwechsel darstellen, ist es entscheidend, dass die Konzentration freien Phosphats in den verschiedenen Zellkompartimenten strikt reguliert ist und Zu- und Abflüsse in einem regulierten Fließgleichgewicht stehen. Diese Phosphathomeostase wird durch eine Vielzahl von Prozessen gewährleistet, z. B. Membrantransport, Umwandlung von anorganischen Ionen in organische Moleküle und chemische Reaktionen mit anderen Ionen, wie z. B. Calcium. Physiologische Befunde zum Phosphatstatus von Pflanzen, vor allem auch unter molekularbiologischen Aspekten, wurden von MIMURA (1999) zusammenfassend dargestellt.

## 2.2 Schwierigkeiten bei Phosphataufnahme durch Pflanzen und Strategien zu ihrer Lösung

Pflanzen haben eine Vielzahl von Möglichkeiten entwickelt, um dem geringen Angebot von Phosphat im Boden Rechnung zu tragen. Die geringe Konzentration von  $< 10 \mu\text{M}$  an freiem Phosphat in der Bodenlösung ist nicht zuletzt darin begründet, dass Phosphat mit Komponenten des Bodens bereitwillig komplexe und stabile Bindungen eingeht. An dieser Stelle seien vor allem Komplexierungen durch mehrwertige Metallkationen (z.B. Eisen, Aluminium und Mangan in sauren, Calcium in neutralen Böden) genannt sowie die organische Bindung von Phosphaten mehrheitlich in Inositolphosphat (DALAL, 1977; MULLEN, 1999) bzw. an Huminsäuren. Alles in allem hat dies zur Folge, dass in den Boden eingetragenes Phosphat – sei es durch Destruktion organischen Materials oder durch die Aufbringung von Phosphatdüngemitteln in der Landwirtschaft – fast sofort gebunden wird und von Pflanzen unter Aufwendung von Energie wieder mobilisiert werden muß.

Der Kreislauf von Phosphor bzw. Phosphaten und damit die den Eintrag und Austrag von Phosphaten in den bzw. aus dem Boden beeinflussenden Prozesse sind in Abbildung 1 dargestellt.



**Abb. 1:** Phosphor-Stoffkreislauf in der Umwelt

Im Wesentlichen haben Pflanzen drei Modalitäten zur Anpassung an das geringe Phosphatangebot im Boden entwickelt (RAGHOTHAMA, 1999):

- Morphologische Veränderungen des Wurzelsystems
- Veränderungen des Phosphatstoffwechsels (Physiologische Veränderungen),
- Veränderungen auf biochemischer und molekularbiologischer Ebene.

Zu den morphologischen Anpassungen zählen vor allem Änderungen in der Architektur und Morphologie des Wurzelsystems, z. B. durch Vergrößerung der Oberfläche der Wurzelhaare durch ihre Verlängerung und Vergrößerung der Wurzelhaarzone, und durch verstärkte Ausbildung von Seitenwurzeln. Vor allem wird das Verhältnis von Wurzel zum Sproß („root to shoot ratio“) verändert. RAGHOTHAMA (1999) ordnet die weiter unten besprochene, unter Phosphatmangel verstärkte Assoziation mit Mykorrhizapilzen ebenfalls in die Kategorie der morphologischen Veränderungen ein, jedoch reicht das Phänomen Mykorrhiza weit über die rein morphologische Ebene hinaus, wie später noch deutlich werden wird.

Zu den physiologischen Anpassungen an Phosphatmangel zählt die Steigerung der Netto-Phosphataufnahme bedingt durch erhöhte Aufnahme bei gleichzeitig verringertem Efflux. In der Vakuole gespeichertes Phosphat wird remobilisiert und der Phosphattransport innerhalb der Pflanze erhöht. Es kommt zu einer vermehrten Produktion bzw. Sekretion von Wurzelexsudaten, die Phosphate aus ihrer Bindung lösen. Dies sind insbesondere organische Säuren mit Protonen, Chelatbildner, Phosphatasen und RNasen. Grundbausteine und Zwischenmetabolite werden dafür durch Veränderungen im Kohlenstoffmetabolismus, der Photosynthese, in der Stickstoffassimilation und anderen Stoffwechselwegen bereitgestellt (SCHOPFER & BRENNICKE, 1999).

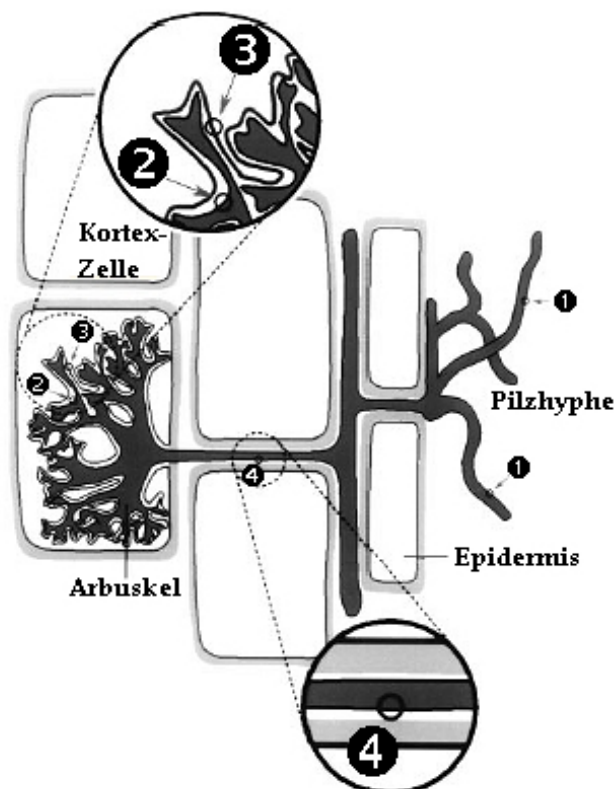
Die Wirkung von Wurzelexsudaten beruht auf einer Beeinflussung wichtiger Faktoren, welche die Konzentration von gelöstem anorganischem Phosphat in der Bodenlösung bestimmen. Hier gilt zunächst das Prinzip von Le Châtelier (FALBE & REGITZ, 1992), das besagt, dass ein Gleichgewicht stets dem kleinsten Zwang folgt, sich also immer wieder selbst einstellt. Adsorbiertes Phosphat geht also in die gelöste Form über, wenn die Konzentration des gelösten Phosphats im Boden erniedrigt wird, z. B. durch Aufnahme seitens der Pflanzen. Komplex gebundenes Phosphat kann auch durch andere Veränderungen im Bodengleichgewicht, wie z. B. eine lokale Ansäuerung, in Lösung gebracht werden (SCHOPFER & BRENNICKE, 1999). Ein weiterer wichtiger Faktor zur Freisetzung von Phosphat aus Komplexbindungen stellen Ligandenaustauschreaktionen dar, bei denen Phosphat als Komplexligand durch einen anderen Liganden verdrängt wird, wobei ein stabilerer Komplex entsteht. Solche verdrängenden Liganden sind meist Chelatliganden. Ein Beispiel hierfür sind die Anionen der Citronensäure und anderer organischer Säuren, die von der Wurzel in die Rhizosphäre ausgeschieden werden. Phosphatasen und RNasen sorgen für die Freisetzung (Mineralisation) organisch gebundenen Phosphats.

Anpassungen auf der biochemischen und molekularbiologischen Ebene sind vielfältig und greifen ineinander. Enzyme werden aktiviert, sei es posttranslational z.B. durch Phosphorylierungs- oder Dephosphorylierungsreaktionen, oder durch Aktivierung der entsprechenden Gene (RAGHOTHAMA, 1999).

### 2.3 Arbuskuläre Mykorrhiza als wichtige Anpassung an Phosphatmangel

Mitte des letzten Jahrhunderts wurde erkannt, dass weitaus die meisten terrestrisch lebenden Pflanzen in ihren Wurzeln in Symbiose mit Bodenpilzen leben (MOSSE, 1956). Die Symbiose zwischen Pflanzenwurzeln und Pilzen wird Mykorrhiza genannt. Sie ist phylogenetisch sehr alt, einen Hinweis darauf gibt u. a. die einfache Organisation der beteiligten Pilzarten. Bei den arbuskulären Mykorrhizapilzen (AM-Pilzen) handelt es sich um filamentöse, synzytiale Pilze, deren Hyphen unter Ausbildung von Appressorien die Rhizodermis der Wurzel durchdringen und dann innerhalb und zwischen den Wurzelzellen wachsen. Innerhalb von Wurzelzellen werden die namensgebenden Arbuskeln ausgebildet, Strukturen, bei denen sich ein Hyphenende vielfach bäumchenförmig auffächert. An den Arbuskeln findet der Stoffaustausch zwischen Pflanze und Pilz statt. Manche Familien der AM-Pilze bilden zusätzlich noch mit Lipiden gefüllte Vesikel innerhalb des Wurzelgewebes aus, die als Speicherorgane gedeutet werden können (SMITH & READ, 1997). Man geht davon aus, dass die Vermehrung der AM-Pilze asexuell über die Bildung von Dauersporen erfolgt. Bislang wurde jedenfalls noch keinerlei sexueller Vorgang nachgewiesen. Ein einzelner Bericht über sexuelle Strukturen bei den AM-Pilzen blieb unbestätigt, während genetische Analysen für asexuelle Vermehrung sprechen (ROSENDAHL & TAYLOR, 1997).

Eine durch einen AM-Pilz infizierte Pflanzenwurzel mit möglichen Stellen des Stoffaustauschs ist schematisch in Abbildung 2 dargestellt.



**Abb. 2:** Schematische Darstellung einer arbuskulären Mykorrhiza mit möglichen Stellen des Stoffaustauschs

- ① Aufnahme von Phosphat durch den Pilz, ② Phosphatfluss durch die arbuskuläre Membran,
  - ③ Aufnahme von Phosphat durch die Pflanze über die peri-arbuskuläre Membran,
  - ② und ④ mögliche Austauschstellen für Kohlenhydrate
- (Abb. aus HARRISON, 1999, verändert)

Die AM-Pilze wurden früher als Ordnung der *Glomales* betrachtet und den Zygomyceten zugeordnet. (MORTON & BENNY, 1990). Dabei blieb unklar, ob die AM-Pilze monophyletischen Ursprungs sind (MORTON, 2000). Inzwischen wurde aufgrund molekularer Analysen des SSU rRNA-Gens von SCHÜßLER ET AL. (2001) gezeigt, dass die klassische Taxonomie aus zwei Gründen revidiert werden muss. Einerseits ist ein monophyletischer Ursprung der AM-Pilze aufgrund der Analyse der molekularen Daten klar nachzuweisen. Auf der anderen Seite wurde durch Vergleich der Gensequenz des SSU rRNA-Gens einer großen Zahl von AM-Pilzen mit denen von Vertretern aller anderen Pilzgruppen klar, dass die AM-Pilze nicht nur eine Gruppe innerhalb des Phylums *Zygomycota*, sondern selbst aufgrund der genetischen Distanz ein eigenes Phylum der *Glomeromycota* bilden. Dieses muß den *Ascomycota*, *Basidiomycota* und den nach diesen Daten nicht monophyletischen *Zygomycota* und *Chytridiomycota* gegenübergestellt werden.

Aufgrund fossiler Belege wurde die Entwicklung von AM-Pilzen auf einen Zeitpunkt vor 450 Millionen Jahren datiert (REDECKER ET AL. 2000). Dies entspricht im Zeitrahmen etwa dem Zeitpunkt, an dem der Übergang pflanzlichen Lebens vom Wasser zum Land datiert wird. Damit erhält die Theorie des gleichzeitigen Landgangs der Pflanzen bzw. photoautotrophen Algen unter Co-Evolution mykorrhizaartiger Symbiosen (PIROZYNSKI & MALLOCH, 1975) weitere Unterstützung. Zum Beispiel wurden in Fossilien von *Aglaophyton*, die auf ein Alter von etwa 400 Millionen Jahren geschätzt werden, Arbuskeln nachgewiesen (REMY ET AL., 1994; TAYLOR ET AL., 1995), und es wurden *Glomus*-ähnliche Fossilien beschrieben (STUBBLEFIELD ET AL., 1987).

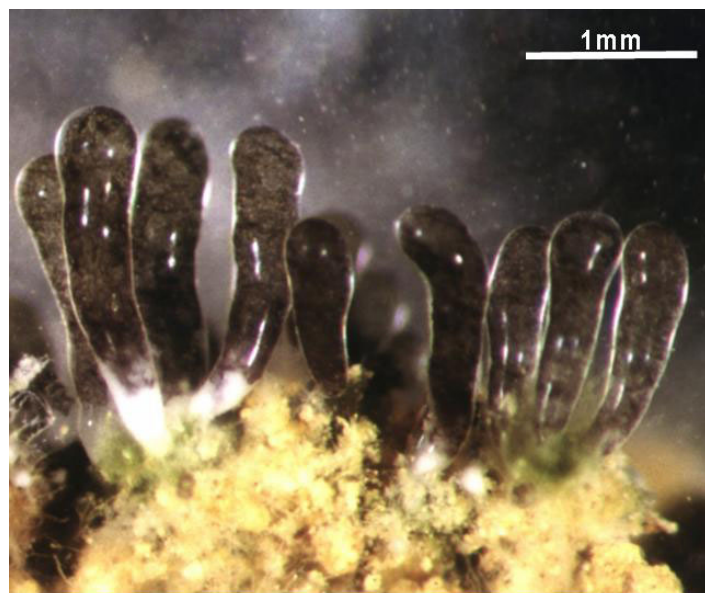
Der weitaus größte Teil aller Gefäßpflanzen – Schätzungen durch SMITH & READ (1997) gehen von einem Wert von mehr als 80 % aus – bilden arbuskuläre Mykorrhiza, darunter sind auch Symbiosen aus den Bereichen der Farne (PETERSON ET AL., 1981), Bärlappgewächse (SCHMID & OBERWINKLER, 1993) und Moose mit Ausnahme der Laubmoose (STAHL, 1949; PARKE & LINDERMAN, 1980; LIGRONE, 1988; LIGRONE & LOPEZ, 1989; SCHÜßLER, 2000) beschrieben. Aufgrund der geringen Wirtsspezifität der AM-Pilze und ihrer Fähigkeit, sogar mehrere Pflanzenspezies zu infizieren, kann man davon ausgehen, dass ein Großteil aller Gefäßpflanzen über ein AM-Netzwerk miteinander verknüpft ist.

Der wichtigste durch die Infektion mit AM-Pilzen ausgelöste Effekt ist eine deutlich bessere Versorgung der Pflanzen mit anorganischem Phosphat und dadurch bedingt, verschiedene physiologische Veränderungen. Diese bestehen insbesondere in höheren Wachstumsraten und erhöhtem Gesamtphosphatgehalt in den Geweben, welcher sich besonders in den frühen Entwicklungsstadien der Pflanzen bemerkbar macht (SMITH & GIANINAZZI-PEARSON, 1988). Darüber hinaus spielt die Infektion von Pflanzenwurzeln mit den pilzlichen Symbionten eine nicht unerhebliche Rolle in der Versorgung mit anderen essentiellen Elementen, darunter Zink, Schwefel, Calcium und Stickstoff (AMES ET AL., 1983; COOPER & TINKER, 1981), sowie bei der Ausprägung von Resistenzen gegen Umwelteinflüsse, wie z. B. Schwermetallbelastungen. Im Gegenzug wird der Pilz-Partner in der Symbiose von den Pflanzen mit Photosyntheseprodukten versorgt (SMITH & READ, 1997).

## 2.4 *Geosiphon pyriformis* (Kütz.) v. Wettstein

### 2.4.1 Beschreibung des Systems

*Geosiphon pyriformis* (Kütz.) v. Wettstein ist die einzige bislang bekannte Endosymbiose eines Pilzes mit einem Cyanobakterium (*Nostoc punctiforme*) und stellt ein Modellsystem für Untersuchungen zur arbuskulären Mykorrhiza dar (SCHÜßLER & KLUGE, 2001). Im Gegensatz zur „normalen“ AM liegt hier allerdings der Pilz-Partner als Makro- und der photoautotrophe Partner als Mikrosymbiont vor (SCHÜßLER & KLUGE, 2001). Das endosymbiotische Konsortium gilt als eine Anpassung an Phosphatmangelbedingungen (MOLLENHAUER, PERS. MITTEILUNG), bei der ein Stoffaustausch von photosynthetischen Kohlenhydraten vom Cyanobakterien- zum Pilz-Partner, sowie von Phosphat in die Gegenrichtung erfolgt (KLUGE, 1991; KLUGE ET AL. 1992; SCHÜßLER & KLUGE, 2001). Dabei ist, soweit bisher bekannt, der Pilz-Partner obligat symbiotisch. Das Habitat der Symbiose sind feuchte, nährstoffarme Böden. Dabei ist *Geosiphon pyriformis* in einer Pflanzengemeinschaft mit dem Hornmoos *Anthoceros*, dem Lebermoos *Blasia* und dem Laubmoos *Dicranella* zu finden (KLUGE ET AL. 2002). Ist das Phosphatangebot ausreichend, ist die Symbiose nicht mehr konkurrenzfähig und wird durch nicht-symbiotisches *Nostoc* überwuchert (MOLLENHAUER, PERS. MITTEILUNG). Strukturell wird die Symbiose *Geosiphon pyriformis* durch ein verzweigtes, coenocytisches Pilzmyzel im Boden gekennzeichnet. Oberirdisch zeigen sich blasenförmig aufgeblähte Hyphenspitzen, in denen in einer Symbiosomenmembran eingehüllte *Nostoc*-Zellen leben (vgl. Abbildung 3).

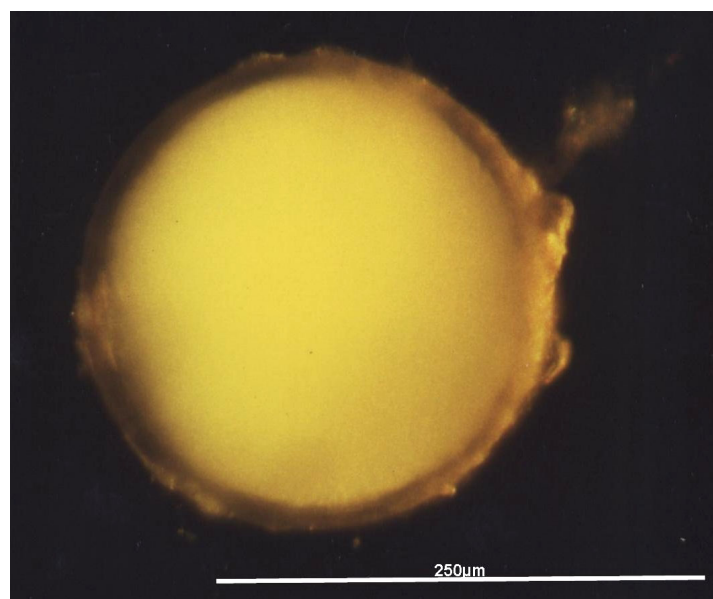


**Abb. 3:** Blasen von *Geosiphon pyriformis* auf natürlichem Substrat  
(aus SCHÜßLER & KLUGE 2001)

Jede dieser schwärzlich-grünen Blasen erreicht dabei eine Größe von 1 - 2 mm und ist jeweils das Ergebnis eines Inkorporationsprozesses, bei dem ein bestimmtes Stadium im Lebenszyklus des Cyanobakteriums (im Übergang zwischen beweglichen Homorgonien und unbeweglichen Primordien) durch den Pilz erkannt wird.

In einem Endocytosevorgang werden dann einige Cyanobakterienzellen (in der Regel ca. 5-10) ins Innere der Pilzhyphe aufgenommen. Nach einer kurzen Stressphase erreichen sie dort rasch ein größeres Volumen als außerhalb, teilen sich in kürzerem Abstand als freilebend und differenzieren Heterocysten aus (E. WOLF, PERS. MITTEILUNG)

Innerhalb des Hyphengeflechts bildet der Pilz *Geosiphon pyriformis* als auffälliges Strukturmerkmal weiße, ca. 250 µm große Sporen aus (vgl. Abbildung 4). Diese Reproduktionsorgane werden wie bei anderen AM-Pilzen asexuell gebildet und können bis zu 1000 Zellkerne enthalten (VIERA & GLENN, 1990). Bei keinem AM-Pilz konnten bislang sexuelle Stadien nachgewiesen werden, weshalb bis heute auch keine Einordnung der Sporen in die bei Pilzen bisher bekannten Typen von Sporen und Sporenträgern möglich war; sie werden im Allgemeinen als Chlamydosporen bezeichnet. Die Ultrastruktur der Sporen von *Geosiphon pyriformis* und ihre strukturelle Ähnlichkeit zu AM-Pilzsporen wurde von SCHÜBLER ET AL. 1994 beschrieben.



