

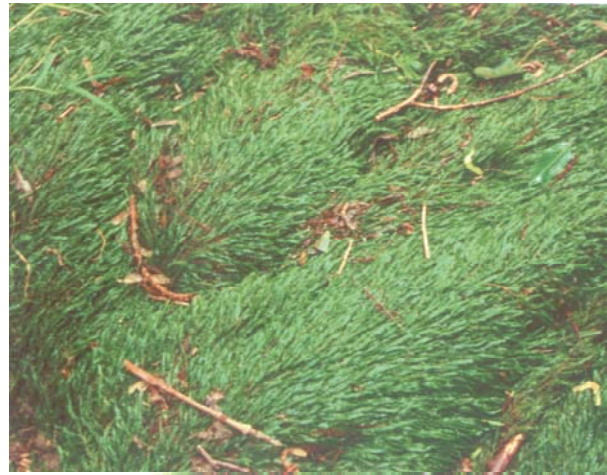
2. Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial und Kultivierungsbedingungen

2.1.1 *Fontinalis antipyretica* Hedw.

Der Botaniker Johann Hedwig (1730-1799) beschrieb zum ersten Mal das flutende Quellmoos. Die Namensgebung (fons (lat.) = Quelle; anti (griech.) = gegen; pyr (griech.) = Feuer) erfolgte in Anlehnung an das Vorkommen in Quellen und Brunnen sowie die frühere Verwendung als Brandschutz beim Hausbau (Schubert und Wagner, 1988; Richardson, 1981). Die nach Shaw und Goffinet (2000) getroffene taxonomische Einordnung wird wie folgt beschrieben:

Abteilung: Bryophyta
Klasse: Bryopsida
Unterklasse: Bryidae
Ordnung: Hypnales
Familie: Fontinalaceae
Gattung: *Fontinalis*
Art: *antipyretica*.



Die mit weltweit 35 Arten beschriebene Gattung *Fontinalis* kommt in der Nordhemisphäre mit vier Arten vor (Frahm und Frey, 1987). *Fontinalis antipyretica* (Quellmoos) bildet in fließenden Gewässern dichte, dunkelgrüne Rasen bis zu 40 cm Länge. Als Hydrophyt besitzt es kein ausgebildetes inneres Leitsystem, die Wasser- und Stoffaufnahme erfolgt über die gesamte Blattoberfläche. Der Gametophyt zeigt scharf gekielte Blätter, die dreireihig an den reich verzweigten Stämmchen sitzen. Die ganzrandigen Blättchen besitzen keine Mittelrippe und bestehen aus einer einzigen Schicht prosenchymatischer Zellen. Die Rhizoide an der Stämmchenbasis verankern das Moos an Steinen und Ästen. Die bevorzugte Wassertemperatur liegt unter 15 °C, so dass die Biomasse hauptsächlich in den Wintermonaten gebildet wird. Während dieser Zeit kann auch die Sporenbildung

beobachtet werden. Das zweihäusige, pleurokarpe Moos bildet auf einer kurzen Seta kleine, ovale, braun-rote Sporenkapseln mit doppeltem Peristom (Sporophyt). Die Vermehrung erfolgt jedoch vorwiegend vegetativ über abgetrennte Sprosssteile. Die Arten der Gattung *Fontinalis* variieren stark in ihrer Morphologie und sind daher taxonomisch schwer zu differenzieren. Aufgrund seiner breiten ökologischen Standortamplitude wird es zu den euryöken Moosen gezählt. Es sind Vorkommen aus klaren, oligotrophen bis mesotrophen, neutralen bis kalkreichen Fließgewässern beschrieben. Als bevorzugter Untergrund gilt ein steiniges Kiesbett (Nebel und Philippi, 2000). Von Aichele und Schwegler (1967) werden auch Seen bis zu 18 m Tiefe als Standorte beschrieben. Das überwiegend submerse Moos übersteht gelegentliches Trockenfallen des Standortes problemlos.

2.1.2 Standort und Probennahme

Als Standort für die Probennahme wurde ein Teil des Helbe-Oberlaufes an der Steinbrücke in der Nähe Dietenborn/Kyffhäuserkreis (Messtischblatt 4629/2 der Hainleite, Thüringisches Landesvermessungsamt Erfurt, 1996) gewählt. Die Helbe durchfließt im Norden Thüringens in südöstlicher Richtung das Landschaftsschutzgebiet Helbetal und mündet in die Unstrut. *Fontinalis antipyretica* zeigt an diesem Standort ganzjährig ein hohes Vorkommen. Als typischer Karstfluss wird das Untergrundgestein von Muschelkalk mit hohen Anteilen an Mergeln und Tonen gebildet. Die relative Ionenkonzentration setzt sich zu zwei Drittel aus Kalzium-, Sulfat-, Hydrogencarbonat- und Magnesiumionen zusammen. Der pH-Wert liegt mit 7,2 im neutralen Bereich, die Jahresmitteltemperatur bei 9,5 °C (Busse, 1997). Nach Angaben der Thüringer Landesanstalt für Umwelt ist die Helbe (1997-2001) im Bereich der Probensammelstelle als unbelastetes Fließgewässer einzustufen. Aufgrund der hohen HCO₃-Konzentration liegt die Wasserhärte bei 17° dH (siehe auch Anhang Tab. 1). Das Moosmaterial wurde in wassergefüllten Kunststoffwannen gegebenenfalls auf Eis transportiert und über Nacht bei 4 °C in Wasser gelagert.

2.1.3 Kultivierung

Einen Tag nach der Probennahme erfolgte die Aufarbeitung des Pflanzenmaterials. Dazu wurde das Moos mehrmals in bidestilliertem Wasser gewaschen und vitale Pflanzen ausgelesen. Verwendet wurden etwa 2 cm lange Teilstücke der grünen Triebspitzen. Die Kultivierung erfolgte in Erlenmeyerkolben mit verdünntem Knop-Medium bei einem

pH-Wert von 6,5-7,0 (Schopfer; 1986). Zur Vermeidung von Algenwachstum während der Kultivierung wurde, wie in Bruns et al. (1995) beschrieben, das Medium 1:10 verdünnt und der Stickstoff- und Phosphatanteil auf 33 % reduziert. Das Medium setzte sich aus $\text{CaNO}_3 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$ (0,033 g/l), KCl (0,012 g/l), KH_2PO_4 (0,0083 g/l), KNO_3 (0,0083 g/l), $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ (0,025 g/l) sowie ca. 25 μl einer gesättigten FeCl_3 -Lösung zusammen.

Die Wahl der Weithals-Erlenmeyerkolben richtete sich nach der eingesetzten FM bzw. nach dem Volumen des Mediums. Je nach Versuchsansatz wurden 2 g FM mit 200 ml Medium in 300 ml-Kolben bzw. 3 g FM mit 300 ml Medium in 500 ml-Kolben inkubiert. Entsprechend den natürlichen Wachstumsbedingungen erfolgte die Kultivierung bei 10 °C. Belichtet wurde automatisch 12 h pro Tag mit ca. 40 kLux. Zur Gewährleistung einer homogenen Probenmischung und zur Verbesserung der Sauerstoffversorgung des Pflanzenmaterials wurden die Versuchskolben bei ca. 120 rpm geschüttelt. Eine 24-stündige Konditionierung unter den oben genannten Bedingungen ging allen Experimenten voraus, mit Ausnahme der Proben K frisch, die direkt nach der Probennahme eingesetzt wurden.

2.1.4 Schwermetallzugabe

Die Schwermetalle Kupfer, Cadmium, Blei und Zink wurden in Form von gelösten Chloridsalzen direkt dem Knop-Medium nach der Konditionierung zugegeben. Folgende Me(II)-Konzentrationen wurden in Kurzzeit- (4 h) und Langzeitversuchen (1 d, 3 d, 5 d, 7 d) eingesetzt: 25 μM , 50 μM und 100 μM .

2.1.5 Hitzestress

Entsprechend den natürlichen Wachstumsbedingungen des Moores wurde die Temperatur für den Hitzestress auf 20 °C und 30 °C, die der Kontrollen (K) auf 10 °C festgelegt. Die Proben wurden unter diesen Temperaturen wie in Kapitel 2.1.3 beschrieben kultiviert. Als Versuchszeiträume wurden vier Stunden, ein Tag und drei Tage gewählt.

2.2. Messung der Chlorophyllfluoreszenz

Die sensitive Indikation eines möglichen Vitalitätsverlustes des Moores infolge der Schwermetallexposition basierte auf der Messung der Chlorophyllfluoreszenzkinetik. Das Fluoreszenzsignal ist zu etwa 95 % auf das Chlorophyll a, das an das Photosystem II (PS II) gebunden ist, zurückzuführen (Krause und Weis, 1991; Buschmann, 1986). Angeregte Chlorophyll-a-Moleküle geben *in vivo* beim Übergang vom ersten Singulettzustand S_1 in den Grundzustand S_0 3-6 % der absorbierten Lichtenergie in Form von Fluoreszenz ab. Nach Kautsky et al. (1960) zeigen dunkel adaptierte Blätter, die mit aktinischem Licht bestrahlt werden, eine typische Fluoreszenz- oder Induktionskinetik (Kautsky-Effekt), die das Zusammenwirken der einzelnen PS II-Komponenten bei der Elektronenübertragung widerspiegelt und in prompter und verzögerter Fluoreszenz gegliedert wird. Eine direkte oder indirekte Schädigung des Photosyntheseapparates führt aufgrund gestörter Elektronentransportprozesse zu einer veränderten Fluoreszenzkinetik sowie zu einem Anstieg der Fluoreszenz (Lichtenthaler und Miesch, 1997; Buschmann, 1986). Die enge Beziehung zwischen Photosyntheseleistung und Vitalität ermöglicht somit die Indikation physiologischer Veränderungen mittels Chlorophyllfluoreszenz (Lichtenthaler et al., 1998).

Die impulsmodulierten Lichtmessungen am Mini-PAM-Fluorimeter (Heinz Walz GmbH, Effeltrich) basierten auf der Messung des Kautsky-Effektes und erlaubten den Nachweis selektiver Parameter der prompten Chlorophyllfluoreszenzkinetik (Abb. 5). Diese bildeten die Grundlage zur Kalkulation der effektiven Quantenausbeute der photochemischen Energieumwandlung des PS II, dem Genty-Parameter (Genty et al., 1989).

Für die Messungen wurden Blattspitzen schwermetallbelasteter Proben und unbelasteter Kontrollen verwendet. Pro Probe wurden fünf parallele Messungen durchgeführt. Die Dunkeladaptation erfolgte 30 min bei 4 °C. Die Anregung und Bestimmung der Fluoreszenz erfolgte stets auf der Blattoberseite bei Raumtemperatur. Für die Detektion der Grundfluoreszenz (F_0) wurden die Blattproben mit gepulstem Schwachlicht (650 nm; $0,15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR) bestrahlt. Als Grundfluoreszenz bezeichnet man eine konstante Fluoreszenz, die unabhängig von der photosynthetischen Aktivität gemessen werden kann und die die Fluoreszenzemission der Chlorophyll-a-Moleküle in den Antennensystemen des PS II darstellt, noch ehe Lichtenergie auf die Reaktionszentren übertragen wird (Buschmann, 1986).