**Abb. 4:** Vereinzelte Spore von *Geosiphon pyriformis*, lichtmikroskopische Aufnahme

#### 2.4.2 *Geosiphon* als Modell für die AM – Stand der Forschung

*Geosiphon pyriformis* wurde zunächst als *Botrydium pyriforme* von KÜTZING (1849) beschrieben. Der symbiotische Charakter von *Geosiphon* wurde jedoch zuerst von V. WETTSTEIN (1915) erkannt, der noch davon ausging, dass es sich um eine sekundär heterotrophe siphonale Alge mit symbiontischen Cyanobakterien handelt. Erst KNAPP (1933) erkannte, dass bei *Geosiphon pyriformis* der Makrosymbiont keine Alge, sondern ein Pilz ist, er führte auch erste Kultivierungsexperimente an *Geosiphon* durch. Die Untersuchung der Ultrastruktur von *Geosiphon* durch SCHNEPF (1964) führte letztlich zur Formulierung des Schnepf'schen Theorems der Zellkompartimentierung und war ein entscheidender Beitrag zur Bestätigung der Endosymbiontenhypothese. Die Wiederentdeckung eines natürlichen Standorts in Biebergemünd im Spessart durch MOLLENHAUER (1970) machte weitere Forschungsarbeiten möglich. Unter anderem gelang es MOLLENHAUER (1988), *Geosiphon* in Kultur zu nehmen. Dies ermöglichte erstmals Untersuchungen zur Physiologie (u. a. Photosynthese, KLUGE ET

AL. 1991 und Fixierung von Luftstickstoff, KLUGE ET AL., 1992) und weitergehende Forschung zur Ultrastruktur. Die von MOLLENHAUER (1992) geäußerte Vermutung, der Pilz-Partner von *Geosiphon pyriformis* könnte zur näheren oder weiteren Verwandtschaft der AM-Pilze (*Glomales*) gehören, konnten im Rahmen der Dissertation von A. SCHÜßLER (1995) in mehreren Arbeiten eindrucksvoll bestätigt werden (SCHÜßLER ET AL., 1994, SCHÜßLER ET AL., 1995, GEHRIG ET AL., 1996) und ist noch heute Gegenstand intensiver Forschungsarbeiten. So wurde zunächst die Stellung weiterer Mitglieder der Familie der AM-Pilze aufgeklärt (SCHÜßLER, 1999). Zuletzt wurde von SCHWARZOTT ET AL. (2001) auf Basis der SSU rRNA-Genanalyse der Nachweis erbracht, dass *Glomus*, die größte Gattung der AM-Pilze, nicht auf einen monophyletischen Ursprung zurückgeht. Infolgedessen musste die gesamte Klassifizierung der AM-Pilze revidiert werden. Da die *Zygomycota*, denen die AM-Pilze bislang zugeordnet waren, ebenfalls nicht auf einen gemeinsamen Vorfahren zurückverfolgbar waren, schlugen SCHÜßLER ET AL. (2001) ein neues Pilz-Phylum vor, die *Glomeromycota*. Diese wurden entsprechend ihrer genetischen Distanzen anderen Gruppen, wie den *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* oder *Zygomycota* gegenübergestellt. In Folge dieser neuen Klassifizierung wurden gemäß dem Internationalen Code Botanischer Nomenklatur (GREUTER ET AL., 2000) auch Fehler in der bisherigen Benennung von Familien (*Glomaceae* wurde zu *Glomeraceae*) und höheren Taxa (*Glomales* wurde zu *Glomerales*, usw.) korrigiert. Der Artnamen des Pilz-Partners *Geosiphon pyriforme* wurde in einer weiteren Arbeit (SCHÜßLER, 2002) in die orthographisch korrekte Form *Geosiphon pyriformis* verändert. Bei all diesen Untersuchungen wurde die Stellung von *Geosiphon pyriformis* als ursprüngliches Mitglied der *Glomeromycota* bestätigt. Folglich konnte die Familie der *Geosiphonaceae* innerhalb der *Archaeosporales* den *Archaeosporaceae* gegenübergestellt werden. Somit konnte auch die Bedeutung von *Geosiphon pyriformis* als Modellsystem für die arbuskuläre Mykorrhiza, die SCHÜßLER & KLUGE (2001) postuliert hatten, weiter gefestigt. Diese Bedeutung begründet sich auf mehrere Vorteile, welche das System *Geosiphon* für Untersuchungen im Zusammenhang mit arbuskulärer Mykorrhiza bietet:

1. die Möglichkeit, die Symbiose in kleinen Klimaschränken zu kultivieren,
2. die exponierte Stellung der pilzlichen Membran an den *Geosiphon*-Blasen, die somit z. B. für elektrophysiologische Messungen nicht, wie in einer AM, nur an den Hyphen des Pilzpartners außerhalb der Pflanzenwurzeln zugänglich ist und
3. die Tatsache, dass bei *Geosiphon* - im Gegensatz zur „normalen“ AM - nur ein eukaryotischer Partner (nämlich der Pilz) vertreten ist und somit exprimierte Gene des Pilz-Partners über die Polyadenylierung der eukaryotischen mRNA leichter und spezifischer zugänglich sind.

## 2.5 Zielsetzung

Da sich die Endosymbiose *Geosiphon pyriformis* nur unter Phosphat-Mangelbedingungen etablieren kann, ist von besonderem Interesse, auf welchem Mechanismus diese spezielle Anpassung beruht. Im Hinblick auf die nahe taxonomische Verwandtschaft von *Geosiphon* zu den klassischen, an Phosphatmangel angepaßten AM-Pilzen stellt sich die Frage, ob die bei *Geosiphon* anzutreffenden molekularen und physiologischen Mechanismen der Aufnahme von Phosphat und ggf. anderen Nährstoffen mit denen der AM-Pilze vergleichbar sind. Die vorliegende Dissertation wurde mit dem Ziel begonnen, diese Frage zu beantworten. Dabei sollten vor allem folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Charakterisierung von an Transportprozessen beteiligten Enzymen auf molekularer Ebene

Zum Vergleich mit den bereits charakterisierten Phosphattransportern von *Glomus versiforme* und *Glomus intraradices* sollte aus isolierter DNA von *Geosiphon pyriformis* versucht werden, eine genomische DNA-Genbank aufzubauen.

Durch Screening-Verfahren mit heterologen oder homologen DNA-Sonden sollte versucht werden, den oben erwähnten *high-affinity*-Phosphattransporter und ggf. andere Transportenzyme ähnlicher Gensequenz zu isolieren und zu charakterisieren, sowie die gefundene Gensequenz mit den entsprechenden Gensequenzen nahe verwandter Organismen zu vergleichen.

2. Charakterisierung des Phosphattransports und -stoffwechsels auf physiologischer Ebene

Durch Aufnahmeexperimente mit radioaktiv markiertem Phosphat sollte versucht werden, die Aufnahmeraten von Phosphat und darüber den  $K_M$ -Wert des die Phosphataufnahme bei *Geosiphon pyriformis* entscheidenden Phosphat-Transportsystems zu bestimmen.

Über den Aufschluß von Blasen von *Geosiphon pyriformis* bzw. freilebender *Nostoc*-Zellen, Extraktion ihrer löslichen Phosphatverbindungen und eine zweidimensionale dünnschichtchromatographische Trennung derselben, sollten die Unterschiede in der Metabolisierung des aufgenommenen Phosphats zwischen *Geosiphon*-Blasen und freilebenden Cyanobakterien charakterisiert werden.

Bei allen Experimenten lag besonderes Augenmerk auf der Tatsache, dass mit minimalem Einsatz lebenden Materials auszukommen war, da die Kultivierung von *Geosiphon pyriformis* sich noch immer als schwierig darstellte und ggf. mit der Möglichkeit gerechnet werden mußte, dass nur eine geringe Menge an lebenden *Geosiphon*-Blasen zur Verfügung stand.

## 3 *Material und Methoden*

### 3.1 **Materialien**

#### 3.1.1 **Arbeits- und Verbrauchsmaterial**

Duralon-UV™-Blottingmembranen	Stratagene, Heidelberg
Microcon 100 Filter	Amicon GmbH, Witten
Röntgenfilm Kodak Biomax MS	Amersham Pharmacia Biotec, Little Chalfont (England)

#### 3.1.2 **Chemikalien**

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien und Lösungsmittel der Firmen AppliChem (Darmstadt), Boehringer (Mannheim), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) in der Qualitätsstufe „pro analysi“ verwendet.

Bei „H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub>“ handelt es sich um entionisiertes Wasser mit einer Leitfähigkeit von 0,2-0,055 µS/cm, das mit einem Seralpur 90 CN-Reinstwassersystem (Seralpur, Ransbach) hergestellt wurde. Für „H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>“ wurde H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> in einer Heraeus-Destillationsanlage (Heraeus, Hanau) nochmals zweistufig destilliert.

Adenosintriphosphat	Biometra, Göttingen
Agarose MP	AppliChem, Darmstadt
Agarose NEE0	Roth, Karlsruhe
Bactotrypton	Difco Laboratories, Detroit (USA)
Glycerin für die Molekularbiologie	GibcoBRL, Life Technologies, Eggenstein
[α- <sup>32</sup> P]-dATP, 111 TBq/mmol, 20 MBq	Hartmann Analytics, Braunschweig
[α- <sup>32</sup> P]-dCTP, 111 TBq/mmol, 20 MBq	Hartmann Analytics, Braunschweig
[ <sup>32</sup> P]H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , carrier free, 37 MBq	Hartmann Analytics, Braunschweig

#### 3.1.3 **Kit-Systeme**

Dynabeads® DNA Direct™ Kit	Deutsche Dynal, Hamburg
Dynabeads® mRNA Direct™ Kit	Deutsche Dynal, Hamburg
Gigapack III Gold Packaging Extract	Stratagene, Heidelberg
HexaLabel Plus™ DNA Labelling Kit	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Jetsorb Gel Extraktionskit 150	Genomed, Bad Oeynhausen
Lambda ZAP II Predigested EcoRI/ CIAP-Treated Vector Kit	Stratagene, Heidelberg
Original TA Cloning Kit	Invitrogen, Leek (Niederlande)
Poly-A-Quik mRNA-Isolations-Kit	Stratagene, Heidelberg
QIAprep-Spin™ Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden

<i>Rediprime</i> DNA Labelling Kit	Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont (England)
RNeasy™ Plant Mini Kit	Qiagen, Hilden
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Leek (Niederlande)
TOPO TA Cloning Kit for Sequencing	Invitrogen, Leek (Niederlande)
ZAP-cDNA Synthesis Kit	Stratagene, Heidelberg
ZAP-cDNA Gigapack III Gold Cloning Kit	Stratagene, Heidelberg

### 3.1.4 Puffer und Lösungen

#### 3.1.4.1 Standardpuffer für molekularbiologische Experimente

5 M (NH<sub>4</sub>)OAc (Ammoniumacetat)-Lösung (für 100 ml):

38,54 g in 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> lösen  
autoklavieren

0,5 M EDTA-Lösung (pH = 8,0, für 200 ml):

37,224 g in ca. 150 ml H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> lösen  
pH auf 8,0 einstellen  
mit H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> auf 200 ml auffüllen  
autoklavieren

5 M KOAc (Kaliumacetat)-Lösung (für 100 ml):

49,075 g in 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> lösen  
autoklavieren

3 M NaOAc (Natriumacetat) -Lösung (pH = 5,7, für 100 ml)

40,824 g in ca. 70 ml H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> lösen  
pH auf 5,7 einstellen  
mit H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> auf 100 ml auffüllen  
autoklavieren

2 M TRIS/HCl (pH = 8, für 200 ml):

48,456 g in ca. 150 ml H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> lösen  
pH mit HCl<sub>(konz.)</sub> auf 8,0 einstellen  
mit H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> auf 200 ml auffüllen  
autoklavieren

2 M TRIS/HCl (pH = 9, für 200 ml):

48,456 g in ca. 150 ml H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> lösen  
pH mit HCl<sub>(konz.)</sub> auf 9,0 einstellen  
mit H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> auf 200 ml auffüllen  
autoklavieren

2 M TRIS/HCl (pH = 8,8):

autoklavierte Stammlösungen:  
TRIS/HCl pH = 8,0  
TRIS/HCl pH = 9,0  
im Verhältnis 1:4 mischen

2 M MgCl<sub>2</sub> (Magnesiumchlorid)-Lösung (für 100 ml):

40,622 g in 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> lösen  
autoklavieren

2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Ammoniumsulfat)-Lösung (für 200 ml):

52,856 g in 200 ml H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> lösen  
autoklavieren

Denhardt's Reagens (500 ml):

5 g Ficoll  
5 g Polyvinylpyrrolidon (PVP)  
5 g Rinderserumalbumin (BSA; Fraktion 5)  
mit H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> auf 500 ml auffüllen  
sterilfiltrieren, dabei aliquotieren und bei -20 °C lagern

DEPC-Wasser:

0,01 % (v/v) in H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub>  
2x autoklavieren

Heringssperma-DNA stock solution (10 mg/ml):

Lösen: 100 mg Heringssperma-DNA  
in 10 ml sterilem H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> lösen  
Scheren: mehrmals durch 18-gauge 'hypodermic'  
Nadel drücken  
Denaturieren: 10 Minuten kochen bei 100 °C (Wasserbad)  
Aliquotieren: in 1 - 1,5 ml Aliquots bei -20 °C lagern  
Unmittelbar vor der Benutzung nochmals für 5  
Minuten bei 100 °C (Wasserbad) denaturieren

RNase-Wasser:

100 µg/ml RNase A

IPTG-Stammlösung:

24 mg/ml IPTG in sterilem H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub>  
50 µl pro Transformationsansatz zugeben

X-Gal-Stammlösung:

40 mg/ml X-Gal in Dimethylformamid (DMF)  
200 µl pro Transformationsansatz zugeben

Alkalischer Auftragspuffer (2x):

200 µl Glycerin  
 750 µl H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub>  
 46 µl gesättigte Bromphenolblau-Lösung  
 5 µl 5 M NaOH

Alkalischer Gelpuffer (10x) 0,3 M NaOH  
 20 mM EDTA

CI: Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 v/v)

DNA-Auftragspuffer (10x): 50 % (v/v) Glycerin  
 0,25 % (v/v) gesättigte Bromphenolblau-Lösung  
 0,25 % (v/v) gesättigte Xylencyanol-Lösung  
 10 mM TRIS/HCl (pH 8)

Hybridisierlösung mit 50 % Formamid (für 100 ml):

25 ml 20x SSPE  
 10 ml 50x Denhardt's Reagenz  
 10 g SDS  
 14 ml H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub>  
 50 ml Formamid

Unmittelbar vor der Benutzung 10 µl/ml  
 denaturierte, gescherte Heringssperma-DNA-  
 Lösung zugeben.

Verwendung: 8 ml pro Röhre

LB Flüssigmedium: 10 g NaCl  
 10 g Bacto-Trypton (Casein-Hydrolysat)  
 5 g Hefeextrakt  
 mit H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> auf 1 l auffüllen  
 pH auf 7,4 einstellen (NaOH)  
 autoklavieren

Varianten: + Tetracyclin:  
 auf ca. 55 °C gekühlten LB-Agar mit  
 12,5 mg in H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> gelöstem, sterilfiltriertem Tetracyclin  
 versetzen.

KÜHL UND DUNKEL LAGERN!

+ Ampicillin:  
 auf ca. 55 °C gekühlten LB-Agar mit  
 50 mg in H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> gelöstem, sterilfiltriertem Ampicillin  
 versetzen

	+ Kanamycin: auf ca. 55 °C gekühlten LB-Agar mit 50 mg in H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub> gelöstem, sterilfiltriertem Kanamycin versetzen
LB-Agar:	32 g Fertigmischung (FLUKA, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) mit H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub> auf 1 l auffüllen pH mit 1 M NaOH auf 7,4 einstellen autoklavieren Varianten siehe LB-Flüssigmedium
LB TOP-Agar:	10 g NaCl 10 g Bacto-Trypton (Casein-Hydrolysat) 5 g Hefeextrakt 0,7 % (w/v) Agarose NEEO (Roth, Karlsruhe) mit H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub> auf 1 l auffüllen pH auf 7,4 einstellen (NaOH) autoklavieren
10x MOPS-Puffer:	0,2 M 3-(N)-Morpholinopropansulfonsäure 50 mM Na-Acetat 10 mM EDTA mit DEPC-Wasser ansetzen der pH wurde nicht weiter eingestellt
1x MOPS-Puffer	1:10-Verdünnung des 10x MOPS-Puffers
NZY-Agar:	5 g NaCl 2 g MgSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O 5 g Hefeextrakt 10 g NZ-Amin (Casein-Hydrolysat) 15 g Agar mit H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub> auf 1 l auffüllen pH auf 7,5 einstellen (NaOH) autoklavieren
NZY TOP-Agar:	5 g NaCl 2 g MgSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O 5 g Hefeextrakt 10 g NZ-Amin (Casein-Hydrolysat) 0,7 % (w/v) Agarose (Agarose NEEO, Roth, Karlsruhe) mit H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub> auf 1 l auffüllen pH auf 7,5 einstellen (NaOH) autoklavieren

---

PCI (Phenolmix):	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1 v/v/v)
PCR-Wasser:	autoklaviertes H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub> aliquotieren 20 min auf der UV-Bank ( $\lambda = 312$ nm) inkubieren (Spaltung ggf. vorhandener DNA-Fragmente)
SM-Puffer:	5,8 g NaCl 2,0 g MgSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O 50 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,5) 10 ml 1 % (w/v) Gelatine-Lösung mit H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub> auf 1 l auffüllen autoklavieren
SOC-Medium:	20 g/l Bactotrypton 5 g/l Hefeextrakt 0,5 g/l NaCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM MgSO <sub>4</sub> 20 mM Glucose autoklavieren
20x SSC-Puffer:	175,3 g NaCl 88,2 g Na-Citrat 800 ml H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub> pH auf 7,0 einstellen (NaOH) mit H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub> auf 1 l auffüllen
20x SSPE (für 2 Liter):	348 g NaCl 55,2 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> • 2 H <sub>2</sub> O 14,8 g EDTA-Dinatriumsalz (pH 8) 26 ml 5 M NaOH pH auf 7,4 einstellen, mit H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub> auf 2 Liter auffüllen
STET-Puffer:	8 % (w/v) Saccharose 0,5 % (v/v) Triton X-100 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) 50 mM EDTA sterilfiltrieren und in 50 ml-Aliquots bei 4 °C lagern
Lysozym-Stammlösung:	5 mg/ml Lysozym sterilfiltrieren und in 500 µl-Aliquots bei -20 °C lagern nach dem Auftauen nicht wieder benutzen

---

---

STETL-Puffer:	STET-Puffer auf Eis vorlegen 1/100 Vol. Lysozymstammlösung zusetzen immer frisch ansetzen
Denaturierungslösung für Membranen (für 2 Liter):	120 g NaCl 40 g NaOH mit H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub> auf 2 Liter auffüllen
Neutralisationslösung für Membranen (für 2 Liter):	120 g NaCl 121,14 g TRIS-Base auf 1,8 Liter auffüllen pH mit HCl auf 8,0 einstellen mit H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub> auf 2 Liter auffüllen
Waschlösung für Membranen:	2x SSC 0,2 M TRIS-HCl (pH 7,5)
50x TAE-Puffer:	242 g TRIS/HCl 57,1 g Essigsäure (100%) 9,3 g EDTA Dinatriumsalz in 800 ml H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub> lösen, pH 8,0 mit HCl <sub>(konz.)</sub> einstellen, mit H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub> auf 1000 ml auffüllen
1x TAE-Puffer	1:50-Verdünnung des 50x TAE-Puffers
10x TE-Puffer (für 1000 ml):	12,12 g TRIS-Base 3,72 g Na-EDTA in ca. 700 ml H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub> lösen pH mit HCl <sub>(konz.)</sub> auf 7,5 einstellen mit H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub> auf 1000 ml auffüllen autoklavieren
1x TE-Puffer:	1:10-Verdünnung des 10x TE-Puffers Nach Verdünnung evtl. autoklavieren

---

### 3.1.4.2 DNA-Extraktionspuffer zur Extraktion von DNA aus großen Mengen von AM-Pilzsporen nach Zézé et al. (1994)

„crush“-Puffer:            5 ml    1 M TRIS pH 8,0  
                                   5 ml    0,5 M EDTA  
                                   1 ml    5 M NaCl  
                                   auf 100 ml mit H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> auffüllen, autoklavieren

vor Benutzung zugeben:  
                                   3ml/100 ml β-Mercaptoethanol

„lyse“-Puffer:            5 ml    1 M TRIS pH8,0  
                                   5 ml    0,5 M EDTA  
                                   20 ml  10 % SDS  
                                   10 ml  10 % Laurylsarcosinat  
                                   auf 100 ml mit H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> auffüllen, autoklavieren

vor Benutzung zugeben:  
                                   3 ml / 100 ml β-Mercaptoethanol  
                                   1 mg/ml Proteinase K