Für die Aufnahme der schnellen Fluoreszenzkinetik wurde aktinisches Licht ($6.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR) mit einem Sättigungsimpuls ($18.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR) verwendet. Die dabei gemessene variable Fluoreszenz (F_v) spiegelt den Anstieg der

Fluoreszenz bis zum Maximalwert (F_M) in Abhängigkeit der photosynthetischen Aktivität wider. Der Genty-Parameter liegt unabhängig der Spezies zwischen 0 (minimale Vitalität) und 1 (maximale Vitalität), bei gesunden Pflanzen zwischen 0,80 und 0,84 (www.ab.ipw.agrl.ethz.ch).

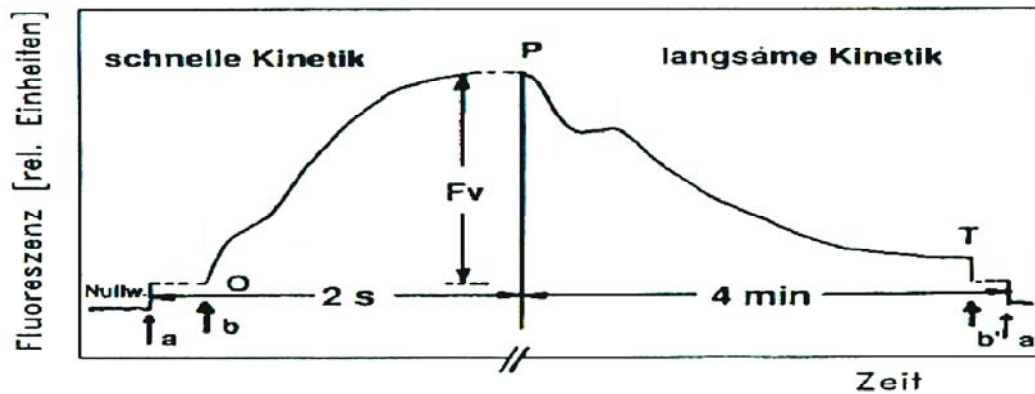


Abb. 5: Induktionskinetik der prompten Chlorophyllfluoreszenz eines Blattes nach Dunkeladaption (Buschmann, 1986). Messung mit einem PAM-Fluorimeter (Heinz Walz GmbH). $O = F_0 =$ Grundfluoreszenz, $P = F_M =$ maximale Fluoreszenz, $F_V =$ variable Fluoreszenz, $T =$ stationäre Fluoreszenz bei konstant ablaufender Photosynthese, $a/a' =$ An- bzw. Ausschalten des Messlichtes, $b/b' =$ An- bzw. Ausschalten des arktinischen Lichtes. Genty-Parameter: F_V/F_M .

2.3 Bestimmung des intrazellulären Schwermetallgehaltes

2.3.1 Probenvorbereitung

Das geerntete Moos wurde mehrmals mit bidest. H_2O gespült. Anschließend erfolgte der Austausch der an der Zellwand adsorbierten Schwermetallionen durch Ni(II)-Ionen (Brown und Wells, 1988). Das Material wurde dazu 3 x 30 min in je 200 ml 20 mM $NiCl_2$ gewaschen, bei 80 °C über Nacht getrocknet und in Polyethylenflaschen bis zum Aufschluss bei 4 °C aufbewahrt.

2.3.2 Aufschluss des Pflanzenmaterials

Die trockenen Moosproben wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert und zu jeweils 50 mg in spezielle Teflongefäße (Lined Digestion Vessels, Fa. CEM, Kamp-Lintfort) eingewogen. Nach Zugabe von je 4 ml HNO₃ (65%ig, suprapur) und 2 ml H₂O₂ (Perhydrol, 30%ig) erfolgte der Mikrowellenaufschluss (Fa. CEM, MDS 2100) nach einer modifizierten Methode nach Bruns et al. (1995). In einem Dreistufenprogramm wurde dabei die Geräteleistung von 25 % über 70 % bis 90 % erhöht. Der Druck-Sollwert wurde für die jeweiligen Stufen wie folgt festgelegt: 1,30 bar, 6,95 bar und 8,33 bar. In der Stufe 1 lag eine Temperatur von 20 °C vor, die in Stufe 2 und 3 auf 180 °C anstieg. Die Sollparameter wurden in Stufe 1 und 2 jeweils 1 min und in Stufe 3 10 min gehalten. Die Gesamtdauer der einzelnen Stufen belief sich auf 10 min, 20 min bzw. 20 min. Das abgekühlte, aufgeschlossene Material wurde mit bidest. H₂O auf 50 ml aufgefüllt und in Polyethylenflaschen bei 4 °C gelagert.

2.3.3 Schwermetallanalytik mittels Flammen-AAS

Die Analyse der intrazellulären Schwermetallgehalte in den Moosproben wurde mit einem Flammen-Atomabsorptionsspektrometer (ATI UNICAM 929, Fa. Solar) durchgeführt. Die Kalibrierung erfolgte im Konzentrationsbereich von 5-100 µg/l Me(II)-Ion. Die Nachweisgrenzen für die Schwermetalle Kupfer, Blei, Zink und Cadmium in wässriger Phase lagen bei 0,16 µmol/l; 0,24 µmol/l; 0,08 µmol/l bzw. 0,09 µmol/l.

2.4 Analytische Elektronenmikroskopie

Die energiedispersive Röntgenmikroanalyse sowie die Elektronen-Energie-Verlust-Spektroskopie an Blättern von *Fontinalis antipyretica* wurde am IPB Halle/Saale von Herrn Dr. D. Neumann durchgeführt.

Die EDX-Technik (energy dispersive X-ray analysis) lieferte Aussagen zur intrazellulären Elementzusammensetzung verschiedener Zellkompartimente. Bei diesem Verfahren wird die zu untersuchende Probe mit energiereichen Elektronen bestrahlt. Diese Primärelektronen stoßen Elektronen aus kernnahen Energieniveaus der Probenatome heraus. Die entstehende Lücke füllen Elektronen höherer Energieniveaus, wobei elementspezifische Röntgenstrahlung als Energiedifferenz emittiert wird.