### 3.1.4.3 Medien zur Kultur von *Geosiphon pyriformis* und *Nostoc sp.*

BG11-Medium:            10 ml  NaNO<sub>3</sub>                            15 g / 100 ml (w/v)  
                                   10 ml  K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> • 3 H<sub>2</sub>O                0,4 g / 100 ml (w/v)  
                                   10 ml  MgSO<sub>4</sub> • 7 H<sub>2</sub>O                0,75 g / 100 ml (w/v)  
                                   10 ml  Citronensäure                    0,06 g / 100 ml (w/v)  
                                   10 ml  Fe(III)-NH<sub>4</sub>-EDTA              0,07 g / 100 ml (w/v)  
                                   10 ml  Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>                            0,2 g / 100 ml (w/v)  
                                   10 ml  CaCl<sub>2</sub> • 2 H<sub>2</sub>O                0,36 g / 100 ml (w/v)  
                                   1 ml  Spurenelementlösung  
     mit H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> auf 1 l auffüllen  
     autoklavieren

Variante:                    zur Verfestigung vor dem Autoklavieren  
     2 % (w/v) Agar-Agar zugeben, auf ca. 50°C  
     abkühlen lassen und Platten gießen

Spurenelementlösung:  H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>                            6,1 mg  
     MnSO<sub>4</sub> • 1 H<sub>2</sub>O                        16,9 mg  
     ZnSO<sub>4</sub> • 7 H<sub>2</sub>O                        28,7 mg  
     CuSO<sub>4</sub> • 5 H<sub>2</sub>O                        0,25 mg  
     (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> • 4 H<sub>2</sub>O              1,25 mg  
     mit H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> auf 100 ml auffüllen, autoklavieren

GM32-Medium:	200 $\mu$ l	MgSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O (0,5 M)
	200 $\mu$ l	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (1 M)
	100 $\mu$ l	KCl (1 M)
	100 $\mu$ l	MES (1 M)
	100 $\mu$ l	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 3 H <sub>2</sub> O (10 mM)
	10 $\mu$ l	KBr (0,1 mM)
	10 $\mu$ l	Spurenelementlösung WC I
	10 $\mu$ l	Spurenelementlösung WC II
		auf 1 l mit H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub> auffüllen, mit KOH auf pH 6 einstellen, autoklavieren

## Spurenelementlösung

WC I:	FeCl <sub>3</sub> • 6 H <sub>2</sub> O	315,00 mg
	Na <sub>2</sub> EDTA • H <sub>2</sub> O	436,00 mg
	Thiamin-HCl	10,00 mg
	Biotin (Vit. H)	0,05 mg
	Cyanocobalamin (Vit. B12)	0,05 mg
		auf 100 ml mit H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub> auffüllen, autoklavieren

## Spurenelementlösung

WC II:	ZnSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O	2,20 mg
	MnCl <sub>2</sub> • 4 H <sub>2</sub> O	18,00 mg
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	100,00 mg
	CoCl <sub>2</sub> • 6 H <sub>2</sub> O	1,00 mg
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> • 2 H <sub>2</sub> O	1,99 mg
	CuSO <sub>4</sub> • 5 H <sub>2</sub> O	0,245 mg
	NaHSeO <sub>3</sub>	0,152 mg
	NiCl <sub>2</sub> • 6 H <sub>2</sub> O	0,244 mg
	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	0,184 mg
	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	0,147 mg
		auf 100 ml mit H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub> auffüllen, autoklavieren

## 3.1.4.4 Lösungen für physiologische Experimente

## Cellulose-Campher-Gemisch:

Aceton	375 ml
n-Propanol	125 ml
Campher	10 g
Celluloseacetat	33 g
Diethylenglycol	15 g ( $\cong$ 14 ml)

Ansatz ca. einen Tag rühren

Laufmittel für 2D-Dünnschichtchromatographie nach FEIGE ET AL. (1969):

Laufmittel I (für 1. Dimension):

Isobuttersäure - NH<sub>3</sub> - H<sub>2</sub>O - EDTA im Verhältnis 1000:50:550:0,5 (v/v/v/g)  
EDTA zunächst in angegebener Menge Wasser lösen,  
dann übrige Bestandteile zugeben

H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub>	68,75 ml
EDTA	0,06 g
Isobuttersäure	125 ml
33 %iger Ammoniak	6,25 ml
$\Sigma$	200 ml

Laufmittel II (für 1. Lauf, 2. Dimension):

n-Butanol - n-Propanol - n-Propionsäure - H<sub>2</sub>O im Verhältnis 400:175:285:373

n-Butanol	64,9 ml
n-Propanol	28,4 ml
n-Propionsäure	46,2 ml
H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub>	60,5 ml
$\Sigma$	200 ml

Laufmittel III (für 2. Lauf, 2. Dimension):

n-Butanol - Essigsäure - H<sub>2</sub>O im Verhältnis 5:1:4  
(im Scheidetrichter, obere Phase)

n-Butanol	500 ml
Essigsäure (Eisessig)	100 ml
H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub>	400 ml

im Scheidetrichter ausschütteln, absitzen lassen  
und untere Phase verwerfen

70 % Methanol:

Methanol	70 % (v/v)
H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub>	30 % (v/v)

### 3.1.5 DNA-Längenstandards

MASS-Ruler 100 bp Ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Roth)

Fragmentgrößen:

80 bp, 100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 600 bp, 700 bp, 800 bp, 900 bp, 1000 bp

SPP1/*EcoRI*

Isolierte DNA des Bakteriophagen SPP1, hydrolytisch gespalten mit dem Restriktionsenzym *EcoRI*.

Fragmentgrößen:

370 bp, 490 bp, 680 bp, 1000 bp, 1150 bp, 1400 bp, 1500 bp, 1850 bp, 1900 bp, 2700 bp, 3500 bp, 4800 bp, 6000 bp, 7100 bp, 8100 bp

MIX: Lambda/HindIII, ΦX174/HaeIII (Biometra, Göttingen)

Mischung isolierter und mit den Restriktionsenzymen HindIII bzw. HaeIII hydrolytisch gespalter DNA der Bakteriophagen Lambda bzw. ΦX174.

Fragmentgrößen:

72 bp, 118 bp, 194 bp, 234 bp, 271 / 281 bp, 310 bp, 564 bp, 603 bp, 872 bp, 1078 bp, 1353 bp, 2027 bp, 2322 bp, 4361 bp, 6682 bp, 9416 bp, 23130 bp

Plasmid pCR 2.1

Plasmid ohne insertierte Fremd-DNA, isoliert aus blauer Kolonie nach  $\alpha$ -Komplementationstest (intaktes  $\beta$ -Galaktosidase-Gen), vorliegend in der nativen *supercoiled*-Form, Größe: 3,9 kb

### 3.1.6 Enzyme

<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	PE Applied Biosystems, Langen, Peqlab, Erlangen
<i>Tbr</i> -DNA-Polymerase	Hybaid-AGS, Heidelberg
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Biometra, Göttingen
Advantage® 2 Polymerase Mix	Peqlab, Erlangen
M-MLV Reverse Transkriptase, Superscript II (RNase H-)	Clontech, Heidelberg
T4 DNA-Ligase	GibcoBRL, Life Technologies, Eggenstein
RNase A	Stratagene, Heidelberg
	Sigma, Deisenhofen

### 3.1.7 Restriktionsenzyme

<u>Bam</u> HI (12 U/ $\mu$ l)	Eurogentec, Searing (Belgien)
<u>Eag</u> I (10 U/ $\mu$ l)	NEB, Frankfurt
<u>Eco</u> RI (10 U/ $\mu$ l)	MBI Fermentas, St Leon-Rot
<u>Hind</u> III (12 U/ $\mu$ l)	Boehringer, Mannheim
<u>Kpn</u> I (10 U/ $\mu$ l)	Appligene Oncor, jetzt Q-biogene, Heidelberg
<u>Not</u> I (10 U/ $\mu$ l)	Stratagene, Heidelberg
<u>Xho</u> I (10 U/ $\mu$ l)	Appligene Oncor, jetzt Q-biogene, Heidelberg

### 3.1.8 Bakterienstämme

#### XL-1Blue MRF' (Stratagene)

Genotyp:  $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac}$  [F' *proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)*]

#### SOLR (Stratagene)

Genotyp: e14(McrA<sup>-</sup>)  $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 \text{ sbcC recB recJ uvrC umuC::Tn5 (Kan<sup>r</sup>) lac gyrA96 relA1 thi-1endA1 } \lambda^R$  [F' *proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15*] Su<sup>-</sup> (non-suppressing)

#### TOP10F' (Invitrogen)

Genotyp: F' {*lacI<sup>q</sup> Tn 10 (Tet<sup>R</sup>)*} *mcrA*  $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \Phi 80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 \text{ recAI araD139 } \Delta(ara-leu)7697 \text{ galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG}$

#### TOP10F (Invitrogen)

Genotyp: F- *mcrA*  $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \Phi 80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 \text{ recA1 deoR araD139 } \Delta(ara-leu)7897 \text{ galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG}$

### 3.1.9 Phagenstämme

#### $\lambda$ Uni-ZAP XR

Lambda ZAP II-Vektor, zum gerichteten Einbau von cDNA-Fragmenten enzymatisch hydrolysiert mit EcoRI-XhoI, Enden dephosphoryliert mit Calf Intestine Alkaline Phosphatase.

#### $\lambda$ ZAPII

Lambda ZAP II-Vektor, zum Einbau von beliebigen DNA-Fragmenten enzymatisch hydrolysiert mit EcoRI, Enden dephosphoryliert mit Calf Intestine Alkaline Phosphatase.

#### ExAssist helper phage

Zur *in vivo*-Excision des pBluescript SK-Phagemids aus der rekombinanten  $\lambda$ -DNA des entsprechend isolierten rekombinanten  $\lambda$  ZAPII-Klons.

Durch Doppelinfektion eines nicht suppressiven Wirtsstammes mit dem rekombinanten  $\lambda$  ZAPII-Klon und dem ExAssist helper phage wird die Lyse der Bakterien durch den  $\lambda$  ZAPII-Klon unterdrückt, das Phagemid aus der  $\lambda$ -DNA herausgeschnitten und circularisiert und vermehrt sich im Wirtsstamm wie ein Plasmidvektor.

### 3.1.10 Vektoren

Für die Klonierungen von amplifizierten DNA-Fragmenten wurden in dieser Arbeit 3 Arten von Plasmiden verwendet:

Ligase-basierende Vektoren (pCR 2.1 Original, pCR BLUNT Original [Invitrogen])

Dies ist der Standardtyp der Plasmid-Vektoren. PCR-Produkte werden unter Verwendung des Enzyms Ligase in das linearisierte Plasmid eingebaut, das Plasmid wird dabei ringförmig geschlossen. Die beiden o.a. Plasmide wurden je nach verwendeter DNA-Polymerase benutzt. *Taq*-Polymerase synthetisiert „sticky ends“ (überhängendes „A“ am 5'-Ende des PCR-Produkts), *Pfu*- und *Pwo*-Polymerasen bzw. Mixturen derselben mit *Taq*-Polymerase synthetisieren „blunt ends“.

Topoisomerase-gekoppelte Vektoren (pCR 2.1-TOPO, pCR-BLUNT II-TOPO, pCR 4-TOPO for Sequencing [Invitrogen])

Vektoren, die die Ligasefunktion des Enzyms Topoisomerase I nutzen. Diese kann Überspiralisierungen von DNA-Doppelsträngen dadurch auflösen, dass ein DNA-Strang hydrolytisch gespalten wird, wobei das Enzym kovalent an das frei werdende Ende des DNA-Stranges bindet. Die entstandene Bindung ist energiereich, die Energie wird zum Wiederverknüpfen von DNA-Enden genutzt. Die TOPO-Vektoren bieten einen entscheidenden Zeitvorteil gegenüber den herkömmlichen Vektoren, da die Ligationsreaktion nur 5 min (gegenüber 14 h) dauert und bei Raumtemperatur (statt 14 °C bzw. 4 °C) durchgeführt werden kann.

Die Vektoren pCR-BLUNT Original, pCR-BLUNT II-TOPO und pCR 4-TOPO bieten außerdem noch die Möglichkeit, auf einen  $\alpha$ -Komplementationstest zu verzichten, da sie ein für *E. coli* letales Gen (*ccdb*) tragen, dessen Leseraster durch den Einbau eines DNA-Fragments unterbrochen und das Genprodukt damit deaktiviert wird. Es überleben auf dem antibiotikahaltigen Selektionsmedium also nur Stämme, die

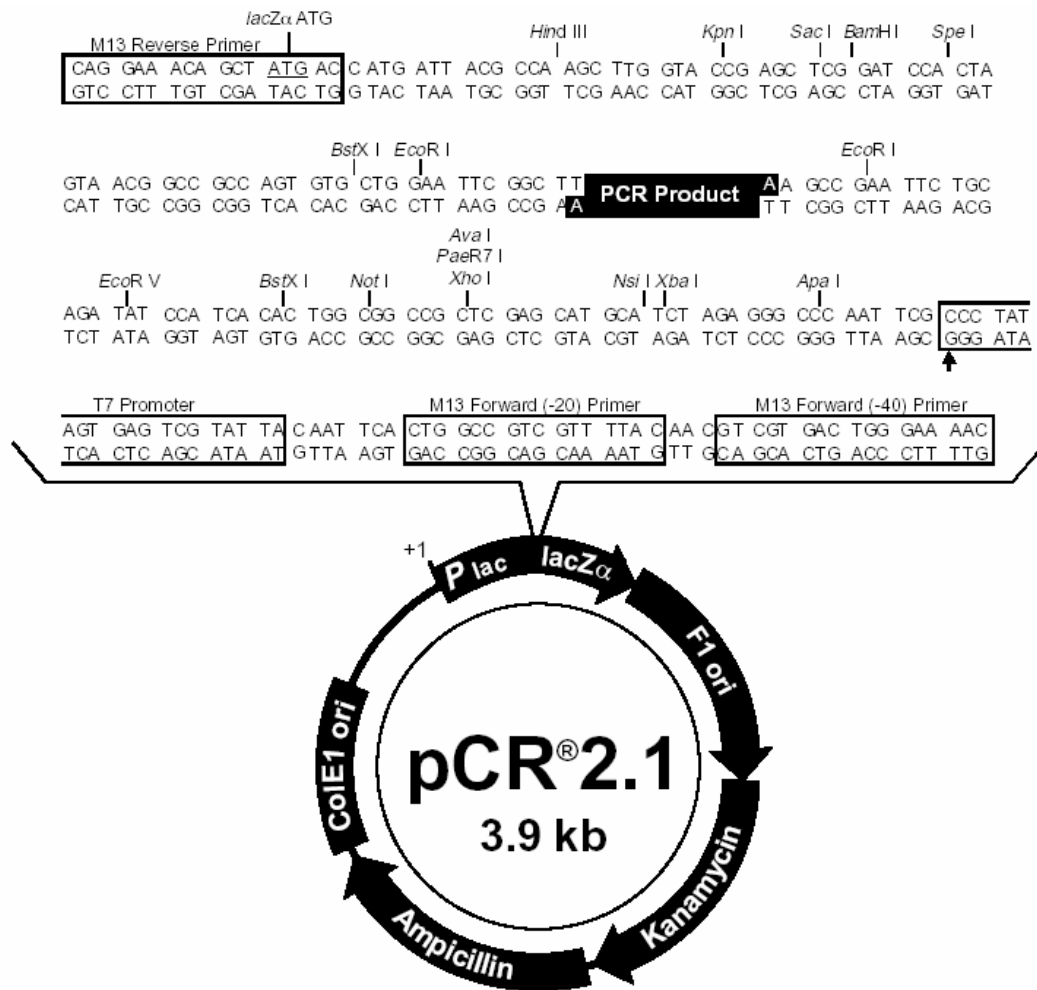
- a) ein Plasmid mit dem entsprechenden Antibiotikaresistenzgen und
- b) ein in die multiple Klonierungsstelle eingebautes DNA-Fragment besitzen.

Phagemid-Vektoren (pBluescript SK phagemid [Stratagene])

Phagemid-Vektoren sind Abkömmlinge einer genomischen DNA-Genbank, bei der die Wirtsbakterien mit Fremd-DNA tragenden  $\lambda$ -Phagen und ExAssist Helper-Phagen doppelinfiziert werden. Dabei werden in doppelinfizierten *E. coli*-Bakterien die Fremd-DNA und flankierende DNA-Bereiche aus dem Genom des  $\lambda$ -Phagen ausgeschnitten und zirkularisiert. Es bildet sich ein Plasmid, das die entsprechende Fremd-DNA des  $\lambda$ -Phagen sowie ein Antibiotikaresistenzgen trägt. Eine Selektion auf Bakterien, die das Phagemid tragen, erfolgt durch anschließendes Anziehen der Stämme auf antibiotikahaltigen Medien.

Beispielhaft werden hier die Plasmidkarten von jeweils einem Vertreter der verwendeten Vektortypen gezeigt. Die entsprechenden Karten der anderen Plasmide sind auf der Homepage des Herstellers ([HTTP://WWW.INVITROGEN.COM](http://www.invitrogen.com)) abrufbar.

## pCR 2.1 Original (Invitrogen)

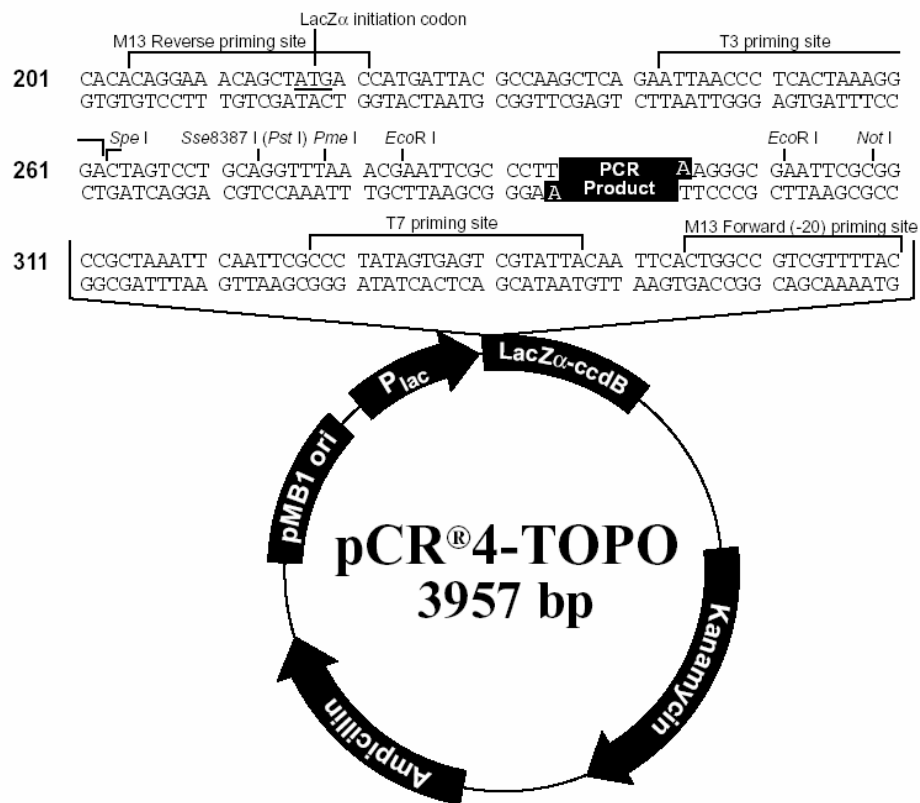


**Abb. 5: Vektorkarte pCR 2.1 Original (nach Invitrogen, 1999)**

Die entsprechenden Markierungen innerhalb des Vektors bedeuten:

*P<sub>lac</sub>* - *lac*-Promotor zur bakteriellen Expression des *lacZ $\alpha$*  Fragments, *lacZ $\alpha$*  - codiert für die ersten 146 Aminosäuren der  $\beta$ -Galaktosidase, *F1 ori* - Replikationsursprung zur Sequenzierung des *sense*-Stranges, Kanamycin - Kanamycin-Resistenzgen, Ampicillin - Ampicillin-Resistenzgen, ColE1<sub>ori</sub> - Replikationsursprung für die Replikation in *E. coli*, T7 Promotor - Zur *in vivo* oder *in vitro* Transkription von *anti-sense* RNA bzw. zur Sequenzierung, M13 forward (-20 und -40) bzw. M13 reverse Primerbindestellen - zur Sequenzierung des Inserts.

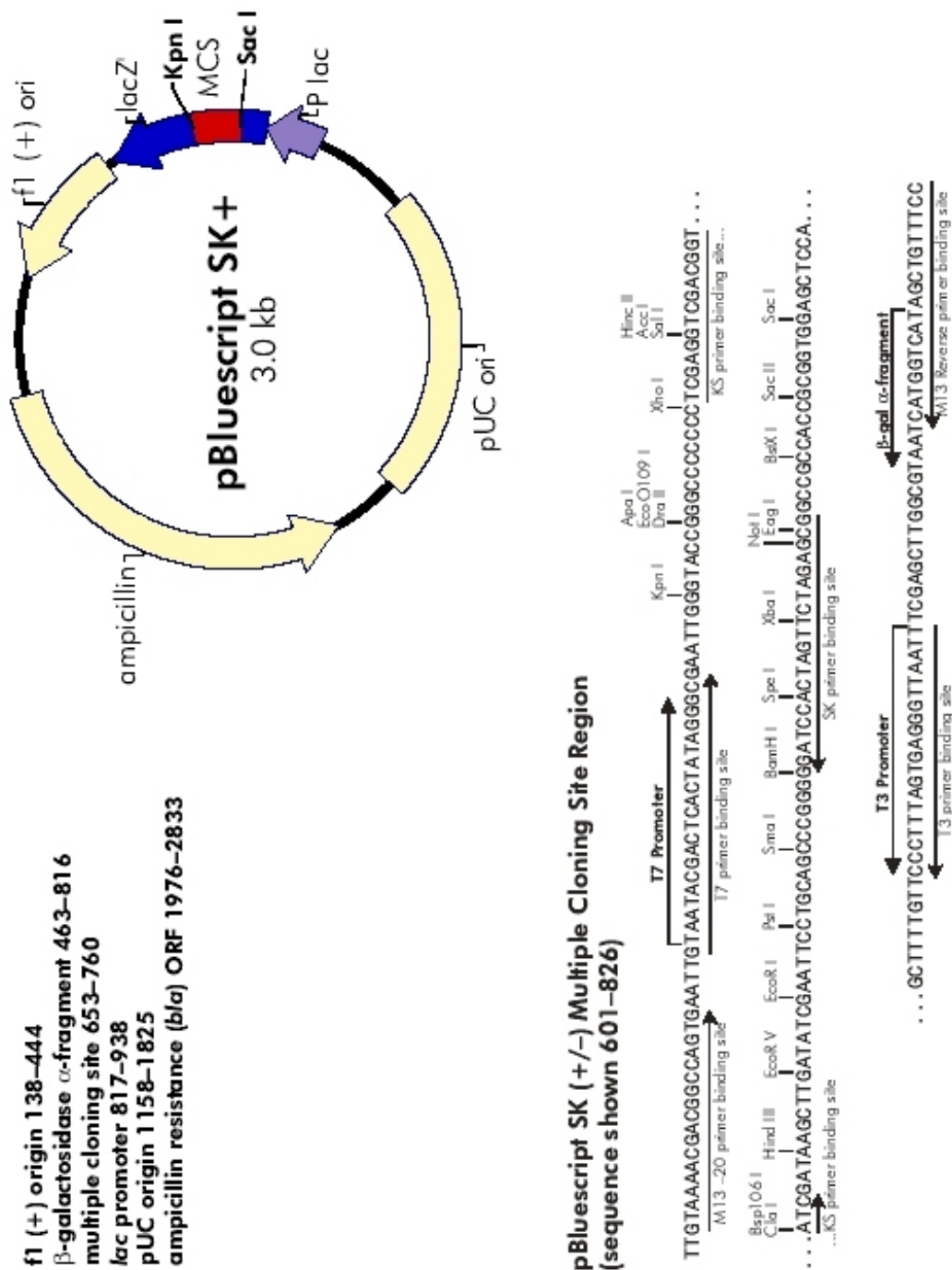
## pCR 4-TOPO for Sequencing (Invitrogen)

**Abb. 6: Vektorkarte pCR 4-TOPO for Sequencing (nach Invitrogen, 2000)**

Die entsprechenden Markierungen innerhalb des Vektors bedeuten:

$P_{lac}$  - *lac*-Promotor zur bakteriellen Expression des *lacZ $\alpha$*  Fragments, *lacZ $\alpha$ -ccdB* - codiert für die ersten 146 Aminosäuren der  $\beta$ -Galaktosidase bzw. ein letales Genprodukt, Kanamycin - Kanamycin-Resistenzgen, Ampicillin - Ampicillin-Resistenzgen, pMB1<sub>ori</sub> - Replikationsursprung für die Replikation in *E. coli*, T7 und T3 Promotor - Zur *in vivo* oder *in vitro* Transkription von *anti-sense* bzw. *sense* RNA bzw. zur Sequenzierung, M13 forward (-20 und -40) bzw. M13 reverse Primerbindestellen - zur Sequenzierung des Inserts.

## pBluescript SK phagemid (Stratagene)



**Abb. 7: Vektorkarte pBluescript SK Phagemid (nach Stratagene, 2004 verändert)**

Die entsprechenden Markierungen innerhalb des Vektors bedeuten:

MCS – Multiple Klonierungsstelle mit flankierenden T7- und T3- Primerbindestellen, *lacZ* - codiert für die ersten 146 Aminosäuren der  $\beta$ -Galaktosidase, F1(+)<sub>ori</sub> bzw. F1(-)<sub>ori</sub> – Replikationsursprung zur Sequenzierung des *sense*-Stranges – Orientierung variabel, da ein Umbau durch den Helperphagen während der *in vivo* Excision in *E. coli* erfolgt, ampicillin – Ampicillin-Resistenzen, pUC<sub>ori</sub> – Replikationsursprung für die Replikation in *E. coli*, T7 Promotor und T3 Promotor – Zur *in vivo* oder *in vitro* Transkription von *anti-sense* bzw. *sense* RNA bzw. zur Sequenzierung, pLac – Lac Promotor, M13 forward (-20), M13 reverse SK und KS Primerbindestellen – zur Sequenzierung des Inserts.

## Oligonucleotide

Die Oligonucleotide wurden von der Fa. Roth (Karlsruhe) lyophilisiert geliefert, mit sterilem H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> auf eine Konzentration von 100 pmol/μl eingestellt (Stammlösung) und ggf. weiter auf 10 pmol/μl verdünnt (PCR-Gebrauchslösung).

Liste verwendeter Oligonucleotide:

Primername	Orientierung	Degenerationsgrad / μl pro 50 μl PCR-Ansatz	Nucleotidsequenz in 5'-3' Richtung
P1-HG (58 °C)	5'-3'	64 / 5	5' - ATG TCI ACN TCI GAY AGR GTN AC - 3'
P2-HG (54 °C)	5'-3'	256 / 20	5' - TYA TGG AYG CNT AYG AYC TNT T - 3'
P3-HG (56 °C)	5'-3'	384 / 30	5' - CTN ACI ATH CCN GAR CAN CC - 3'
P4-HG (56 °C)	5'-3'	128 / 10	5' - CCN GGI TAY TGG GTN CAN GC - 3'
P5-HG (54 °C)	5'-3'	128 / 10	5' - ATG GGN TTY GGI GTN CTN AC - 3'
P6-HG (54 °C)	3'-5'	192 / 15	5' - GCR TCN GCY TTD ATY CTY TC - 3'
P7-HG (52 °C)	3'-5'	192 / 15	5' - GAN CCY TTI GTY TCN GGD AT - 3'
P8-HG (54 °C)	3'-5'	128 / 10	5' - GTI AGN CAN CCR AAN CCC AT - 3'
P9-HG (58 °C)	3'-5'	128 / 10	5' - GCI GTN ACC CAR TAN CCN CC - 3'
P10-HG (58 °C)	3'-5'	384 / 30	5' - GGI GTY TCN GGD ATN GTN AG - 3'
P11-HG (60 °C)	5'-3'	48 / 3,75	5' - CGT ATT GGW GGW GAY TAY CCH - 3'
P12-HG (60 °C)	3'-5'	64 / 5	5' - GGR TAR TCW CCW CCA ATR CCR - 3'
P13-HG (60 °C)	5'-3'	144 / 11,25	5' - CAA AAY TTY GGI CCH AAY TCH AC - 3'
P14-HG (58 °C)	3'-5'	144 / 11,25	5' - GTD GYR TTD GGI CCR AAR TTT TG - 3'
P15-HG (60 °C)	5'-3'		5' - CTG CCG TCG ACA TTG TTG G - 3'
P16-HG (60 °C)	3'-5'		5' - TAC CAG CAG AGG TGG CCA G - 3'
P17-HG (60 °C)	3'-5'		5' - AAG CAG GCA TCT TTC CAG TGC - 3'
P18-HG (60 °C)	3'-5'		5' - CCA ACA ATG TCG ACG GCA G - 3'
P19-HG (60 °C)	5'-3'		5' - GCA CTG GAA AGA TGC CTG C - 3'
P20 (70 °C)	5'-3'		5' - GTC GGA CGT AAG CGC ATG TAC G - 3'
P21 (72 °C)	5'-3'		5' - CTC TTG CCC AGT CTC TTA CTG CC - 3'
P22 (60 °C)	3'-5'	128 / 10	5' - RGT WGA WCK GTA WCG WGT WGG - 3'
P23(r 68 °C)	3'-5'	512 / 40	5' - CCN SWK GCA GCW GAN ATA CCR TG - 3'
P16a (72 °C)	3'-5'		5' - AAC AAC GGT ACC AGC AGA GGT GG - 3'
P16b (70 °C)	3'-5'		5' - ATG GCA TTG TCA GAG GAA GCA GG - 3'
P18a (70 °C)	3'-5'		5' - GAC CAA CAA TGT CGA CGG CAG G - 3'

**Tab. 1:** Primer für das Phosphattransportergen von *Geosiphon pyriformis*

Primername	Orientierung	Nucleotidsequenz in 5'-3' Richtung
SMART II-Oligo		5' - AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA CGC GGG - 3'
3'-CDS		5' - AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA C (T) <sub>30</sub> VN - 3'
5'-CDS		5' - (T) <sub>30</sub> VN - 3'
UP-Long		5' - CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAA GCA GTG GTA ACA ACG CAG AGT - 3'
UP-Short		5' - CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C - 3'

wurden als UPM (universal primer mix) in einer Konzentration der Stammlösung von 0,2 µM UP-Long und 1 µM UP-Short eingesetzt

NUP-RACE		5' - AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GT - 3'
OWM30		5' - AAG GAT CCG TCG ACT GCA GAA TTC AAG CTT (T) <sub>17</sub> - 3'
OWM31		5' - AAG GAT CCG TCG ACT GC - 3'
OWM32		5' - CGA CTG CAG AAT CAA GCT - 3'
Oligo-dT <sub>18</sub>		5' - (T) <sub>18</sub> - 3'
Oligo-dT <sub>25</sub>		5' - (T) <sub>25</sub> - 3'

**Tab. 2: RACE- und RT-Primer**

Primername	Orientierung	Nucleotidsequenz in 5'-3' Richtung
EuBac 27f	5'-3'	5' - GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG - 3'
EuBac 1495r	3'-5'	5' - CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA - 3'
GeoBLO1-FV	5'-3'	5' - GGC ATG GAT TAA TAC TCT GTG C - 3'
GeoBLO2-FV	3'-5'	5' - CCT TGC GGT TAA GCT ACC TAC - 3'
GeoBLO3-FV	5'-3'	5' - GGC GGT TTT GTA AGT CTG TC - 3'
GeoBLO4-FV	3'-5'	5' - GGA CTA CGA TAC ACT TTC TGG - 3'
GeoBLO5-FV	5'-3'	5' - GAA GGA ATC CTG GAG AGA TCC - 3'

**Tab. 3: Primer für das bakterielle 16S-rRNA-Gen**  
(für bacteria-like organisms in *Geosiphon pyriformis*)

Primername	Orientierung	Nucleotidsequenz in 5'-3' Richtung
BLOst 1a-AS	5'-3'	5' - GGA TGG TCC AGA TCG CAA CG - 3'
BLOst 2-AS	3'-5'	5' - CGG GTT TGC CAT GGT CAT CC - 3'
BLOst 3a-AS	5'-3'	5' - ACC AGC ACC GCG ATA TGG AC - 3'
BLOst 4-AS	3'-5'	5' - GGA TTC CGG AAG AGA CGC TCG - 3'
BLOst 5-AS	5'-3'	5' - CGA GCG TCT CTT CCG GAA TCC - 3'
BLOst 6-AS	3'-5'	5' - CGG TCT GGA TCC AGA TCA GG - 3'
BLOst 7-AS	5'-3'	5' - ACG GCA GCG ATA TCC AGA CC - 3'

**Tab. 4: Primer für das bakterielle Zuckertransportergen**  
(für bacteria-like organisms in *Geosiphon pyriformis*)

Primername	Orientierung	Nucleotidsequenz in 5'-3' Richtung
M13 fwd (-20)		5' - GTA AAA CGA CGG CCA G - 3'
M13 rev		5' - CAG GAA ACA GCT ATG AC - 3'
T7		5' - GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C - 3'
T7-long (72 °C)		5' - AAT TGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GC - 3'
T3		5' - AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG - 3'
T3-long (72 °C)		5' - CTC GAA ATT AAC CCT CAC TAA AGG G - 3'

**Tab. 5: Standard-Sequenzierprimer**

### 3.1.11 Organismen

#### 3.1.11.1 *Geosiphon pyriformis*

Systematische Einordnung nach SCHÜßLER ET AL. (2001)

**Abteilung:** *Glomeromycota* C. WALKER & SCHUESSLER

**Klasse:** *Glomeromycetes* CAVALIER-SMITH

**Ordnung:** *Archaeosporales* C. WALKER & SCHUESSLER

**Familie:** *Geosiphonaceae*

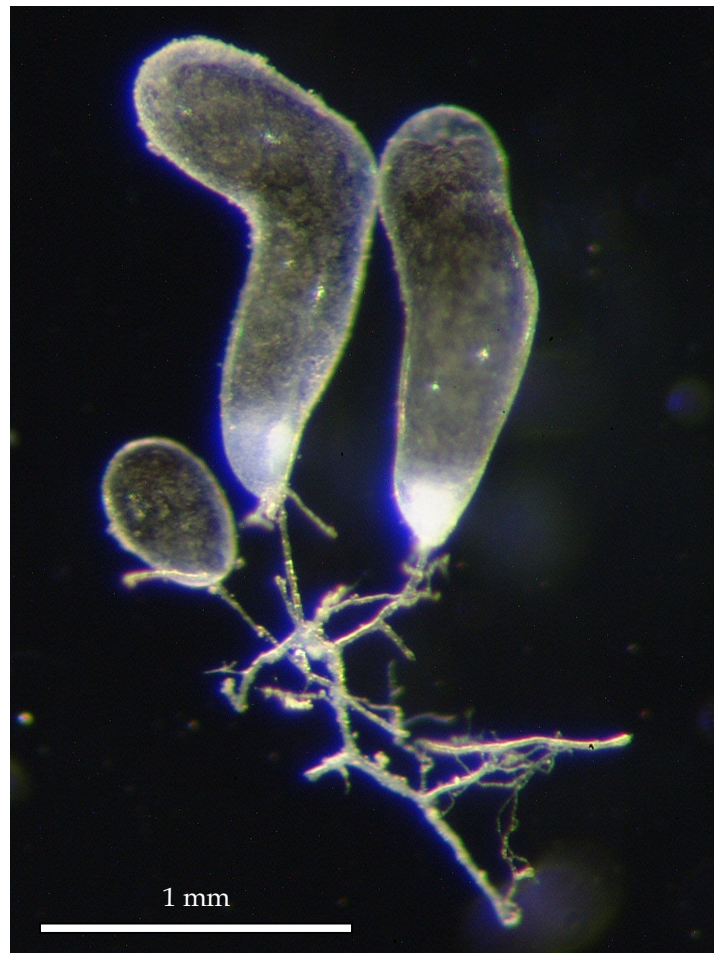
**Art:** *Geosiphon pyriformis* (KÜTZ.) V. WETTST.

#### Anzuchtbedingungen:

*Geosiphon pyriformis* wurde auf einem Gemisch aus Erde vom natürlichen Standort (Ochsenburg, Biebergemünd, Gemeinde Bieber, Spessart) und Aktivkohle kultiviert. Vom Standort abgegrabene Erde wurde dazu trocken durch ein Haushaltshaarsieb gerieben und von Wurzelteilen befreit, der Aktivkohleanteil betrug ca.  $\frac{1}{4}$  Teelöffel auf 500 g Erde. Diese wurde anschließend bis zu einer Füllhöhe von  $\frac{3}{4}$  des Topfes in einen Thermo-Geli Plastikblumentopf (Dehner, Heidelberg) gefüllt, dessen Bodenlochung mit grobkörnigem Aquariensand (Dehner, Heidelberg) bedeckt war und feinkörnigen Quarzsand (Sigma, Deisenhofen) bis zur Höhe der Bodenwölbung enthielt. Die Erde im Blumentopf wurde durch Einstellen in  $H_2O_{demin.}$  durchfeuchtet und der Topf anschließend in ein Becherglas, das bis zu einer Füllhöhe von ca. 2 cm mit  $H_2O_{demin.}$  gefüllt war, gestellt, wobei der Topfboden die Wasseroberfläche nicht berühren sollte. Die so vorbereiteten Töpfe wurden mit Glaspetrischalen abgedeckt und mehrfach mit jeweils einem Tag Unterbrechung autoklaviert. Die Unterbrechungen sind wichtig, um evtl. in der Erde vorhandene Pilzsporen, die zum Teil resistent gegen feuchte Hitze sind, in der feuchten Erde keimen zu lassen und das Pilzmycel dann beim nächsten Autoklavieren abzutöten. Dabei wurde nach jedem Autoklavieren kontrolliert, ob sich der Wasserfüllstand in den Bechergläsern verändert hat und ggf. steriles  $H_2O_{demin.}$  nachgefüllt. Nach dem letzten Autoklaviervorgang wurden die abgekühlten Kulturbehälter unter der Sterilbank beimpft, die Glasdeckel der Bechergläser gegen sterile Plastikpetrischalendeckel ausgetauscht und die Kulturgefäße mit in 70 % Ethanol sterilisiertem Parafilm verschlossen. Die Beimpfung erfolgte entweder an drei Stellen auf der Bodenoberfläche durch Pakete von mehreren, mit Hyphen verbundenen Blasen aus einer älteren Kultur von *Geosiphon pyriformis* oder durch gleichzeitige Beimpfung mit 40 Dauersporen von *Geosiphon pyriformis* und einer kleinen Menge des entsprechenden symbiotischen *Nostoc*-Stammes. Die so beimpften Kulturen wurden in einem Klimaschrank (Vötsch, Balingen) in einem Tag/Nacht-Rhythmus von 14 h Licht bei 90 - 110  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  auf

Kulturebene und 22 °C, sowie 10 h Dunkelheit bei 18 °C inkubiert. Nach 6 - 8 Wochen zeigten sich in der Regel neu gebildete Blasen von *Geosiphon pyriformis*. Bis zu einer stabilen Kultur vergingen meistens 3 Monate.

Das für die Experimente verwendete Blasenmaterial wurde von der Kultur (für die Wuchsform vgl. Abbildung 3 in der Einleitung) entnommen und unter dem Stereomikroskop von anhaftenden Hyphen und Substrat gereinigt. Eine mikroskopische Aufnahme ist in Abbildung 8 dargestellt.

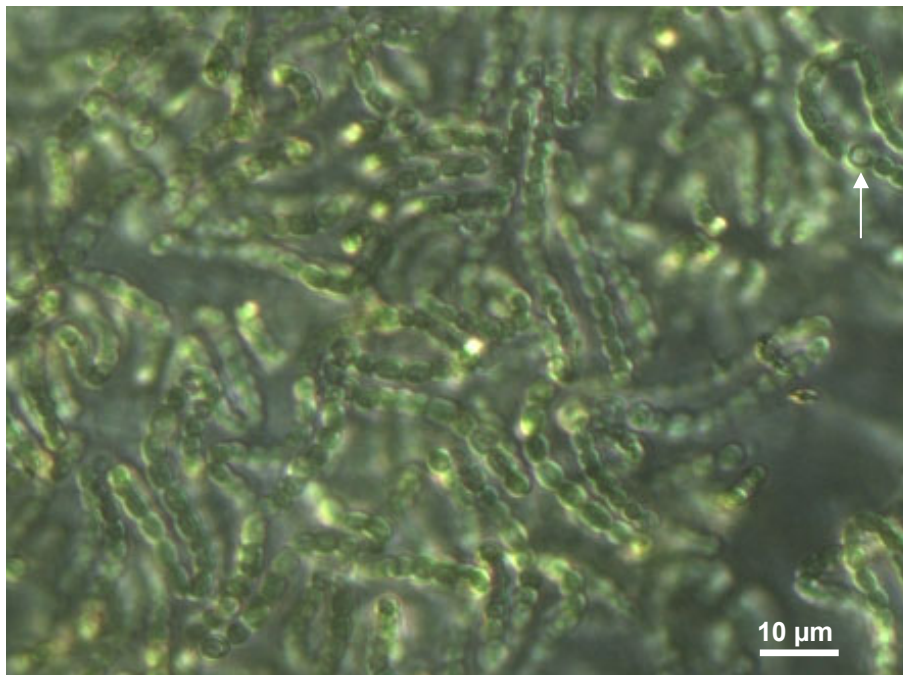


**Abb. 8:** Blasen von *Geosiphon pyriformis* in Wasser,  
stereomikroskopische Aufnahme: Elke Wolf

### 3.1.11.2 *Nostoc punctiforme*

#### Stammcharakteristika Stamm 1-1:26 (aus *Geosiphon pyriformis*)

Der *Nostoc punctiforme* Stamm 1-1:26 wurde ursprünglich in isotonischem Medium aus dem Symbiosom der Symbiose *Geosiphon pyriformis* isoliert. Belegstämme bestehen in den Sammlungen der Algensammlung (SAG) in Göttingen (69.79) und des Institut Pasteur in Paris (PCC 9503). Im Laufe unserer Untersuchungen erhärtete sich der Verdacht, daß die aus Göttingen bezogene Kultur nicht axenisch war, sondern u. U. sogar eine Mischkultur aus zwei unterschiedlichen Stämmen darstellt (E. WOLF, PERS. MITTEILUNG). Der Stamm des Institut Pasteur PCC 9503 war nicht lieferbar. Eine lichtmikroskopische Aufnahme einer Kultur von *Nostoc punctiforme* ist in Abbildung 9 dargestellt.