Die Bestimmung von Bindungszuständen ausgewählter Elemente im subzellulären Raum ermöglichte die EEL-Spektroskopie (electron energy loss spectroscopy). Hierbei wird der elementspezifische Energieverlust inelastisch gestreuter Elektronen, der nach Wechselwirkung energiereicher Elektronen mit der Elektronenhülle des Probenatoms entsteht, gemessen. Die kantennahe Feinstruktur der Spektren gibt Aussagen über den Bindungszustand des entsprechenden Atoms.

Die EEL-Spektren wurden von 50 nm dicken Ultradünnschnitten mit einer SIT TV-Kamera aufgenommen und nach Subtraktion des Hintergrundes (Evision-System, SYS) mit Standardspektren bzw. quantenchemischen Berechnungen (Dichte-Funktions-Theorie, DFT, Dr. O. Lichtenberger, Max-Planck-Institut für Mikrostrukturphysik Halle/Saale) verglichen.

Die Präparation der Proben erfolgte nach Neumann et al. (1995). Das Blattmaterial wurde mit flüssigem Propan eingefroren (JDF 030, Balzers), in Aceton gefriersubstituiert (CS auto, Leica) und anschließend in Epoxidharz eingebettet. Die Analysen wurden am Transmissions-Elektronenmikroskop EM 912 OMEGA (Zeiss), ausgerüstet mit einem Energiefilter (OMEGA-Filter, Zeiss) und einem EDX-Analyser (Link, Oxford Instruments), durchgeführt.

2.5 Proteinchemische Methoden

2.5.1 Proteinextraktion

Zur Isolierung der Proteinfraction wurde vom Standort entnommenes oder bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagertes Material verwendet. Die Proben wurden unter flüssigem Stickstoff homogen gemörsert und in Extraktionspuffer (25 mM Tris/HCl, pH-Wert 7,5; 3 mM EDTA; 10 mM DTT; 0,2 % (w/v) PMSF) im Verhältnis 1:2 (w/v) aufgenommen. Alle Arbeiten wurden auf Eis ausgeführt bzw. Mörser und frisch hergestellte Puffer vorgekühlt. Im Anschluss erfolgte die Abtrennung der Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 10.000 g, 10 min und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (K24 D, Zentrifugenbau Engelsdorf). Das Volumen des Extraktes wurde bestimmt und $3 \times 50\text{ }\mu\text{l}$ für die Proteinbestimmung entnommen. Die Proteinfraction wurde mit $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ kaltem Aceton im Verhältnis 1:5 für mindestens 1 h bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (5.000 g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 min, Hettich Universal 30 RF, Tuttlingen) wurde das Proteinpellet bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ getrocknet und gelagert.

2.5.2 Hitzefällung

Zur Isolierung hitzestabiler Proteine wurden die Proben in Anlehnung an McCormick et al. (1991) in flüssigem Stickstoff gemörsert, in Zentrifugenröhrchen überführt und etwa 4 min auf Raumtemperatur erwärmt. Nach Zugabe von 10 ml Extraktionspuffer (25 mM Tris/HCl, pH-Wert 7,5; 3 mM EDTA; 10 mM DTT; 0,2 % (w/v) PMSF) wurden die Proben nach 3-5-maligem Mischen (Vortex-Mixer) für 15 min auf Eis inkubiert. Der zentrifugierte Überstand (100.000 g; 1 h; 4 °C; Ultrazentrifuge Beckmann L8-60M, München) wurde mit flüssigem Stickstoff versetzt und die Proteine bei 75 °C für 15 min im Schüttelbad gefällt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (100.000 g; 30 min; 4 °C; Ultrazentrifuge Beckmann L8-60M) konnten die Proteine, wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben, gefällt werden.

2.5.3 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmungen nach Lowry et al. (1951) wurden wie folgt durchgeführt: Das Proteinextrakt (50 µl) wurde mit 2 ml 5%iger TCA mindestens 1 h bei 4 °C gefällt und im Anschluss an die Zentrifugation (5.000 g, 10 min, 4 °C, Hettich Universal 30 RF) in 50 µl 1 N NaOH gelöst. Nach Zugabe von 0,5 ml einer Lösung aus 0,5 ml Lösung A (1 % (w/v) CuSO₄ und 2 % (w/v) Na/K-Tartrat, 1:1 (v/v) gemischt) und 25 ml der Lösung B (2 % (w/v) Na₂CO₃) wurde der Ansatz 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und mit 1,0 ml bidest. H₂O und 50 µl Folin-Coicalteau-Reagenz versetzt. Die Bestimmung der Absorption erfolgte nach 30 min bei einer Wellenlänge von 578 nm (Fotometer, Hitachi 1100). Als Blindwert wurden 50 µl NaOH eingesetzt und wie oben beschrieben behandelt. Die Proteinkonzentrationen wurden anhand eines Vergleiches einer Eichgeraden von Rinderserumalbumin im Bereich von 10-100 µg RSA/100 µl 1 N NaOH ermittelt.

2.5.4 Reduktive Carboxymethylierung von Proteinen

Um Aggregationen cysteinreicher Proteine vorzubeugen, wurden die Sulfhydrylgruppen entsprechender Proteine modifiziert. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Carboxymethylierung reduzierter SH-Gruppen durch Iodacetamid unter Bildung von S-Carboxamidomethylcystein. Die so modifizierten Cysteinreste sind stabil und irreversibel reduziert. Es wurden 10 µg Protein in 5 µl Puffer (0,2 M Tris/HCl, pH-Wert 8,8; 8 % (w/v) SDS; 50 % (v/v) Glycerol und 2 µl 0,2 M DTT) gelöst und für 5 min gekocht. Zu

den abgekühlten Proben wurden 3 µl 1 M Iodacetamidlösung (pH-Wert 8,0) gegeben und für 15 min bei 50 °C inkubiert.