**Abb. 9:** Kultur von *Nostoc punctiforme* auf Agar, lichtmikroskopische Aufnahme: Elke Wolf, Pfeil = Heterocyste

#### Kulturbedingungen:

*Nostoc punctiforme* Stamm 1-1:26 wurde parallel in 10 cm Plastikpetrischalen auf den Medien BG11 sowie GM 32, verfestigt mit 2 % Agar-Agar, kultiviert. Bevor man die Petrischalen mit *Nostoc punctiforme* beimpfte, wurde die Medienschiicht mit einer Lage handelsüblichem Einmachcellophan (Folia, über Minimal, Darmstadt) belegt. Dieses behindert die Aufnahme von Nährstoffen durch die *Nostoc*-Zellen nicht, macht ein Abnehmen der kultivierten Cyanobakterien jedoch erheblich einfacher, da sie ohne Cellophan in die Agarschicht wachsen. Die Cyanobakterien wurden ebenfalls in einem Kulturschrank (Vötsch, Balingen) kultiviert, der die gleichen Einstellungen wie der für die *Geosiphon*-Kulturen hatte, jedoch nur eine Belichtung mit ca. 45 µmol/m<sup>2</sup>s.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Agarosegelelektrophorese

#### 3.2.1.1 Standardmethode nach SAMBROOK ET AL., 1989

Durch Agarosegelelektrophorese können DNA- und RNA-Moleküle nach ihrer Wandergeschwindigkeit im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Entscheidende Faktoren für die Wandergeschwindigkeit sind Größe und relative Ladung des Nukleinsäuremoleküls, sowie die Durchschnittsgröße der Poren in der Gelmatrix, die wiederum von der Agarosekonzentration abhängt.

In dieser Arbeit wurden vorwiegend 0,8 %ige (w/v) Agarosegele (Agarose NEEO, Roth, Karlsruhe) verwendet, für bestimmte Anwendungen (Auftrennung sehr kleiner Fragmente bis ca. 100 bp Länge) wurden aber auch Konzentrationen bis 2 % (w/v) Agarose unter Verwendung der in höherem Maße quervernetzenden Agarose MP (AppliChem, Darmstadt) eingesetzt. Die Gele wurden in 1x TAE-Puffer angesetzt, der auch gleichzeitig als Laufpuffer in der Elektrophoresekammer verwendet wurde.

Die Agarose wurde durch Aufkochen in einem Mikrowellengerät in 1x TAE gelöst und die Gele nach Abkühlen auf ca. 55 °C gegossen. Die DNA wurde vor dem Auftragen mit 1/10 Vol. 10x DNA-Auftragspuffer versetzt, als Längenstandard diente in der Regel SPP1/EcoRI.

#### 3.2.1.2 Denaturierende Agarosegelelektrophorese von RNA (KROCZEK & SIEBERT, 1990)

Die denaturierende Agarosegelelektrophorese wurde zur Auftrennung isolierter RNA benutzt.

Im Gegensatz zur Agarosegelelektrophorese nach SAMBROOK ET AL., 1989 konnten die RNA-Gele nicht auf Vorrat angesetzt werden, sondern wurden zu jeder Anwendung neu vorbereitet. Dazu wurden 1,8 g Agarose in 130 ml DEPC-Wasser in einem Mikrowellengerät gelöst und unter Rühren auf 55 °C abgekühlt. Das Gel wurde mit 15 ml 10x MOPS-Puffer und 5 ml 37 %iger Formaldehydlösung versetzt und gegossen.

Zur Denaturierung von Sekundärstrukturen der RNA wurden in der Regel 5 µl der RNA-Lösung in ein auf Eis vorgelegtes Gemisch aus 12,5 µl Formamid, 4 µl 37 %iger Formaldehydlösung und 2,5 µl 10x MOPS-Puffer pipettiert, 2 µl Ethidiumbromidlösung zugeben und die so vorbereiteten Proben 15 min bei 55 °C im Wasserbad inkubiert, danach 1 min auf Eis gestellt, mit 3-5 µl RNA-Auftragspuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 90 V über ca. 60 min, als Laufpuffer wurde 1x MOPS benutzt.

### 3.2.1.3 Alkalische Agarosegelelektrophorese (SAMBROOK ET AL., 1989)

Die alkalische Agarosegelelektrophorese diente der Denaturierung von sekundären Haarnadelstrukturen von DNA. Auch in diesem Fall wurden die Gele prinzipiell frisch angesetzt. Dazu wurden 0,8 g Agarose in 72 ml H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> in einem Mikrowellengerät gelöst und unter Rühren auf 55 °C abgekühlt. Das Gel wurde mit 8 ml 10x alkalischem Gelpuffer versetzt, nochmals kurz gerührt und sofort gegossen. Da bei alkalischen Gelen die Verfestigung problematisch war, mußte hierbei auf die genaue Einhaltung der Temperaturvorgaben geachtet werden. Zur Gelelektrophorese wurden die DNA-Proben mit 1/10 Volumeneinheit alkalischem Auftragspuffer versetzt. Die Elektrophorese wurde in 1x alkalischem Gelpuffer durchgeführt.

### 3.2.2 Visualisierung aufgetrennter Nukleinsäurefragmente

Zur Auswertung und Dokumentation wurden die Agarosegele gegen Ende der Elektrophorese aus dem Laufpuffer genommen und zur Färbung ca. 1 min in eine Ethidiumbromidlösung (5 mg/l) gelegt. Der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen doppelsträngiger Nukleinsäuremoleküle und fluoresziert bei Anregung mit UV-Licht ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) orange. Die Entfärbung erfolgte durch kurzes Nachspülen mit Leitungswasser und weitere 15 min Elektrophorese mit geringerer Elektrophoresespannung. Die so gefärbten Gele wurden auf einer UV-Durchlichtapparatur mit einer Digitalkamera (BioPhotonics, Ann Arbor, USA) dokumentiert.

### 3.2.3 DNA-Isolationsmethoden

#### 3.2.3.1 Isolation von Sporen-DNA aus großen Sporenmengen von *Geosiphon pyriformis* nach ZÉZÉ ET AL., 1994

##### 3.2.3.1.1 Vereinzelung, Reinigung und Oberflächensterilisation der Sporen

Für die Isolation von DNA aus einer großen Anzahl von Sporen von *Geosiphon pyriformis* wurde zunächst Erde von einigen Kulturen in Wasser aufgeschlämmt und durch nasses Sieben die Sporen in der Fraktion des 180  $\mu\text{m}$ -Siebs gesammelt. Der Inhalt des Siebs, der auch noch Sand- und Erdpartikel entsprechender Größe enthielt, wurde unter dem Binokular in einer Petrischale mit Wasser aufgeschlämmt und die Einzelsporen mit einer Eppendorfpipette mit abgeschnittener Spitze herausgezogen. Die Sporen wurden anschließend nochmals in frisches Wasser überführt und von anhängenden Hyphen bzw. mit aufgezogenen Erdpartikeln befreit. Zur weiteren Oberflächenreinigung wurden die Sporen in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß ultraschallgereinigt. Dazu wurde das Reaktionsgefäß mit einem Schwimmer in ein Ultraschallbad gegeben (Sonorex Super 10P, Bandelin Electronic, Berlin) und 30 sec bei 100 % Leistung ultraschallbehandelt. Das Wasser wurde abgezogen, noch 2x mit frischem Wasser nachgewaschen und die Ultraschallbehandlung noch weitere 2x wiederholt. Die Oberfläche der Sporen wurde danach noch nach GIANNINAZZI-PEARSON ET AL. (1989) durch 15 minütige Inkubation in einer frisch angesetzten Sterilisationslösung aus 5 % Chloramin T, 0,04 % Streptomycin und einigen Tropfen TWEEN80 oberflächensterilisiert, die Sterilisationslösung durch 4 maliges Waschen mit sterilem H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> entfernt.

### 3.2.3.1.2 DNA-Isolierung

Für die Isolierung von DNA nach der oben beschriebenen Methode wurden 1.900 Sporen von *Geosiphon pyriformis* verwendet, aufgeteilt in 2 Isolationsansätze von jeweils 950 Sporen. Die Sporen wurden in je einem Eppendorf-Reaktionsgefäß in jeweils 500 µl Crush-Puffer mit Hilfe eines sterilen Teflon-beschichteten Metallpistills zerrieben und anschließend die entstandene Speicherlipid-Suspension von den Sporenwänden, an denen noch die Zellkerne anhafteten, durch eine 2 minütige Zentrifugation in einer Tischzentrifuge bei 4000 rpm getrennt. Die Speicherlipid-Suspension wurde abgezogen und verworfen, die Sporenwände und Zellkerne in 250 µl frisch angesetztem Lyse-Puffer resuspendiert und 30 min bei 65 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die verbliebenen Zellwände und Kerne wiederum durch eine Zentrifugation in einer Tischzentrifuge 2 min bei 4000 rpm sedimentiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Lyse der Zellkerne durch Resuspension in 250 µl Lyse-Puffer wurde wiederholt und die Überstände nach der Zentrifugation wurden vereinigt. Lösliche Proteine wurden durch Zugabe von 1/10 Volumeneinheit einer 5 M Kaliumacetat-Lösung und Inkubation 15 min auf Eis ausgefällt und durch eine Zentrifugation in der Tischzentrifuge 15 min bei 13.000 rpm abgetrennt. Ebenfalls mit isolierte RNA im Überstand wurde in einer RNase-Behandlung (Endkonzentration 3 mg/ml RNase A, Inkubation 10 min bei 37 °C) abgebaut. Die RNase, sowie evtl. nach dem Aussalzen noch in der Lösung verbliebene Proteine wurden durch 3 malige Behandlung mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCI, 25:24:1 (v/v/v)) denaturiert und in der Interphase bei der Phasentrennung gesammelt. Spuren von Phenol in der oberen, wässrigen Phase wurden durch 2 malige Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol (CI, 24:1 (v/v)) entfernt. Die DNA wurde zur Fällung mit 1/10 Volumeneinheit 3 M Natriumacetat-Lösung, pH 4,7 versetzt und mit 2,5 Volumeneinheiten auf -20 °C vorgekühltem Ethanol gefällt. Die DNA wurde durch 30 minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge sedimentiert, das Pellet mit weiteren 300 µl 70 %igem Ethanol gewaschen, nochmals 5 min bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, überstehendes Ethanol abgezogen und getrocknet. Die DNA wurde in einer möglichst geringen Menge sterilem H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> bei 4 °C (Kühlschrank) und unter Vermeidung von Scherkräften, wie z. B. durch Aufziehen mit der Pipette, wieder gelöst. Qualität und Ausbeute der DNA-Isolation wurden durch eine Agarosegelelektrophorese überprüft.

### 3.2.3.2 **Isolation von Sporen-DNA aus Einzelsporen von *Geosiphon pyriformis* für PCR**

Für die Isolation von DNA aus einzelnen Sporen von arbuskulären Mykorrhizapilzen (vgl. Abbildung 4 in der Einleitung) mittels positiv oberflächengeladener magnetischer Partikel (Dynal, Hamburg) wurde das Protokoll des Herstellers folgendermaßen modifiziert (SCHWARZOTT ET AL. 2001):

Eine wie oben angeführt vereinzelte und ultraschallgereinigte, zum Teil auch oberflächensterilisierte Einzelspore wurde in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit einer sterilen Pipettenspitze in 10 µl sterilem H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> zerquetscht und mit 200 µl einer zuvor auf Raumtemperatur erwärmten und durch Schütteln homogenisierten Dynabeads®-Suspension (Deutsche Dynal, Hamburg) versetzt. Um ein Scheren der zu isolierenden DNA zu vermeiden, wurde auf eine zusätzliche Durchmischung durch Pipettieren oder Rühren verzichtet. Der Ansatz wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, wobei die Sporen-DNA gelöst und an die geladene Oberfläche der Beads gebunden wurde. Das Reaktionsgefäß wurde für 90 sec in einen vom Hersteller mitgelieferten Magnetständer gestellt, der

Überstand abgezogen und verworfen. Der DNA/Dynabeads®-Komplex wurde anschließend außerhalb des Magnetständers mit 200 µl Waschpuffer von der Wandung gespült. Auch bei diesem Schritt wurde auf ein weiteres Mischen verzichtet. Der Waschpuffer wurde durch Einstellen des Reaktionsgefäßes in den Magnetständer vom DNA/Dynabeads®-Komplex getrennt, abgezogen und verworfen. Dieser Waschschrift wurde ein weiteres Mal wiederholt. Zum Schluß wurde das Reaktionsgefäß aus dem Magnetständer genommen, der DNA/Dynabeads®-Komplex in 30 µl TE-Puffer durch mehrmaliges Pipettieren resuspendiert und homogenisiert und 10 µl der DNA/Dynabeads®-Suspension in TE-Puffer direkt in einem 50 µl PCR-Ansatz verwendet.

### 3.2.4 RNA-Isolationsmethoden

Blasen von *Geosiphon pyriformis*, die zur Isolation von RNA bestimmt waren, wurden zum Teil über längere Zeiträume gesammelt, bis die entsprechende, für einen Isolationsansatz ausreichende Menge an Material vorhanden war. Blasen wurden zu diesem Zweck mit anhängender Erde von den Kulturen steril entnommen, in einer Petrischale mit sterilem H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> aufgeschlämmt und unter dem Binokular von anhängender Erde, Sand und Nostoc-Zellagern befreit. Das sterile H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> wurde dabei u. U. mehrfach gewechselt. Auf diese Weise gereinigte Blasen von *Geosiphon pyriformis* wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit überführtes anhängendes Wasser mit einer Eppendorfpipette mit steriler Spitze abgezogen und das gesamte Reaktionsgefäß durch Eintauchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die so tiefgefrorenen Blasen wurden bei -80 °C gelagert.

#### 3.2.4.1 Gesamt-RNA mit RNeasy Plant Mini-Kit

Zur Isolation von Gesamt-RNA aus *Geosiphon*-Blasen wurden die Blasen aus drei gut gewachsenen Kulturen wie oben beschrieben gesammelt und gereinigt. Das gesammelte Blasenmaterial (nach Abziehen des sterilen H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> ca. 1 g FG) wurde unter flüssigem Stickstoff fein zermörsert und das Gewebepulver im gefrorenen Zustand gleichmäßig auf zwei Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt. Das Blasenmaterial wurde durch Zugabe der vom Hersteller empfohlenen Menge Puffer „RLT“ aufgetaut und aufsuspendiert. Die Suspension wurde zum weiteren Aufschluß auf je eine QIAshredder-Säule gegeben und in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Die anschließende Lyse und Reinigung der RNA erfolgte ebenfalls nach Herstellerangaben parallel in zwei Ansätzen. Zur Vermeidung von RNase-Kontaminationen und damit einhergehendem Abbau der RNA wurde für alle Schritte, sowie alle selbst angesetzten Puffer und Lösungen ggf. steriles, mit DEPC behandeltes H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> verwendet, ebenso wurden alle Reaktionsgefäße und Hilfsmittel (z. B. Pistille) vorher mit DEPC behandelt.

#### 3.2.4.2 Isolation von mRNA aus Gesamt-RNA

Die Isolation von mRNA aus Gesamt-RNA von Blasen von *Geosiphon pyriformis* zum Aufbau einer cDNA-Genbank erfolgte mittels des Poly (A) Quik mRNA-Isolationskits der Firma Stratagene (Heidelberg) nach Angaben des Herstellers aus 50 µl RNA-Lösung, isoliert mit RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden). Der Poly (A) Quik mRNA-Isolationskit besteht aus Luer-Lock-kompatiblen, mit Oligo(dT)-Cellulose gefüllten Säulchen, durch die mit Hilfe des

Luftpolsters in einer Luer-Lock-Spritze die RNA-Lösung bzw. verschiedene Waschlösungen gepresst werden. Die gereinigte mRNA wurde mit 500 µl TE-Puffer in fünf gleichen Teilen von 100 µl eluiert, die Eluate wurden vereinigt und die mRNA-Lösung im Anschluß durch eine Ethanol-fällung (Zugabe von 55,5 µl 10x „Sample Buffer“ und 1380 µl 100 % Ethanol [-20 °C], Fällung über Nacht bei -20 °C) aufkonzentriert. Die gefällte mRNA wurde in 37,5 µl DEPC-Wasser resuspendiert, was genau der für den Aufbau einer cDNA-Bank benötigten Menge entsprach. Die mRNA-Lösung wurde dementsprechend vollständig für eine aufzubauende cDNA-Genbank verwendet.

### 3.2.4.3 Direkte Isolation von mRNA mit Dynabeads® mRNA-Direct-Kit

Für die direkte Isolation von mRNA aus Blasen von *Geosiphon pyriformis* wurde in der Regel ca. 100-150 mg tiefgefrorenes Blasenmaterial verwendet. Dieses wurde in flüssigem Stickstoff vollständig zermörsert, noch gefroren in ein DEPC-behandeltes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 1 ml Lysis/Binding-Puffer aus dem Dynabeads® mRNA-Direct-Kit (Deutsche Dynal, Hamburg) mit einem DEPC-behandelten Teflonpistill 3 min bei Raumtemperatur homogenisiert. Anschließend wurden die Zellbruchstücke in einer Tischzentrifuge bei 13.000 rpm eine Minute sedimentiert, das überstehende Lysat in ein neues, DEPC-behandeltes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die dem Protokoll entsprechende Menge an in Lysis/Binding-Puffer vorgewaschenen mRNA-Dynabeads®, paramagnetische Partikel mit kovalent an die Oberfläche gekoppelten Oligo-dT-Fragmenten, zugegeben. Anschließend wurde 8 - 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, zwischenzeitlich jede Minute mit dem Vortex-Schüttler auf schwacher Einstellung gemischt und die Dynabeads® anschließend nach Herstellervorgabe 2x mit Lithium-haltigem Puffer „2“ und 3x mit Waschpuffer „3“ gewaschen. Die Dynabeads® mit der gebundenen mRNA wurden bis zur Benutzung bei -20 °C eingefroren. Die mRNA wurde vor Gebrauch nach Herstellerprotokoll von den Dynabeads® in einem Volumen von 10 µl Elutionspuffer eluiert.

Die auf diese Weise isolierte mRNA wurde für PCR-Anwendungen, z. B. RT-PCR, RACE-PCR und SMART-RACE-PCR verwendet.

## 3.2.5 Enzymatische Reaktionen

### 3.2.5.1 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription von mRNA in cDNA wurde einerseits verwendet, um mittels PCR-Amplifikation Genstücke direkt zu vervielfältigen und andererseits, um durch RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends) zu versuchen, das 5'- bzw. 3'-Ende der dem Gen entsprechenden mRNA zu amplifizieren. Für die Standard Reverse Transkription wurde ein Oligo-dT<sub>18</sub>-Primer, für die cDNA-Erststrangsynthese zur 3'-RACE-PCR ein Oligo-dT<sub>19</sub>-Primer mit Ankersequenz, für die cDNA-Erststrangsynthese zur 5'-RACE-PCR ein genspezifischer Primer verwendet. Es wurden mRNA-Lösung, Primer und DEPC-Wasser in einem mit DEPC behandelten Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt, 5 min bei 65 °C inkubiert und anschließend 5 min auf Eis gestellt. Dazu wurden RT-Puffer, dNTPs, DTT und M-MLV-Reverse Transkriptase pipettiert, für eine Stunde bei 42 °C inkubiert, die Reverse Transkriptase zuletzt durch Inkubation bei 72 °C für 15 min hitzeinaktiviert.

Standard RT-Ansatz:

X  $\mu$ l mRNA-Lösung  
 2,5  $\mu$ l Oligo-dT<sub>18</sub> (1  $\mu$ g/ $\mu$ l)  
 Y  $\mu$ l DEPC-Wasser

Inkubation bei 65 °C und auf Eis

6  $\mu$ l RTase-Puffer  
 2  $\mu$ l 10 mM dNTPs  
 0,5  $\mu$ l M-MLV Reverse Transcriptase (200 U/ $\mu$ l)

---

30  $\mu$ l Gesamtansatz

In der Regel wurde nach Abschluß der reversen Transkription ca. 5 - 10  $\mu$ l der synthetisierten cDNA in einem PCR-Ansatz eingesetzt.

### 3.2.5.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion nach SAIKI ET AL. (1985) wird zur exponentiellen Amplifikation von DNA-Fragmenten genutzt. Die selektive Spezifität dieser Reaktion wird dabei durch die Verwendung kurzer, synthetisch hergestellter DNA-Oligonucleotide (Primer) erreicht, die im Anlagerungsschritt spezifisch an komplementäre Sequenzen der Matrizen-DNA binden. Prinzipiell besteht die PCR aus sechs Schritten, bei denen eine Reaktionssteuerung über das Abfahren eines Temperaturprofils erreicht wird:

1. Initiales Aufschmelzen der als Matrix eingesetzten DNA-Doppelstränge bzw. RNA-/DNA-Hybrid-Doppelstränge durch längere Hitze-denaturierung bei 95 °C.

Die folgenden drei Schritte werden 30 - 35 mal wiederholt:

2. Weitere Aufschmelz-Reaktion bei 95 °C von kurzer Dauer.
3. Anlagerung der Primer bei Temperaturen von ca. 60 °C (abhängig von Länge und Sequenz der verwendeten Primer).
4. Verlängerung der Primer unter Katalyse durch die *Taq*-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*) bei 72 °C.

Nach Abschluß der Reaktionsfolge:

5. Vervollständigung der Synthese von Amplifikaten durch Inkubation bei 72 °C über einen längeren Zeitraum.
6. Kühlung und Lagerung der Reaktionsansätze bei 4 °C.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die PCR i. d. R. folgender Reaktionsansatz benutzt:

x	µl steriles H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub>
1	µl dNTPs (10 mM)
5	µl 10x PCR-Puffer mit MgCl <sub>2</sub>
1	µl Primer 1 (10 µM)
1	µl Primer 2 (10 µM)
0,5 - 10	µl DNA-Template
0,2	µl <i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µl)
<hr/>	
50	µl Gesamtansatz

Der Reaktionsansatz wurde auf Eis zusammenpipettiert und ggf. im halben Volumen durchgeführt. Dieses war insbesondere vom verwendeten Thermocycler abhängig. Bei Verwendung des Biometra-Cyclers konnten nur 500 µl-Reaktionsgefäße verwendet werden. In diesen wurde der volle Reaktionsansatz angesetzt, der außerdem noch mit einem Tropfen Paraffinöl als Verdunstungsschutz überschichtet werden musste. Konnte der Eppendorf-Thermocycler verwendet werden, war der Einsatz von 200 µl-Reaktionsgefäßen und halbe Reaktionsansätze möglich. Da hier ein beheizter Deckel vorhanden war, konnte auf die Überschichtung mit Paraffinöl verzichtet werden.

Für direkte PCR aus der chromosomalen Genbank wurden in einem 50 µl-Ansatz die Phagen (1:10.000-Verdünnung der Originalkonzentration), steriles H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> und der 10x-Puffer vorgelegt und zunächst bei 100 °C für 10 min vorinkubiert. Danach wurden auf Eis die übrigen PCR-Komponenten unter Durchstechen der Paraffinölschicht zupipettiert.

Soweit nicht anders angegeben, wurde standardmäßig folgendes Cyclerprogramm verwendet:

Schritt 1:	3 min	95 °C	
Schritt 2:	30 sec	95 °C	} 35x
Schritt 3:	45 sec	60 °C	
Schritt 4:	3 min	72 °C	
Schritt 5:	10 min	72 °C	
Schritt 6:	unbeschränkt	4 °C	

Nach dem Ende des Cyclerprogrammes wurden die auf 4 °C gekühlten Reaktionsansätze mit ca. 100 µl Chloroform versetzt und durch Schütteln kurz gemischt. Anschließend wurde in einer Heraeus-Tischzentrifuge bei 13.000 rpm ca. 3 min zentrifugiert. Das Paraffinöl löst sich in Chloroform und es findet auf diese Weise eine Phasenumkehr statt: Die wässrige Phase mit dem PCR-Ansatz konnte so von oben abpipettiert werden. Auf diesen Schritt kann bei Verwendung eines Cyclers mit Heizdeckel verzichtet werden. Mit 5 µl der Probe wurde zunächst eine Agarosegelelektrophorese (meistens ein 0,8 %iges Agarosegel) mit SPP1/EcoR I-Längenstandard durchgeführt, anschließend wurde das PCR-Amplifikat ggf. in einen Vektor ligiert und eine *E. coli*-Transformante hergestellt.

### 3.2.5.3 Sonderformen der PCR

#### 3.2.5.3.1 RACE-PCR

Die RACE-PCR (rapid amplification of cDNA ends) stellt eine Möglichkeit der Vervollständigung von Sequenzen dar und ist eine Sonderform der Reversen Transkription. Zur Charakterisierung des 3'-Endes einer mRNA wird eine Reverse Transkription mit einem Oligo-dT<sub>20</sub>-Primer, der am 5'-Ende noch eine Ankersequenz trägt, durchgeführt. Auf diese Weise kann in einer anschließenden PCR ein genspezifischer Primer und ein zweiter Primer, der gegen die Ankersequenz des Oligo-dT<sub>20</sub>-Primers gerichtet ist, verwendet werden. Zur Charakterisierung des 5'-Endes ist es nötig, die Reverse Transkription mit einem genspezifischen (statt einem Oligo-dT-Primer) durchzuführen. Der cDNA-Strang wird anschließend am 3'-Ende polyadenyliert und in einem zusätzlichen Amplifikationsschritt unter Verwendung eines Oligo-dT<sub>20</sub>-Ankerprimers ein cDNA-Zweitstrang synthetisiert, der dann wie bei der 3'-RACE in eine PCR mit je einem genspezifischen und einem ankerspezifischen Primer eingesetzt werden kann.

Für diese „Tailing“-Reaktion wurde standardmäßig folgender Reaktionsansatz verwendet:

3 µl	Erststrang 5'-RACE (gereinigt über Microcon-Filter)
4 µl	5x Puffer
2 µl	dATP (10 mM)
6 µl	CoCl <sub>2</sub> -Lösung (5 mM)
3 µl	steriles H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub>
2 µl	Terminale Transferase
<hr/>	
20 µl	Gesamtansatz

Der gesamte Reaktionsansatz wurde für 10 min bei 37 °C inkubiert, anschließend die terminale Transferase durch Inkubation bei 65 °C für 10 min hitzeinaktiviert.

Eine Alternative unter Einsparung eines Arbeitsschrittes stellt das Clontech SMART-RACE-System dar. In diesem Fall wird auf die Polyadenylierung und anschließende zweite Reverse Transkription bei der 5'-RACE verzichtet und stattdessen unter Katalyse durch das Enzym Ligase ein synthetisches Oligonukleotid an das 5'-Ende des Erststranges angefügt. Dieses dient dann als Template für die darauffolgende PCR. Die Verwendung des SMART-RACE-Kitsystems erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Clontech, Heidelberg).

#### 3.2.5.3.2 „chromosome-walking“-Techniken

Zur Vervollständigung von Gensequenzen auf chromosomaler Ebene wurden *chromosome-walking*-Techniken eingesetzt, im Speziellen die inverse PCR nach OCHMAN ET AL. (1988) und die „supported PCR“ nach RUDENKO ET AL. (1993).

Die inverse PCR beruht auf einer Restriktion und anschließender Religation genomischer DNA unter bestimmten Verdünnungsbedingungen. Dabei steigt die Wahrscheinlichkeit, dass sich Fragmente zwischen ca. 2000 bp und 7000 bp überwiegend cirkularisieren, d. h. die beiden Enden eines Fragmentes werden ligiert und ein ringförmiger DNA-Doppelstrang

gebildet. Benutzt man für die anschließende PCR nun Primer im bekannten Genabschnitt, die allerdings gegenläufig nach außen gerichtet sind, so kann unter Verwendung entsprechender Elongationszeiten in der PCR damit gerechnet werden, dass diese ringförmigen DNA-Moleküle amplifiziert werden. Im Alignment-Programm muß die charakterisierte Sequenz dann nur noch entsprechend wieder zusammengesetzt werden.

Die „supported PCR“ besteht aus einem Anreicherungsschritt für das Template, der Ligation eines Linker-Primers und anschließender PCR mit einem genspezifischen und einem gegen die Sequenz des Linker-Primers spezifischen Primer. Zur Anreicherung wurde eine PCR mit nur einem Primer und unter Verwendung von Biotin-gekoppeltem dUTP durchgeführt und so Biotin-gekoppelte DNA-Doppelstränge hergestellt. Diese wurden mit der Biotin/Streptavidin-Reaktion unter Verwendung von Streptavidin-gekoppelten Dynabeads® (Dynal, Hamburg) hochspezifisch aus dem Pool der chromosomalen DNA angereichert. Mit dem so angereicherten Template wurde anschließend eine PCR durchgeführt.

#### 3.2.5.4 Ligation von DNA in einen Vektor

Bei der Ligation wurde ein in einer PCR amplifiziertes DNA-Fragment mit einem linearisierten Vektor verknüpft.

Standard-Vektoren (z. B. pCR 2.1 Original, Invitrogen):

Bei der enzymatischen Reaktion wird eine 3'-OH-Gruppe mit einer 5'-PO<sub>4</sub>-Gruppe verknüpft, indem das 3'-Ende des Vektors durch ATP endständig adenyliert wird und dann am 5'-Ende des PCR-Fragments angreift, dieses ebenfalls adenyliert und somit einen nucleophilen Angriff unter Ausbildung einer Phosphodiesterbrücke ermöglicht.

TOPO-Vektoren (z. B. pCR 4-TOPO, Invitrogen)

Bei Verwendung der TOPO-Vektoren der Fa. Invitrogen geschieht die Verknüpfung durch eine kovalent an die Vektorenden gebundene Topoisomerase I, die Bereitstellung der Energie erfolgt durch Lösen der kovalenten Bindung des Enzyms.

Die Ligation erfolgte nach Herstellerangaben mit 2 µl frischem PCR-Produkt, ligiert wurde bei den Standardvektoren über Nacht bei 14 °C bzw., bei Verwendung der TOPO-Vektoren, 5 min bei Raumtemperatur.

### 3.2.5.5 Restriktion von DNA

Die Restriktion von DNA wurde zu verschiedenen Zwecken mit Restriktionsendonucleasen des Typs II durchgeführt. Vor allem diente sie bei isolierten Plasmiden der Abschätzung der Größe des eingebauten Fragments nach Agarosegelelektrophorese gegen einen DNA-Längenstandard und der Analyse verschiedener eingebauter Fragmente. Für den letzteren Fall wurde dasselbe Plasmid mit mehreren Restriktionsendonucleasen hydrolytisch gespalten und eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Bei auftretenden verschiedenen Spaltungsmustern im Gel konnte von verschiedenen eingebauten Fragmenten ausgegangen werden. Die hydrolytische Spaltung mittels Restriktionsendonucleasen wurde auch benutzt, um genomische DNA von *Geosiphon pyriformis* zum Aufbau einer genomischen DNA-Bank in einen Phagen-Vektor einzuklonieren.

Standardmäßig wurde die Restriktion von DNA in einem Volumen von 15 µl durchgeführt:

10 µl	Plasmid-DNA
1,5 µl	10x-Puffer
1 µl	Restriktionsendonuclease
10 µl	steriles H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub>

### 3.2.6 Transformation von *E. coli*

Die Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach der Vorschrift des Herstellers (Invitrogen). Verwendet wurden chemisch kompetente *E. coli*-Zellen der Stämme TOP 10 und TOP 10F', deren Hauptunterschied darin besteht, dass der Stamm TOP 10 für den  $\alpha$ -Komplementationstest keinen Induktor (IPTG) zur Aktivierung der  $\beta$ -Galaktosidase-Expression benötigt, diese also konstitutiv exprimiert.

Die Transformation geschah nach den Angaben des Herstellung unter Verwendung von 2 µl Ligationsansatz.

### 3.2.7 $\alpha$ -Komplementationstest

Mit dieser Methode wurden Zellkolonien mit einem eingebauten PCR-Fragment im aufgenommenen Plasmid von solchen unterschieden, die nur einen zirkularisierten Vektor aufgenommen haben.

Die verwendeten Klonierungsvektoren enthalten alle die für das  $\alpha$ -Peptid der  $\beta$ -Galaktosidase codierende DNA-Sequenz ( $\text{lac } Z'$ ), während die Wirtsbakterien in eben diesem Gen eine Deletion enthalten. Aus diesem Grund besitzen nur solche Zellkolonien eine funktionsfähige  $\beta$ -Galaktosidase, die ihre Deletion durch eine vollständige Gensequenz auf dem aufgenommenen Plasmid komplementieren können. Dies ist nur der Fall, wenn kein PCR-Produkt in den Vektor eingebaut wurde, da die multiple Klonierungsstelle innerhalb des  $\text{lac } Z$ -Gens liegt und ein eingebautes DNA-Fragment zu einer Unterbrechung des Leserasters führt und somit kein funktionsfähiges  $\alpha$ -Peptid synthetisiert werden kann. Farblich wurde durch das chromogene Substrat-Analogen X-Gal unterschieden, das durch die  $\beta$ -Galaktosidase zu einem blauen Farbstoff umgesetzt wird.

Kolonien mit im Vektor eingebautem PCR-Produkt bleiben demzufolge also weiß, während solche mit „leerem“ Vektor blau gefärbt sind. Bei der Verwendung von kompetenten Zellen des Stammes TOP 10F' wurde zusätzlich die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase durch den Induktor IPTG aktiviert.

### 3.2.8 „Übernachtskulturen“

Von den Bakterienkolonien, die nach dem  $\alpha$ -Komplementationstest weiß geblieben waren, also eine Insertierung im aufgenommenen Plasmid besaßen, wurde mit einem sterilen Zahnstocher ein Abstrich in 10 ml LB-Medium (versetzt mit 15  $\mu$ l Ampicillin- bzw. Kanamycinlösung [50 mg/ml], je nach Resistenzgen auf dem Plasmid) überführt. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C unter Schütteln bei 180 - 225 rpm inkubiert.

### 3.2.9 Isolation von Plasmid-DNA

#### 3.2.9.1 Rohpräparation von Plasmid-DNA zur Insertkontrolle nach einer Transformation („Minipräp“) nach der „Boiling“-Methode (HOLMES & QUIGLEY, 1981)

Zur Vorbereitung der Plasmid-DNA-Minipräparation wurde die entsprechende Anzahl benötigter Eppendorf-Reaktionsgefäße beschriftet und mit einem Loch im Deckel versehen, sowie STETL-Puffer durch Zugabe von 10  $\mu$ l/ml einer Lysozymstammlösung (10 mg/ml) zur benötigten Menge STET-Puffer frisch angesetzt.

Die zu präparierenden Übernachtskulturen wurden kurz homogenisiert (Vortex) und jeweils 1,5 ml der Bakteriensuspension in vorbereitete Eppendorf-Gefäße (2 ml) gefüllt. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation in einer Tischzentrifuge (Biofuge pico, Heraeus) bei 8000 rpm 10 min sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 200  $\mu$ l STETL-Puffer sehr schnell mit einer Eppendorfpipette resuspendiert und sofort auf Eis gestellt. Danach wurden alle Reaktionsansätze 35 sec bei 100 °C im Wasserbad inkubiert, wobei die Bakterien, deren Zellwandquervernetzung durch das Lysozym bereits verdaut war, platzten und das Lysozym denaturiert wurde. Die Zellbruchstücke mit der in der Zellmembran verankerten chromosomalen DNA wurden in einer Tischzentrifuge (Biofuge pico, Heraeus) bei 13000 rpm 15 min sedimentiert, das Pellet mit einem unsterilen Zahnstocher herausgezogen und verworfen. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 200  $\mu$ l Isopropanol und Inkubation 15 min auf Eis gefällt und in einer Tischzentrifuge (Biofuge pico, Heraeus) bei 13000 rpm 30 min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die gefällte Plasmid-DNA in den Reaktionsgefäßen durch stehenlassen mit geöffnetem Deckel ca. 15 min luftgetrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in 50  $\mu$ l RNase-Wasser (100  $\mu$ g RNaseA/ml) durch mehrmaliges Pipettieren und Inkubation 15 min bei Raumtemperatur wieder gelöst. Zur Insertkontrolle wurde die Plasmid-DNA in der Regel sofort mit entsprechenden Restriktionsenzymen hydrolytisch gespalten und einer Agarosegelelektrophorese zugeführt.

### 3.2.9.2 Präparation von Plasmid-DNA zur Sequenzierung („Midiprep“)

Die Präparation von Plasmid-DNA zur Sequenzierung wurde mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen, Hilden), gemäß der Anleitung zur Benutzung in einer Tischzentrifuge durchgeführt. Präpariert wurde standardmäßig aus 2 ml gut gewachsener Übernachtskultur, die bei 8.000 rpm in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß zur Sedimentierung der Bakterien zentrifugiert wurde. Die Bakterien wurden nach vollständiger Entfernung des verbliebenen Mediums mit einer Eppendorfpipette mit steriler Spitze in 250 µl Resuspensionspuffer P1 resuspendiert, mit 250 µl Lysepuffer P2 versetzt und der Ansatz durch sechsmaliges Invertieren gemischt. Anschließend wurde – abweichend vom Herstellerprotokoll – 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dem Ansatz wurden 350 µl Neutralisationspuffer N3 zupipettiert, durch 6-maliges Invertieren gemischt und – ebenfalls abweichend vom Herstellerprotokoll – 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die gefällten Zellbestandteile in einer Tischzentrifuge bei 13.000 rpm 10 min sedimentiert und der Überstand in eine QIAprep-Säule mit 2 ml-Sammelröhrchen überführt. Die Säulchen wurden in einer Tischzentrifuge bei 13.000 rpm 1 min zentrifugiert, wobei eine Bindung der Plasmid-DNA an die Silicamatrix der Säulchen stattfand. Das Säuleneluat wurde verworfen und nacheinander mit 500 µl Puffer PB, sowie 750 µl Puffer PE gewaschen. Das Eluat dieser Zentrifugationsschritte wurde ebenfalls verworfen. Zuletzt wurden die Säulchen in einer Tischzentrifuge bei 13.000 rpm eine weitere Minute trockenzentrifugiert, um eine Kontamination der Plasmid-DNA-Lösung mit Ethanol aus dem Puffer PE zu vermeiden. Die Säulchen wurden in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, 50 µl steriles H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> zupipettiert, eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert, wobei eine Remobilisierung der Plasmid-DNA erfolgte und die DNA-Lösung anschließend durch Zentrifugation in einer Tischzentrifuge 1 min bei 13.000 rpm in das Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Plasmid-DNA wurde auch hier zur Insertkontrolle mit entsprechenden Restriktionsenzymen hydrolytisch gespalten und einer Agarosegelelektrophorese zugeführt.

### 3.2.10 Sequenzierung mit PE Applied Biosystems ABI-Sequencer

Für die nichtradioaktive Cycle-Sequenzierung nach SANGER (1977) mit Didesoxy-Nucleotiden wurden ein PE Applied Biosystems ABI-Sequencer, sowie Fluoreszenzfarbstoffgekoppelte Didesoxy-Nucleotide verwendet. Die Sequenzierung erfolgte in einem Ansatz. Dazu wurden vier bei verschiedenen Wellenlängen emittierende Farbstoffe verwendet, die jeweils an einen Typ Didesoxy-Nucleotid gebunden waren. In einem PCR-Reaktionsgefäß wurden 250 ng Plasmid-DNA vorgelegt, mit 2 µl Reaktions-Premix des Herstellers und 5 pmol Sequenzierprimer, i. d. R: M13fwd-20 bzw. M13rev. versetzt und mit sterilem H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> auf 10 µl aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet und im Biometra Personal Cycler eine Polymerase-Kettenreaktion unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

96 °C	10 s	} 25x
50 °C	5 s	
60 °C	4 min	

Das Mineralöl im Reaktionsansatz wurde im Anschluß mit einigen Tropfen Chloroform gemischt und durch eine kurze Zentrifugation in einer Tischzentrifuge nach unten gezogen. Die obere Phase mit den PCR-Produkten wurde mit einer Eppendorfpipette mit steriler

Spitze abgezogen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die PCR-Produkte wurden anschließend durch Zugabe von 80 µl sterilem H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub>, 10 µl 3 M Natriumacetatlösung pH 4,7 und 250 µl auf -20 °C vorgekühltem Ethanol gefällt und durch 15 minütige Zentrifugation in einer Tischzentrifuge bei 13.000 rpm sedimentiert. Das Ethanol wurde entfernt, mit 250 µl 70 %igem Ethanol gewaschen, nochmals 5 min bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Auch das 70 %ige Ethanol wurde verworfen und das Pellet für 5 min in einer Speed-Vac (Stratagene, Heidelberg) getrocknet. Die Fluoreszenz-markierten Produkte der Sequenzreaktion wurden anschließend in 25 µl TSR-Puffer des Herstellers aufgenommen, für 2 min bei 90 °C denaturiert, für weitere 2 min auf Eis gestellt und in den Probeneinzug des ABI-Sequencers gestellt. Im Sequencer wurden die Fluoreszenz-markierten Produkte der Sequenzreaktion durch eine Kapillar-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die anschließende Analyse des endständigen Dideoxy-Nucleotids wurde durch Anregung mit einem Laserstrahl und Detektion der Intensität und Wellenlänge des vom Fluoreszenzfarbstoff emittierten Lichts durchgeführt. Die ausgegebenen Daten konnten sowohl direkt in der Fluoreszenzkurve als auch als Sequenz im Textformat angezeigt werden.