2.5.5 Elektrophoretische Methoden

2.5.5.1 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Probenvorbereitung wurde das Proteinpellet in denaturierendem Probenpuffer (0,06 M Tris/HCl, pH-Wert 6,8; 10 % (v/v) Glycerol; 2 % (w/v) SDS und 5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol) mit einer Konzentration von 2 µg/µl aufgenommen, 2 min bei 95 °C erhitzt und auf Eis abgekühlt und gegebenenfalls zentrifugiert (5.000 g; 10 min; 4 °C; Hettich Universal 30 RF). Durch Zugabe von Bromphenolblau wurde die Lauffront markiert. Die analytische Auftrennung der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes erfolgte in einem vertikalen Gelelektrophoresesystem (Biometra, Göttingen). Die Mini-Gradientengele (10-20 % Tris/Tricin) mit einer Laufstrecke von 6 cm und einer Dicke von 1 mm wurden nach dem Protokoll von Sambrook (1989) mittels Gradientenmischkammer hergestellt. Um eine gute Auflösung kleinerer Proteine (< 15 kDa) zu erreichen, wurde das Puffersystem nach der Methode von Schägger und Jagow (1987) angewandt. Je nach Verwendungszweck wurden 10-20 µg Protein pro Spur aufgetragen. Die Konzentrierung der Proben im Sammelgel erfolgte bei 40 V/10 mA, die Proteintrennung im Trenngel bei konstant 150 V/25 mA. Als Molekulargewichtsmarker diente der Wide Range Protein Standard (NOVEX, Frankfurt). Die Proteine markierten einen Molekulargewichtsbereich von 2,5-200 kDa (Insulin A-Kette (2,5 kDa), Insulin B-Kette (3,5 kDa), Aprotinin (6,0 kDa), Lysozym (14,4 kDa), Trypsin-Inhibitor (21,5 kDa), Karbonische Anhydrase (31,0 kDa), Lactat-Dehydrogenase (36,5 kDa), Glutamin-Dehydrogenase (55,4 kDa), Rinderserumalbumin (66,3 kDa), Phosphorylase b (97,4 kDa), β-Galactosidase (116,3 kDa) und Myosin (200,0 kDa)).

2.5.5.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese

2.5.5.2.1 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die Trennung der komplexen Proteingemische entsprechend ihrem isoelektrischen Punkt erfolgte modifiziert nach der Methode von O'Farrell (1975).

Zur Vorbereitung der isolierten Proteinproben (Kapitel 2.4.1) wurden die Proteinpellets in denaturierendem Lysispuffer (8 M Harnstoff; 0,5 % (v/v) Nonidet P40; 5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol und 0,8 % (v/v) Servalyt (pH-Wert 3-10; 40%ig)) in einer Konzentration von 2 µg/µl aufgenommen (Görg, 1991). Des Weiteren wurde Bromphenolblau zugesetzt, um die Migration der Proben aus den Probentrögen während der IEF zu verfolgen. Der Einsatz von 100 µg Protein pro Trennung zeigte optimale Ergebnisse.

Aufgrund ihres hohen Auflösungsvermögens wurden immobilisierte pH-Gradienten-Streifen (IPG-Streifen; pH-Wert 4-7; 7 cm; Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) für die IEF eingesetzt. Vor Gebrauch wurden die trockenen Immobilinstreifen 16-18 Stunden in einer entsprechenden Quellkammer bis auf 1 mm Dicke rehydratisiert. Die dazu verwendete Lösung enthielt 8 M Harnstoff sowie 0,5 % (v/v) Nonidet P40 und 20 mM DTT und wurde stets neu hergestellt.

Die horizontale Fokussierung wurde mit der Multiphor II (LKB Bromma) durchgeführt. Die Applikation der Proteinlösungen auf die rehydratisierten IPG-Streifen erfolgte anodisch über spezielle Auftragströge. In Anlehnung an Westermeier (1997) wurden in Vorversuchen unterschiedliche Fokussierungsvarianten getestet. Folgende Methode erwies sich als optimal: Für einen langsamen Probeneintritt wurde die Fokussierung bei 150 V; 0,6 mA und 4 W_{\max} für 1 h gestartet und schrittweise, bei Erreichen von 0,1 mA, bis auf 5.000 V erhöht und nach 40 kWh beendet. Ab einer Spannung von 1.000 V gewährleistete die Wasserkühlung und die Übersichtung der Immobilinstreifen mit Paraffin den Luftabschluss und die Wärmeableitung. Nach beendeter Fokussierung wurden die Gelstreifen zwischen zwei Lagen fusselfreiem Papier vom Paraffin befreit und bis zur Weiterverarbeitung in der zweiten Dimension bei -80 °C gelagert.

2.5.5.2.2 Zweite Dimension: SDS-PAGE

Die Trennung der Proteine entsprechend ihrer Molekulargewichte in der zweiten Dimension erfordert eine vorherige Äquilibrierung. Dabei wurde das denaturierende und reduzierende Milieu aufrechterhalten und die Proteine zur Mizellenbildung mit SDS vernetzt. Um eine mögliche Bildung von Disulfidbrücken zu verhindern, wurden die Proteine alkyliert. Die Äquilibrierung erfolgte modifiziert nach Görg (1991).