Nach dem gleichen Sequenzierungsprinzip erfolgte die Sequenzierung bei den Firmen SeqLab, Göttingen und AGOWA, Berlin, zu denen in den meisten Fällen die Sequenzierungsarbeiten abgegeben wurden.

### 3.2.11 Sequenzanalyse

Die Auswertung der Sequenzinformationen wurde mit Hilfe von fünf Computerprogrammen vorgenommen:

DNAsis (Hitachi Software) diente dazu, Sequenzen einzulesen und in die Aminosäuresequenzen zu übersetzen. Daneben bietet dieses Programm die Möglichkeit, Hydrophathie-Plots nach Hopp & Woods zu erstellen und Restriktionsanalysen am Rechner vorzubereiten.

ClustalW (THOMPSON ET AL., 1994) ist ein kleines, frei verfügbares Programm, das automatisch Sequenzalignments anhand von Ähnlichkeitsrechnungen durchführt. Neben der *stand-alone*-Version 1.7 wurde ClustalW inzwischen in die Homepage des European Bioinformatics Institute (Hinxton, UK, [HTTP://WWW.EBI.AC.UK](http://www.ebi.ac.uk)) implementiert, so dass man sofort zu einer mit der Datenbank verglichenen Sequenz ein fertiges Alignment herunterladen kann.

Align (HEPPERLE, 2001) ist ein „Multicolor Sequence Alignment Editor“, mit dem Aminosäure- und Nukleinsäuresequenzdaten eingelesen und manuell auf gleiche Positionen gebracht werden können. Dadurch wird ein Vergleich ähnlicher Sequenzen sehr einfach. Align wurde vor allem im Hinblick auf geringe Abweichungen innerhalb der Sequenzen verwendet, um Primersequenzen zu abzuleiten und um die Sequenzdaten für die Verwendung in PHYLIP vorzubereiten.

PHYLIP (FELSENSTEIN, 1989) ist ein frei verfügbares „Phylogeny Inference Package“, das auf der Homepage der University of Washington ([HTTP://EVOLUTION.GENETICS.WASHINGTON.EDU/PHYLIP.HTML](http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html)) heruntergeladen werden

kann. Es wurde in der Version 3.6a verwendet, um über statistische Methoden Stammbäume von Gensequenzen zu berechnen. Mit dieser Methode können Aussagen über die verwandtschaftliche Beziehung von Genen und – bei Verwendung entsprechend geeigneter und anerkannter phylogenetischer Marker – über die Verwandtschaft von Organismen getroffen werden. Insbesondere wird diese Methode zum Vergleich von SSU-rRNA-Gensequenzen verwendet (charakteristisches Merkmal z. B. zur Beschreibung von Bakterienstämmen oder Pilzen) und dient so einer zusätzlichen Charakterisierung ansonsten schwer zugänglicher Arteigenschaften. Aber auch funktionelle Gene bzw. Aminosäuresequenzen können über den Vergleich ihrer Sequenzen charakterisiert werden, da sie, vor allem in strukturell bzw. funktionell unwichtigen Bereichen ohne Folge für den Organismus mutieren können. Auf diese Weise lassen sich die aus der Charakterisierung von SSU rRNA-Genen abgeleiteten Informationen ggf. verifizieren. Dem Programmpaket sind ausführliche Dokumentationen der verwendbaren statistischen Methoden beigelegt.

Treeview (PAGE, 1996) ist ebenfalls frei im Internet verfügbar, z. Zt. in der Version 1.6.6 ([HTTP://TAXONOMY.ZOOLOGY.GLA.AC.UK/ROD/TREEVIEW.HTML](http://TAXONOMY.ZOOLOGY.GLA.AC.UK/ROD/TREEVIEW.HTML)). Es dient dazu, die ausgegebenen „Tree-Files“ aus PHYLIP in ein für Grafikprogramme lesbares Format umzuwandeln. Dabei können noch verschiedene Parameter, wie z. B. die Außengruppe in der entsprechenden Stammbaumdatei festgelegt und der Stammbaum entsprechend umgewandelt werden.

### **3.2.12 Reinigung von DNA**

#### **3.2.12.1 Entsalzen und Konzentrieren von PCR-Fragmenten über Microcon100-Filter**

Bei schwachen PCR-Amplifikaten, die trotzdem zur Sequenzierung kloniert werden sollten, wurden mehrere, ggf. aus einer Gradienten-PCR vorhandene PCR-Reaktionsansätze vereinigt und auf Microcon100-Filter gegeben. Diese wurden auf ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gesteckt und in einer Tischzentrifuge 5 - 7 min bei 2.500 rpm zentrifugiert, wobei die Proben eingengt wurden. Zum Entsalzen wurde 2-3x je 250 µl Wasser nachgegeben und ebenfalls durch das Filter zentrifugiert. Nach Erreichen des gewünschten Endvolumens, minimal 10 µl, wurden die Microcon100-Filter umgedreht auf ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß gesteckt und der eingengte Ansatz durch Zentrifugation in einer Tischzentrifuge 3 min bei 3.500 rpm vom Filter in das Reaktionsgefäß überführt.

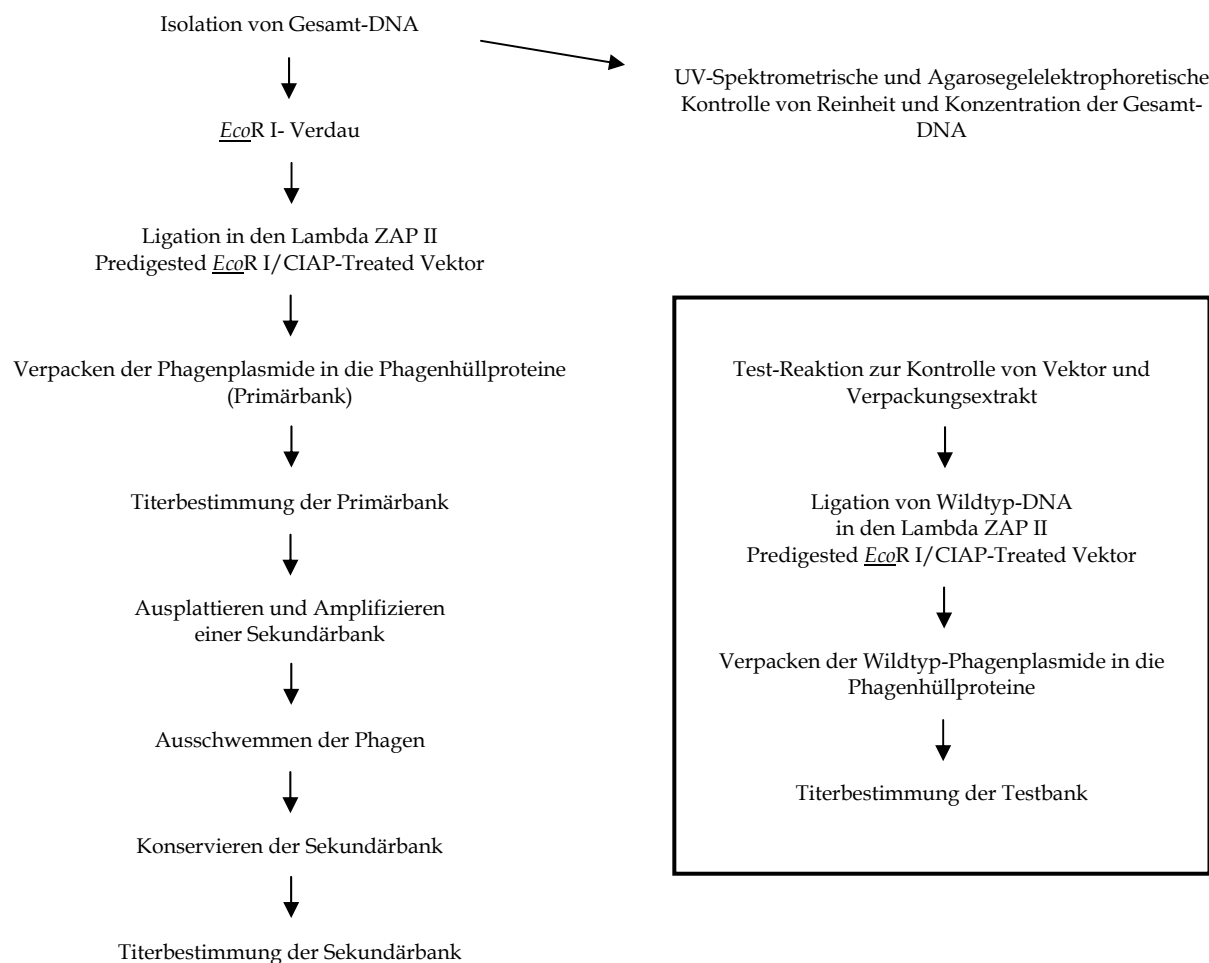
#### **3.2.12.2 Gelelution zur Reinigung von DNA-Fragmenten**

Um bestimmte DNA-Fragmente aus einem Gemisch zu isolieren, wurde dieses in einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und Gelstücke mit den entsprechenden Fragmenten ausgeschnitten. Die DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des JetSORB Gel Extraktionskits (Genomed, Bad Oeynhausen) nach dem Herstellerprotokoll aus den Gelstückchen eluiert. Dies war die Standardmethode zur Gewinnung von DNA-Fragmenten, die als Sonde für ein Genbankscreening verwendet werden sollten.

### 3.2.13 Aufbau und Screening von Genbanken

#### 3.2.13.1 Aufbau einer chromosomalen DNA-Genbank aus Sporen-DNA von *Geosiphon pyriformis*

Der Aufbau einer chromosomalen DNA-Genbank erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Stratagene, Heidelberg). Die dafür benötigte DNA wurde nach der Methode von ZÉZÉ ET AL. (1994, s. o.) aus Sporen von *Geosiphon pyriformis* isoliert. Für den Aufbau der genomischen Genbank wurde das Kitsystem Lambda ZAP II Predigested *Eco*R I/CIAP-Treated Vector Kit mit dem Gigapack III Gold Packaging Extract (Stratagene, Heidelberg) verwendet. Der hier verwendete Vektor kann Inserts bis zu 10.000bp Länge aufnehmen. Diese wurden durch vollständige hydrolytische Spaltung der isolierten DNA mit der Restriktionsendonuclease *Eco*R I hergestellt. Die einzelnen Schritte des Genbankaufbaus sind in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt.



**Abb. 10: Schematische Darstellung des Aufbaus einer genomischen DNA-Bank**

mit dem Lambda ZAP II Predigested *Eco*R I/CIAP-Treated Vektor Kit

Die genauen Reaktionsansätze entsprachen den Angaben des Herstellers, Testreaktion im Kasten rechts

### 3.2.13.2 Aufbau einer cDNA-Genbank

Es sollte versucht werden, eine cDNA-Genbank aus isolierter RNA aus Blasenmaterial von *Geosiphon pyriformis* aufzubauen. Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgte mit dem RNeasy Plant Mini Kit (Quiagen, Hilden), für die Isolation der mRNA aus der Gesamt-RNA wurde der Poly(A) Quik mRNA Isolation Kit verwendet, für die Synthese des Erststranges, die Klonierung sowie die Verpackungsreaktion der ZAP-cDNA Synthesis Kit mit ZAP-cDNA Gigapack III Gold Cloning Kid (alle Kitsysteme Stratagene, Heidelberg). Da auch hier alle Angaben des Herstellers strikt eingehalten wurden, ist der Ablauf in Abbildung 11 ebenfalls nur schematisch wiedergegeben.



**Abb. 11:** Schematische Darstellung des Aufbaus einer cDNA-Bank  
mit dem Lambda UniZAP XR Vektor Kit  
Die genauen Reaktionsansätze entsprachen den Angaben des Herstellers

### 3.2.13.3 Folgereaktionen:

#### 3.2.13.3.1 Herstellung von DNA-Sonden

Als molekulare Sonden wurden folgende DNA-Fragmente benutzt:

- a) pKEpho  
ca. 600 bp großes Teilfragment der cDNA des high-affinity Phosphattransportergens von *Glomus versiforme*. Diese Sonde wurde freundlicherweise von M. Harrison, Sam Roberts Noble Foundation, Ardmore, Oklahoma, USA zur Verfügung gestellt.
- b) pTR 17-2, pTR 17-6  
18 S-Fragmente aus *Geosiphon pyriformis*, isoliert und charakterisiert im Rahmen der Staatsexamensarbeit von T. RIES (1997).
- c) P2-P12-Fragment  
Ca. 348 bp großes Teilfragment des vermutlichen high-affinity Phosphattransportergens von *Geosiphon pyriformis*, mit PCR aus Einzelsporen-DNA amplifiziert.
- d) P18-P19-Fragment  
kürzeres Teilfragment von c), mit spezifischen Primern direkt mit PCR aus der chromosomalen Genbank amplifiziert.

Die Sonden wurden aus den entsprechenden Dauerkulturen isoliert. Dazu wurden diese ausgestrichen, eine Einzelkolonie in einer Übernachtskultur angezogen und daraus eine Plasmid-DNA-Midipräparation durchgeführt. Die isolierten Plasmide wurden mit EcoR I hydrolytisch gespalten und die Sondenfragmente vom Vektor durch Agarosegelelektrophorese mit anschließender Gelelution abgetrennt. Die Konzentration der Sonde wurde auf dem Agarosegel abgeschätzt.

#### 3.2.13.3.2 Radioaktive Markierung einer DNA-Sonde

Die isolierten Sondenfragmente wurden vor der Hybridisierungsreaktion radioaktiv markiert. Dabei wurde der DNA-Doppelstrang aufgeschmolzen und unter Einsatz hexamerer bzw. nonamerer Oligonucleotidprimer,  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP, sowie dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I (große Untereinheit) eine Polymerisationsreaktion durchgeführt. Zur Synthese der auf diese Weise markierten DNA-Einzelstränge wurden die Kitsysteme „rediprime DNA labelling system“ (Amersham, Freiburg) bzw. „HexaLabel Plus™ DNA Labelling Kit“ (MBI Fermentas, St. Leon-Roth) verwendet. Diese enthielten alle für die Reaktion benötigten Komponenten mit Ausnahme des DNA-Templates und  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP, welches von der Firma Hartmann Analytics, Braunschweig bezogen wurde. Die Durchführung der Markierungsreaktion erfolgte nach den Angaben der Kithersteller, die Sonde wurde unmittelbar vor dem Einsatz in der Hybridisierungsreaktion durch 5 min Inkubation bei 100 °C denaturiert.

### 3.2.13.3.3 Screening von DNA-Banken

Um eine Hybridisierungsreaktion der radioaktiv markierten Sondenfragmente und darüber eine Isolation komplementärer Phagen-Klone zu ermöglichen, musste die chromosomale Genbank zunächst ausplattiert werden. Danach wurden durch die Lyse der Wirtsbakterien freigesetzte Phagenpartikel auf Nylonmembranen übertragen, die Phagenhüllproteine entfernt und die Phagen-DNA mit den enthaltenen Genom-Fragmenten von *Geosiphon pyriformis* auf den Membranen fixiert. Das Screening von DNA-Banken beinhaltete folgende Arbeitsschritte:

#### 3.2.13.3.3.1 *Plattieren und Plaque-Lift der Sekundärbank*

Die sekundäre Genbank wurde auf vier quadratischen NZY-Tetracyclin-Agarplatten angezogen. Dazu wurde eine Übernachtskultur des Wirtsbakterienstammes *E. coli* XL-1 Blue MRF' in LB-Flüssigmedium mit zusätzlich 0,2 % Maltose und 10 mM Magnesiumsulfat über Nacht bei 28 °C angezogen. Die Bakterien wurden in einer Tischzentrifuge vom Medium getrennt und anschließend in einer sterilen 10 mM Magnesiumsulfatlösung resuspendiert und auf eine optische Dichte  $OD_{600nm} = 0,5$  verdünnt. Von dieser Bakteriensuspension wurden 2160 µl in einem 50 ml-Falconröhrchen mit  $1,5 \times 10^5$  Phagen der Sekundärbank versetzt, mit 23,4 ml geschmolzenem, auf 50 °C vortemperiertem NZY-TOP-Agar versetzt, durch Invertieren kurz gemischt und der gesamte Ansatz blasenfrei auf die NZY-Tetracyclin-Agarplatten gegossen und verteilt. Der TOP-Agar mit den Bakterien und Phagen wurde ca. 10 min bei Raumtemperatur gehärtet und anschließend bei 37 °C ca. 6-8 Stunden inkubiert bis die Phagenplaques im Bakterienrasen eine Größe von ca. 1-2 mm aufwiesen und sich gerade nicht berührten. Die Platten wurden mit Parafilm umwickelt über Nacht bei 4 °C gelagert. Zur Übertragung der Phagenpartikel wurden nacheinander zwei entsprechend große Nylonmembranen (Duralon-UV<sup>TM</sup>, Stratagene, Heidelberg) aufgelegt, wobei die erste Membran 2 min, die zweite 4 min auf der Platte blieb. Die Hüllproteine der so auf die Membranen übertragenen Phagen wurden anschließend 2 min in Denaturierungslösung denaturiert und anschließend durch eine Inkubation in Neutralisierungslösung von 5 min und in Waschlösung von 30 sec abgewaschen. Die Membranen wurden anschließend kurz auf Whatman 3MM-Papier getrocknet und in Frischhaltefolie gepackt. Die so isolierte Phagen-DNA wurde anschließend durch Belichtung mit UV-Licht ( $\lambda = 254$  nm) in einem UV-Crosslinker (Stratagene, Heidelberg) mit einer Belichtungsenergie von mit 120.000 mJ/cm<sup>2</sup> kovalent an die Nylonmembran gebunden.

#### 3.2.13.3.3.2 *Hybridisierungsreaktion*

Zur Vorbereitung der Hybridisierungsreaktion mit dem radioaktiv markierten Sondenfragment wurden die Membranen in Hybridisier-Röhren gelegt. Dabei war darauf zu achten, dass keine Luftblasen zwischen Glaswand und Membran blieben. Es wurden i. d. R. 16 ml formamidhaltige (50 % [v/v]) Hybridisierlösung zugegeben und die Membranen bei 42 °C 4 h lang zur Einstellung der Reaktionsbedingungen vorinkubiert. Dabei wurde zur unspezifischen Absättigung der DNA-Bindestellen 20 µl denaturierte, gescherte Heringssperma-DNA zugegeben. Nach 4 h wurde die Hybridisierlösung gegen die gleiche Menge frischer Lösung ohne Heringssperma-DNA ausgetauscht und das radioaktiv markierte Sondenfragment zugegeben. Die Reaktionszeit, bei der sich ein Gleichgewicht

zwischen freier und an komplementäre Sequenzen angelagerter Sonde einstellt, lag zwischen 18 - 24 h bei einer Inkubationstemperatur von 42 °C (Hybridisierungsöfen, Bachhofer). Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde die Hybridisierlösung entfernt und in 3-4 Waschschritten (je nach Stringenz) nicht oder nur schwach gebundene Sondenfragmente entfernt:

1. 6x SSC-Puffer 15 min bei 60 °C
2. 2x SSC-Puffer mit 0,1 % SDS 30 min bei 65 °C
3. 0,5x SSC-Puffer mit 0,1 % SDS 30 min bei 65 °C
4. 0,2x SSC-Puffer mit 0,1 % SDS 30 min bei 65 °C

Die so gewaschenen Membranen wurden an der Luft getrocknet, wieder in Klarsichtfolie verpackt und zur Anfertigung eines Autoradiogramms ca. 64 h auf Röntgenfilm (Kodak BioMax MS) fixiert und bei -20 °C gelagert. Die Autoradiogramme wurden in einer Agfa-Entwicklermaschine für Röntgenfilme entwickelt und ausgewertet.

#### 3.2.13.3.3 *Isolation Hybridisierungs-positiver Phagenklone*

Durch die Verwendung von zwei Membranen pro Platte konnten falsch positive, sprich unspezifische Markierungen ausgeschlossen werden. Markierungen, die auf beiden Membranen pro Genbank-Platte vorhanden waren, wurden auf den Boden der NZY-Tetracyclin-Agarplatten übertragen und entsprechende Regionen des Agars - in der Regel Blöckchen von ca. 1 cm<sup>2</sup> Fläche - ausgeschnitten. Die darauf befindlichen Phagen wurden in SM-Puffer ausgeschwemmt und zur Vereinzelung einem Sekundärscreening nach o. a. Arbeitsvorschrift unterworfen. Bei auf diese Art isolierten Phagenklonen wurden durch eine PCR mit den genspezifischen Primern P18 und P19 nochmals das Vorhandensein des gesuchten Phosphattransporter-Fragments kontrolliert, anschließend eine Größenabschätzung des *Geosiphon*-DNA-Inserts durch PCR mit Standard-Sequenzierprimern und Agarosegelelektrophorese durchgeführt und interessante Klone nach dem Protokoll des Herstellers (Stratagene, Heidelberg) mittels *in-vivo*-Excision in pSK-Phagemide umklont. Diese Phagemide konnten dann wie ‚normale‘ bakterielle Plasmide aus den Wirtszellen isoliert und analysiert werden.

#### 3.2.13.3.4 Direkte PCR aus der Genbank

Um aus der genomischen DNA-Genbank direkt PCR-Experimente durchführen zu können, wurden die entsprechenden Volumina PCR-Puffer und H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> des PCR-Ansatzes in Reaktionsgefäßen vorgelegt und 12,5 µl der Sekundärbank für einen 50 µl-PCR-Ansatz zupipettiert. Die Flüssigkeit wurde mit sterilem Mineralöl überschichtet und im PCR-Cycler (PersonalCycler, Biometra) 10 min bei 100 °C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Die übrigen Komponenten des PCR-Ansatzes wurden unter Durchstechen der Mineralölschicht zupipettiert und eine entsprechende PCR wurde durchgeführt.

### 3.2.13.3.5 Plattenlysate zur präparativen Isolierung von rekombinanter $\lambda$ -DNA

Um eine Hemmung der DNA Polymerase in PCR-Reaktionen mit der genomischen DNA-Bank als Template auszuschließen, wurde die DNA aus den Lambda-Phagen isoliert und gereinigt in PCR-Experimenten eingesetzt.

Um eine möglichst große Anzahl an Klonen in entsprechend hoher Kopienzahl zur Verfügung zu haben, wurde die Sekundärbank entsprechend dem Protokoll für Plaque-Lifts auf acht NZY-Tetracyclin-Agarplatten (22 x 22 cm) ausplattiert und bis zur konfluenten Lyse bei 37 °C im Brutschrank 8-10 Stunden inkubiert.

#### 3.2.13.3.5.1 *Isolation und Reinigung der $\lambda$ -Phagen*

Die TOP-Agarschicht mit den Phagen wurde anschließend unter der Sterilbank mit einem sterilen Spatel von der Oberfläche abgenommen und in ein 50 ml-Falcon-Röhrchen pro Platte überführt. Um auch die in die Träger-Agarschicht eindiffundierten Phagen vollständig mit in den Isolationsansatz zu überführen, wurde jede Platte mit 10 ml SM-Puffer überschichtet. Der SM-Puffer wurde nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur von den Platten abgezogen und mit dem bereits abgehobenen TOP-Agar vereinigt, weitere 15 ml SM-Puffer zugegeben und die Phagen aus dem TOP-Agar über Nacht bei 4 °C in den SM-Puffer diffundieren lassen. Tags darauf wurde das TOP-Agar/SM-Puffer-Gemisch auf jeweils zwei Röhrchen verteilt, auf ein Volumen von 40 ml aufgefüllt, zur Lyse der Bakterien und Freisetzung weiterer Phagenpartikel 1 ml Chloroform zu jedem Ansatz zugegeben und zwei Stunden bei 18 °C und 225 rpm liegend geschüttelt. Die Inhalte von jeweils zwei Falconröhrchen wurden anschließend in jeweils einem 100 ml-Beckman-Zentrifugenbecher vereinigt und 30 min bei 4 °C und 15.000 rpm in einer Beckman-Zentrifuge „Avanti-30“ mit Rotor „F0685“ der TOP-Agar sedimentiert. Der Überstand aller Zentrifugenbecher wurde in einer sterilen 1 l Glasflasche vereinigt und die bakterielle DNA und RNA durch Zugabe von DNase I und RNaseA, Endkonzentration jeweils 10 µg/ml und Inkubation bei Raumtemperatur 30 min verdaut. Anschließend wurde die Phagensuspension auf eine Konzentration von 1 M Natriumchlorid eingestellt und die Phagenpartikel wurden durch eine Copräzipitation mit 10 % (w/v) PEG 6000 über Nacht bei 4 °C gefällt. Die gefällten Phagenpartikel wurden in einer Sorvall-Zentrifuge (RC5C, Kendro, Hanau) mit Rotor GSA bei 10.000 rpm und 4 °C in 15 min sedimentiert, der Überstand verworfen und die Phagenpartikel in insgesamt 12 ml SM-Puffer resuspendiert. Dazu wurde das gleiche Volumen an Chloroform gegeben und für 1 min geschüttelt. Die Phagen wurden durch eine Zentrifugation in SS34-Röhrchen einer Sorvall-Zentrifuge (RC5C, Kendro, Hanau) mit Rotor SS34 bei 4.000 rpm und 4 °C in 10 min getrennt und die obere, wässrige Phase in einem 50 ml Falcon-Röhrchen mit fünf Tropfen Chloroform versetzt bei 4 °C gelagert.

#### 3.2.13.3.5.2 *Isolation von rekombinanter $\lambda$ -DNA aus Phagensuspensionen für PCR*

Zur Denaturierung der Phagen-Hüllproteine und Isolation der rekombinanten Phagen-DNA wurde eine Reinigung durch Phenolisieren durchgeführt. Dafür wurde die Phagensuspension in einem 50 ml-Falcon-Röhrchen mit dem gleichen Volumen eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (PCI, Verhältnis 25:24:1 (v/v)) versetzt und 5 min durch Invertieren gemischt. Das Gemisch wurde auf zwei 12 ml Greiner-Röhrchen verteilt und die Phagen durch Zentrifugation in einer Tischzentrifuge (Labofuge Ae, Heraeus

Sepatech) für 3 min bei Raumtemperatur und 5.000 rpm getrennt. Die obere, wässrige Phase wurde mit einer 5 ml-Eppendorfpipette mit steriler Spitze abgenommen, ohne die die Proteine enthaltene Interphase aufzuwühlen und solange weiter phenolisiert, bis keine Interphase mehr gebildet wurde. Um ggf. in der wässrigen Phase verbliebenes Phenol zu extrahieren, wurde einmal mit einem Chloroform-Isoamylalkoholgemisch (CI, Verhältnis 24:1 (v/v)) versetzt und wie oben angeführt durch Invertieren gemischt und die Phasen wurden anschließend durch Zentrifugation getrennt. Auch hier wurde nur die obere, wässrige Phase weiterverwendet. Diese die gereinigte rekombinante Phagen-DNA enthaltende Lösung wurde mit 1/10 des Volumens steriler 3 M Natriumacetatlösung pH = 4,7 versetzt und durch Zugabe des 2,5 fachen Volumens an 100 % Ethanol (vorgekühlt auf -20 °C) und anschließender Inkubation über Nacht bei -20 °C die DNA gefällt. Die gefällte DNA wurde am folgenden Tag in einer Tischzentrifuge (Labofuge Ae, Heraeus Sepatech) 3 min bei Raumtemperatur und 5.000 rpm sedimentiert, zur Entfernung mitgefällter Salze mit wenig eiskaltem 70 %igem Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Anschließend wurde die DNA in einer möglichst geringen Menge sterilem H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> wieder gelöst und zur Kontrolle einer Agarosegelelektrophorese unterzogen.

### 3.2.14 Analyse von Phosphataufnahme und -stoffwechsel durch Inkubation von *Geosiphon pyriformis*-Blasen und *Nostoc punctiforme*-Zellen mit <sup>32</sup>P<sub>i</sub>

#### 3.2.14.1 Inkubation mit <sup>32</sup>P<sub>i</sub> und Extraktion der löslichen Phosphatverbindungen

Zur Vorbereitung der Fütterung wurden Blasen von *Geosiphon pyriformis* von den Kulturen gesammelt, unter dem Binokular von anhängender Erde und Sand befreit, vereinzelt, die Hyphen abgeschnitten und in einer Plastikpetrischale in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> ca. 24 Stunden im Kulturschrank gelagert.

Am nächsten Tag wurden die Blasen unter dem Binokular auf Verfärbungen, Turgorverlust oder andere Anzeichen von Schädigungen kontrolliert und jeweils 10-20 intakte Blasen in Eppendorf-Reaktionsgefäße mit 500 µl Medium GM32 überführt. Diese Reaktionsgefäße wurden zwei Tage im Kulturschrank inkubiert, um die Blasen an gleiche Bedingungen zu adaptieren und das Keimen neuer Hyphen zu ermöglichen. Mit zur Fütterung bestimmten Zellen von *Nostoc punctiforme* wurde gleichermaßen verfahren. Die Zellen wurden mit einer sterilen Spatelspitze von einer Kulturplatte abgenommen. Dabei wurde jeweils eine Mikrospatelspitze *Nostoc punctiforme* auf ein Eppendorf-Reaktionsgefäß verteilt.

Um einen gleichmäßigen Energetisierungszustand zu gewährleisten, wurden die Reaktionsgefäße mit den *Geosiphon*-Blasen bzw. *Nostoc* zum Ende der Dunkelphase aus dem Kulturschrank entnommen und bis zum Fütterungsexperiment im Dunkeln aufbewahrt.

Zur Fütterung wurde zunächst das Medium entfernt und gegen frisches GM32 bei Licht-, Dunkel- und Pulse-Chase-Experimenten bzw. 2x GM32 ohne Phosphat und eine entsprechende Menge Phosphatpuffer und H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> bei konzentrationsabhängiger Fütterung ersetzt. Die Menge an H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> wurde dabei so variiert, dass der Gesamt-Reaktionsansatz prinzipiell in 20 µl Gesamtvolumen durchgeführt wurde. Bei Reaktionen im Licht wurden die zu fütternden Organismen anschließend zunächst 10 min an die entsprechende Lichtintensität (100 µmol/m<sup>2</sup>s) adaptiert, bevor die einer Aktivität von 37 kBq entsprechende Menge an radioaktivem H<sub>3</sub><sup>32</sup>PO<sub>4</sub> zugegeben wurde. Dies hatte zur Folge, dass die Licht-, Dunkel- und Pulse-Chase-Fütterungsexperimente bei einer spezifischen Aktivität von 37 kBq/µmol durchgeführt wurden. Dabei ist zu bemerken, dass Blasen von *Geosiphon pyriformis* bei den Experimenten zur konzentrationsabhängigen Fütterung auch trägerfreies

$^{32}\text{P}_i$  angeboten wurde. In jedem Fall lag die Konzentration des angebotenen Gesamt- $\text{P}_i$  in einem Bereich, der für die Aufnahme ein hochaffines Phosphat-Transportsystem voraussetzt.

Für die Fütterung wurden folgende Inkubationszeiten gewählt:

Fütterung im Licht (*Geosiphon* und *Nostoc*): 10 s, 30 s, 5 min, 10 min, 60 min, Beleuchtung während der Inkubation =  $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ .

Fütterung im Dunkeln (*Geosiphon* und *Nostoc*): 10 s, 30 s, 5 min, 10 min, 60 min, minimale Beleuchtung durch 5 W-Grünlichtbirne (Osram, München) während der Pipettiervorgänge.

Pulse-Chase (*Geosiphon* und *Nostoc*): Fütterungspuls 1 min bei Beleuchtung  $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  Nachinkubation in nichtradioaktivem GM32-Medium für 0 s, 30 s, 1 min, 5 min, 10 min, 30 min, 60 min, ebenfalls bei Beleuchtung  $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ .

Konzentrationsabhängige Fütterung (nur *Geosiphon*): 1 min bei Beleuchtung  $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  bei Gesamt- $\text{P}_i$ -Konzentrationen von 5,4 nM (trägerfreier Tracer) 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 7,5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 75  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  und 1 mM.

Nach Ablauf der Inkubationszeit bzw. des Fütterungspulses bei Pulse-Chase-Experimenten wurde nicht inkorporiertes  $^{32}\text{P}_i$  durch dreimaliges Waschen mit je 500  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  entfernt, vom Waschwasser des letzten Waschschrittes wurden 20  $\mu\text{l}$  zur Kontrolle durch Szintillationszählung aufgehoben und in ein Szintillationsröhrchen überführt. Es folgte bei Pulse-Chase-Experimenten die Nachinkubation mit nichtradioaktivem GM32, das anschließend ebenfalls abgezogen und verworfen wurde. Die so gefütterten Blasen von *Geosiphon pyriformis* bzw. Zellen von *Nostoc punctiforme* wurden zur Extraktion löslicher Phosphatverbindungen mit 100  $\mu\text{l}$  auf 70 °C vorgeheiztem 70 %igem Methanol überschichtet und 5 min bei 70 °C im Wasserbad inkubiert. Die Festbestandteile im Ansatz wurden in einer Tischzentrifuge einige Sekunden bei 10.000 rpm sedimentiert, der Überstand abgezogen und in einem graduierten Eppendorf-Reaktionsgefäß gesammelt. Die Extraktion wurde wie oben mit weiteren 200  $\mu\text{l}$  auf 70 °C vorgeheiztem 70 %igem Methanol wiederholt und der zweite Extrakt mit dem ersten vereinigt. Die übriggebliebenen Zellbestandteile wurden mit 1 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  aufgenommen und zur Szintillationszählung in ein Szintillationsröhrchen übertragen. Der Methanolextrakt wurde mit weiterem 70 %igem Methanol auf 500  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und davon 20  $\mu\text{l}$  zur Szintillationszählung in ein Szintillationsröhrchen übertragen.

Die vorbereiteten Proben wurden mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit Quicksafe A (Zinsser Analytic, Frankfurt) durch Schütteln auf dem Vortex gemischt, wobei bei den Proben mit 1 ml Probenvolumen die Zellreste durch Gelieren der Szintillationsflüssigkeit infolge des hohen Wasseranteils in der Schwebe gehalten wurden, um ein sichereres Messergebnis zu garantieren. Die so vorbereiteten Proben wurden in einem Szintillationszähler Packard Tri-Carb 1600TR (Packard, Meriden, USA) bei 1min Zähldauer gezählt.

Die Zählergebnisse wurden im ASCII-Format auf Diskette ausgelesen und einer weiteren Datenverarbeitung im Tabellenkalkulationsprogramm Excel®, Version 10, 2002 (Microsoft, Redmond, USA) zugeführt.

Die Methanolextraktionen wurden in einem Heizblock (Techne, Dri-Block DB-3, Duxford, UK) mit Sample Concentrator bei 70 °C bis zur Trockenheit eingedampft und dann entsprechend ihrer vorher bestimmten Aktivität in 70 %igem Methanol wieder rückgelöst, so dass eine Aktivität von 5.000 CPM/ $\mu\text{l}$  eingestellt wurde. Bei Proben, die eine solche Aktivität nicht erreichten, wurde auf 1.000 CPM/ $\mu\text{l}$  eingestellt. Von den eingestellten Proben wurden

jeweils 2x 5 µl punktförmig unter Zwischentrocknung mit einem Fön auf eine Dünnschichtchromatographie-Platte MN 300-50 (20x20 cm, beschichtet mit nativer Cellulose, Schichtdicke = 0,5 mm, Macherey & Nagel, Düren) aufgetragen (Gesamtaktivität 50.000 CPM bzw. 10.000 CPM pro Platte) und 2-dimensional aufgetrennt.

#### **3.2.14.2 Trennung der radioaktiv markierten, löslichen Phosphatverbindungen mit 2-dimensionaler Dünnschichtchromatographie**

Zur 2-dimensionalen dünnschichtchromatographischen Trennung der radioaktiv markierten, löslichen Phosphatverbindungen nach FEIGE ET AL. 1969 (angepasst nach KLUGE ET AL., 1970) wurden die Laufmittel jeweils frisch angesetzt. Jeweils 200 ml des Laufmittels wurde in eine mit Papier ausgekleidete Dünnschichtchromatographiekammer eingefüllt und die Kammersättigung abgewartet (LM I: 5h, LM II + III: 3h). Danach wurde für jedes Laufmittel ca. fünf Stunden chromatographiert, über Nacht im Abzug zwischentrocknet und am nächsten Tag mit dem nächsten Laufmittel weiterchromatographiert. Laufmittel I wurde für die Trennung in der ersten, die Laufmittel II und III für die Trennung in der zweiten Dimension verwendet.

Nach dem Chromatographieren und Trocknen wurden die Platten in handelsübliche Frischhaltefolie eingeschlagen und in Röntgenfilmkassetten mit Verstärkerfolie (M+S Laborgeräte, Heidelberg) gegen Kodak BioMax MS Röntgenfilm exponiert. Die Expositionszeit betrug in der Regel 60 Stunden und ist jeweils im Ergebnisteil vermerkt.

#### **3.2.14.3 Bestimmung der Verteilung der Markierung mittels Szintillationszählung**

Die Bestimmung der relativen Verbindungsanteile mittels Szintillationszählung wurde durch folgende Arbeitsschritte vorgenommen: Zunächst wurden die Schwärzungen der Röntgenfilme mit wasserfestem Filzstift auf handelsübliche Kopierfolien übertragen. Aufgrund des Laufverhaltens konnten diese markierten Stellen dann einzelnen Verbindungsklassen zugeordnet werden. Die Kopierfolien mit den übertragenen Schwärzungen wurden schließlich auf die Chromatographieplatten aufgelegt und durch Nachzeichnen der Markierungen mit einem Kugelschreiber in die Trägerschicht eingedrückt. Die so lokalisierten Stellen mit Strahlungsaktivität wurden mit Cellulose-Campher-Gemisch überschichtet. Nach dessen Trocknung konnten die markierten Stellen mit einer Skalpellklinge ausgeschnitten und von der Trägerplatte abgehoben werden. Das abgehobene Chromatographiematerial wurde in ein Szintillationsröhrchen überführt, mit 3ml Quicksafe A-Szintillationslösung (Zinsser Analytic, Frankfurt) überschichtet und im Szintillationszähler Packard Tri-Carb 1600TR (Packard, Meriden, USA), wie oben (vgl. 3.2.14.1) beschrieben, gezählt. Auch die so gewonnenen Daten wurden, wie oben beschrieben, am Rechner weiterverarbeitet. Dabei wurde die Summe der Zerfälle aller Verbindungen, also die Gesamtmarkierung einer chromatographischen Auftrennung mit 100 % gleichgesetzt und die relativen Anteile der einzelnen Verbindungen bzw. Verbindungsklassen wurden bestimmt.

#### 3.2.14.4 Bestimmung der relativen Verbindungsanteile mittels Bildanalyse der Autoradiographien

Im Rahmen der Arbeit wurde versucht, die aufwendige und mit der Möglichkeit von Kontaminationen behaftete direkte Zählung durch eine Bildanalyse der Autoradiographien zu ersetzen. Grundlage dafür ist der Schwärzungsgrad der Autoradiographien, der in digitalen Graustufenbildern als Grauwert zwischen 0 (weiß) und 255 (schwarz) angegeben wird. Software, die in der Lage ist, solche Grauwerte auszulesen, die Färbung des Hintergrunds aus den Informationen herauszurechnen und dann durch Integration von Fleckgröße und Schwärzungsgrad die absolute Menge einer radioaktiv markierten Verbindung bzw. Verbindungsklasse zu berechnen, gibt es zurzeit nur zur Auswertung von 2D-Proteingelen. Diese Software war allerdings in der Arbeitsgruppe nicht verfügbar und konnte aus Kostengründen auch nicht angeschafft werden. Deshalb wurde zunächst ein Programm selbst geschrieben, jedoch später auf Makroprogrammierungen unter Verwendung von in der Arbeitsgruppe vorhandener (Paint Shop Pro 7.0, Jasc Software, Eden Prairie, USA) bzw. im Internet frei verfügbarer (Scion Image Beta 4.0.2) Software zurückgegriffen. Der Quellcode des selbst geschriebenen Programms und Hinweise zur Handhabung beider Auswertungsmethoden finden sich im Anhang auf beiliegendem Datenträger.