Die Immobilinstreifen wurden 15 min in Puffer 1 (1 ml 0,5 M Tris/HCl, pH-Wert 6,8; 8 M Harnstoff; 4 % (w/v) SDS; 30 % (v/v) Glycerin, 1 % (w/v) DTT ad 10 ml bidest. H₂O; Bromphenolblau) und anschließend 2 x für je 15 min in Puffer 2 (Puffer 1 unter Zugabe von 481 mg Iodacetamid) geschüttelt. Die äquilibrierten IPG-Streifen wurden in

Elektrodenpuffer luftblasenfrei auf das Sammelgel des SDS-Gels aufgelegt. Um ein gutes Trennergebnis im niederen Molekulargewichtsbereich zu erhalten, wurde das Puffersystem und die 15%igen SDS-Mini-Gele nach Schagger und Jagow (1987) gefertigt. Die Elektrophoresebedingungen sowie der verwendete Molekulargewichtsmarker entsprachen den in Kapitel 2.5.5.1 beschriebenen Angaben. Im Anschluss erfolgte entweder eine Silberfärbung des Gels (Kap. 2.5.6.2) nach Blum et al. (1987) oder der Proteintransfer (Kap. 2.5.5.3) für immunologische Nachweise.

2.5.5.2.3 Bildverarbeitung

Die silbergefärbten SDS-Polyacrylamidgele wurden im feuchten Zustand mit einem Scanner digitalisiert und die Proteinspots mit Hilfe einer Testversion der Software MELANIE 3.05g (GeneBio, Geneva Bioinformatics S. A., Genf, Schweiz) analysiert und ausgewertet.

2.5.5.3 Transfer auf NC-Membranen

Grundlage für die Durchführung serologischer Tests ist der Proteintransfer von SDS-Gelen auf Nitrozellulosemembranen (NC-Membran PROTRAN; 0,1 μm ; Schleicher und Schüll, Dassel). Als effektivste Methode erwies sich dabei das Semi-Dry-Fast-Blot-Verfahren (Biometra). Der Transferpuffer enthielt 50 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, pH-Wert 8,0; 20 % (v/v) Methanol und 0,02 % (v/v) 2-Mercaptoethanol. Nach der Elektrophorese wurden Gel, NC-Folie und Blotpapier 2 min in 4 °C kaltem Transferpuffer getränkt. Zuvor wurde die NC-Membran und das Papier auf Gelgröße geschnitten. Auf die Anode wurden drei Lagen Blotpapier und die NC-Membran übereinandergelegt, auf diese das Gel und abschließend wieder drei Lagen Blotpapier. Die Blotkammer wurde mit der Kathode verschlossen. Der Elektrotransfer erfolgte mit 5 mA pro cm^2 Gel für 25 min und bei 4 °C. Nach dem Transfer wurde der Blot in bidest. H_2O gewaschen und mit Ponceau-Rot (Kap. 2.5.6.3) zur Überprüfung des Transfers angefärbt und fixiert. Für spätere immunologische Tests wurde die Membran über Nacht bei 4 °C in Blocklösung (Kap. 2.5.7.1) inkubiert, am folgenden Tag luftgetrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Das Fixieren der transferierten Proteine auf der Blotmembran mit Glutaraldehyd, das häufig bei Proteinen im niederen Molekulargewichtsbereich angewendet wird, zeigte keinen Einfluss auf nachfolgende immunologische Nachweise und wurde folglich weggelassen.

2.5.5.4 Transfer auf PVDF-Membranen

Für eine nachfolgende Micro-Sequenzierung erfolgte der Elektrotransfer der Proteine auf Polyvinylidendifluorid-Membranen (PVDF-Membran WESTRAN; 0,2 µm; Schleicher und Schüll). Der verwendete Puffer enthielt 50 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, pH-Wert 8,0; 0,02 % (v/v) 2-Mercaptoethanol und 20 % (v/v) Methanol (gradient grade). Die Membran wurde 2 min in Methanol (gradient grade), 2 min in H_2O (gradient grade) und 10 min in Transferpuffer äquilibriert. Anschließend wurde wie in Kapitel 2.5.5.3 beschrieben verfahren. Nach Beendigung des Transfers wurde die PVDF-Membran in H_2O (gradient grade) gewaschen und mit Coomassie (Kap. 2.5.6.1) kurz angefärbt, luftgetrocknet und in Folie bei 4 °C gelagert.

2.5.6 Proteinfärbungen

2.5.6.1 Färbung mit Coomassie

In Vorbereitung auf die Micro-Sequenzanalyse wurden Proteine in SDS-Gelen und auf PVDF-Membranen mit der Coomassie-Methode gefärbt. Die Gele wurden für 30 min in der Farblösung aus 50 % (v/v) Methanol (gradient grade), 10 % (v/v) Essigsäure und 1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250 inkubiert und anschließend bis zur Sichtbarkeit der Proteinbanden entfärbt (45 % (v/v) Methanol (gradient grade), 10 % (v/v) Essigsäure und 45 % H_2O (gradient grade)).

2.5.6.2 Silberfärbung

Die Färbetechnik wurde je nach Verwendungszweck ausgewählt. Aufgrund der hohen Sensitivität (5-30 ng/Bande) wurden die SDS-Gele im Allgemeinen mit Silber nach Blum et al. (1987) angefärbt: Die Gele wurden mindestens 1 h in einer Lösung aus 50 % (v/v) Methanol und 12 % (v/v) Ethanol fixiert, danach in 50 %igem Ethanol gewaschen und 2 min in $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (40 mg/100 ml) inkubiert. Es folgte ein dreimaliger Waschschrift mit bidest. H_2O für jeweils 20 s. Anschließend wurden die Gele für 20 min in einer Lösung aus AgNO_3 (200 mg/100 ml) und 37%igem Formaldehyd (50 µl/100 ml) auf einem Schüttler imprägniert und einmal mit bidest. H_2O gespült. Entwickelt wurde mit einer Lösung aus Na_2CO_3 (6 mg/100 ml), $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (1 mg/100 ml) und 37%igem Formaldehyd (70 µl/100 ml). Nach dem abschließenden, zweimaligen Waschschrift mit bidest. H_2O wurde die Reaktion durch die Zugabe einer Lösung aus 50 % (v/v) Methanol und 12 % (v/v) Essigsäure

gestoppt. Die gefärbten Gele wurden über Nacht in Badelösung (10 % (v/v) Glycerin, 10 % (v/v) Essigsäure, 40 % (v/v) Methanol und 40 % bidest. H₂O) inkubiert und zwischen zwei Zellophanfolien getrocknet.

2.5.6.3 Färbung mit Ponceau-Rot

Die Proteinfärbung mit Ponceau-Rot beeinflusst nachfolgende immunologische Untersuchungen nicht und wurde daher für die Färbung von Nitrocellulosemembranen ausgewählt. Anhand dieser Färbung konnte die Effizienz der Blottechnik überprüft und eine Markierung der Markerproteine vorgenommen werden. Die Membran wurde 10 min in der Ponceau-Lösung (0,2 % (w/v) Ponceau S; 3 % (v/v) TCA; 97 % bidest. H₂O) geschüttelt und anschließend in bidest. H₂O bis zum Sichtbarwerden der Banden entfärbt.

2.5.7 Immunologische Methoden

2.5.7.1 Immunologische Detektion

Die primären Antikörper (AK) wurden hinsichtlich der Charakterisierung einer möglichen Stressantwort auf Schwermetalle und Hitzeschock ausgewählt.

Da Antikörper gegen pflanzliche Metallothioneine (MT, Klassifizierung nach Binz und Kägi; 1999) kommerziell nicht erhältlich waren und primäre tierische Antikörper in Vorversuchen zu unspezifischen Kreuzreaktionen führten, wurde ein gegen konservierte pflanzliche Metallothioneinsequenzen p2 (*Arabidopsis thaliana/Brassica juncea*) gerichteter Multipler-Antigen-Peptid-Antikörper (MAP-AK) synthetisiert. Folgende primäre Antikörper und deren Verdünnungen in 1 x PBS-Puffer wurden verwendet:

anti-Peptid MT p2¹ (1:50.000), anti-HSP 70² (1:5.000), anti-HSP 17³ (1:5.000) und anti-Cyclophilin 18⁴ (1:5.000).

1: anti-Peptid-AK gegen Metallothionein p2-Konsensussequenzen aus *Brassica juncea* und *Arabidopsis thaliana*; generiert in Kaninchen; Universität Halle, Institut für Biochemie der Medizinischen Fakultät, Arbeitsgruppe Dr. E. Weber.

2, 3: polyklonaler anti-HSP 70-AK/polyklonaler anti-HSP 17-AK aus *Lycopersicon peruvianum*; generiert in Kaninchen; IPB Halle, Arbeitsgruppe Dr. D. Neumann.

4: anti-Peptid-AK gegen Cyclophilin-Konsensussequenzen; generiert in Kaninchen; Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung Halle, Arbeitsgruppe Dr. G. Küllertz.

Nach erfolgreichem Elektrotransfer der Proteine auf die NC-Membran und der Anfärbung mit Ponceau-Rot wurden unspezifische Bindungsstellen über Nacht mit 1 % (w/v) Blockreagenz (Non-Fat-Dry-Milk, Bio Rad, München) in 1 x PBS und 0,1 % (v/v) Tween 20 bei 4 °C blockiert. Im Anschluss daran wurde die Membran im primären Antikörper über einen Zeitraum von 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Darauf folgten drei Waschschriffe a 5 min mit 1 x PBS-Puffer unter Zusatz von 0,1 % (v/v) Tween 20. Analog folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (biotynlierter anti-Kaninchen-Ziege-AK, 1:10.000; DAKO, Kopenhagen, Dänemark) für 1 h bei Raumtemperatur. Wiederum wurde, wie oben beschrieben, gewaschen und schließlich 15 min im dritten Antikörper (Streptavidin-HRP; 1:5.000; DAKO) geschüttelt. Nach einem letzten Waschschriff erfolgte die 5-minütige Behandlung mit dem ECL-Reagenz (SuperSignal West Dura; PIERCE, Rockford, USA). Danach wurden die Membranen sofort in Folie eingeschweißt und in einer Filmkassette fixiert. Der belichtete Röntgenfilm wurde automatisch entwickelt (Protec compact 35).

2.5.7.2 Densidometrische Auswertung der Immuno-Assays

Die densidometrische Quantifizierung der Antikörper-positiven Proteinbanden erfolgte mit der BASYS-Software von Biotec Fischer (Reiskirchen).

2.5.8 Säulenchromatographische Methoden

2.5.8.1 Probenvorbereitung

Der Aufschluss von Probenmaterial wurde in Anlehnung an Murphy et al. (1997) zur Reinigung cysteinreicher Proteine durchgeführt. Alle Arbeiten wurden unter strikt reduzierenden Bedingungen und auf Eis ausgeführt, Puffer stets frisch hergestellt und mit Helium entgast. Die Proben (50 g FM) wurden unter Zusatz von 2,5 g PVP sowie flüssigem Stickstoff homogen gemörsert, in Zentrifugenröhrchen überführt und mit Homogenisierungspuffer (20 mM Tris/HCl, pH-Wert 8,2; 0,25 M Saccharose; 5 mM DDT; 1 mM PMSF und 0,01 % (w/v) Leupeptin) aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde 15 min auf Eis inkubiert und anschließend durch ein Nylon-Flies (100 µm) filtriert. Das Filtrat wurde bei 20.000 g; 30 min und 4 °C zentrifugiert (K24 D) und der Überstand mit kaltem 96%igen Ethanol und Chloroform gefällt. Nach wiederholter Zentrifugation (5.000 g; 30 min; 4 °C; Hettich Universal 30 RF) und einer Ethanol-fällung bei -20 °C über 30 min schloss sich ein

letzter Zentrifugationsschritt (9.000 g; 4 °C, 20 min; Sorvall RC5B, Bad Homburg) an. Die Proteinpellets trockneten bei –20 °C und wurden in Resuspensionspuffer (0,2 % (w/v) Chaps/HCl; 100 mM DTT, 50 µM EDTA; pH-Wert 2,0) gelöst. Mögliche Metall-Protein-Komplexe dissoziierten während einer einstündigen Inkubation auf Eis. Nach anschließender Fällung mit –20 °C kaltem Aceton für mindestens 1 h bei –20 °C, wurde der zentrifugierte Überstand (5.000 g; 10 min; 4 °C; Hettich Universal 30 RF) bei –20 °C getrocknet. Die extrahierten Proteine wurden entsprechend der nachfolgenden Reinigungsstufe entweder in Startpuffer A (IMAC) oder B (kovalente Affinitätschromatographie) aufgenommen.

2.5.8.2 Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)

Das Prinzip dieser Chromatographie beruht auf der pH-Wert-abhängigen Chelatierung an substratimmobilisierten Metallionen durch Proteine und Peptide. In diesem Fall wurde Chelating Sepharose Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech) gekoppelt mit Imminodiessigsäure als metallbindendes Substrat und Cu(II) als Metallion gewählt. Eine Leersäule (K9/30; Amersham Pharmacia Biotech) wurde mit 4 ml der nach Herstellerangaben vorbereiteten Sepharose gefüllt, mit 3 ml 0,2 M CuCl₂-Lösung gesättigt und mit 10 ml bidest. H₂O gewaschen. Alle verwendeten Lösungen wurden mit Helium entgast und die nachfolgenden Arbeiten bei 4 °C durchgeführt. Die Flussrate betrug 0,8 ml/min, kontinuierlich wurde die Absorption bei 254 nm gemessen (Econo System; BioRad) und mittels Integrator aufgezeichnet (D-2500; Merck-Hitachi).

Nach dem Äquilibrieren mit Startpuffer A (20 mM Na₂HPO₄, pH-Wert 7,2 und 10 mM PMSF) erfolgte der Probenauftrag unter Ausnutzung der Schwerkraft. Dem anschließenden Spülen mit Waschpuffer (20 mM Na₂HPO₄, pH-Wert 7,2; 1 M NaCl und 10 mM PMSF) zur Ablösung unspezifisch gebundener Proteine folgte die Elution mit Puffer A (pH-Wert 3,5). Das Eluat wurde in Vorbereitung auf die Thiopropyl-Sepharose-Säule oder der SDS-PAGE mit –20 °C kaltem Aceton im Verhältnis 1:5 (v/v) bei –20 °C über mindestens 1 h gefällt. Die Regenerierung des Säulenmaterials wurde durch Spülen mit einer 50 mM EDTA-Lösung und nachfolgender Äquilibrierung mit Startpuffer erreicht.

2.5.8.3 Kovalente Affinitätschromatographie

Die kovalente Bindung von Thiolgruppen der mobilen Phase an reaktive 2-Thiopyridyl-disulfide des Geles (Thiopropyl Sepharose 6B; Amersham Pharmacia Biotech) unter

Bildung von Disulfidkomplexen diente der Isolierung thiolhaltiger Proteine aus *Fontinalis antipyretica*.

Wie oben bereits erwähnt, wurden auch bei diesem Reinigungsschritt alle verwendeten Lösungen mit Helium entgast und die nachfolgenden Arbeiten bei 4 °C durchgeführt. Die technischen Parameter entsprachen denen in Kapitel 2.5.8.2. Das nach Herstellerangaben vorbereitete Sepharose-Gel (1 ml) wurde in eine Leersäule vom Typ K9/15 (Amersham Pharmacia Biotech) gefüllt und mit Startpuffer B (10 mM Tris/HCl, pH-Wert 7,4; 1 mM EDTA) äquilibriert. Nach dem Auftragen der reduzierten, metallfreien Probe per Eigenfluss wurde die Säule zur Elution unspezifisch gebundener Proteine mit 100 ml Waschpuffer (10 mM Tris/HCl, pH-Wert 7,4; 0,5 M NaCl und 1 mM EDTA) gespült. Die Elution wurde in Vorversuchen optimiert und erfolgte mit 15 mM 2-Mercaptoethanol in Puffer B. Das eluierte Protein wurde mit –20 °C kaltem Aceton im Verhältnis 1:5 (v/v) bei –20 °C über mindestens 1 h gefällt. Die Regenerierung des Säulenmaterials wurde nach Herstellerangaben mittels 2,2-Dithiopyridin (pH-Wert 8,0) ausgeführt.

2.5.9 Massenspektrometrie

2.5.9.1 MALDI-TOF-MS

Die MALDI-TOF-MS-Analysen zur Massen- bzw. Sequenzbestimmung der Proteine bzw. Peptide wurden von Frau Dr. A. Schierhorn (Max-Planck-Gesellschaft, Forschungsstelle Enzymologie der Proteinfaltung, Halle/Saale) mit einem Reflectron TOF Massenspektrometer ReflexII (Daltonik) sowie von Frau Dr. E. von Röpenack-Lahay an dem Institut für Pflanzenbiochemie Halle/Saale ausgeführt. Als Matrix wurde 3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure (Sinapinsäure) (> 5 kDa) oder Cyano-4-hydroxyzimtsäure (< 5 kDa) verwendet.

2.5.9.2 LC-MS

Über die Kopplung von RP-HPLC und Elektrosprayionisations-Massenspektrometer (VG Bio-Q Triple-Quadrupol-Massenspektrometer mit Elektrospray Interface (Fison Instruments)) wurden säulenchromatographisch getrennte Proteine (Kap. 2.5.8) entsalzt, konzentriert sowie die Massen ausgewählter Fraktionen analysiert.

Die Systemoptimierung erfolgte mittels Metallothioneinstandard (MT 1,2*; Sigma,

* Metallothionein-Klassifizierung nach Nordberg et al. (1972)

Deisenhofen). Die chromatographische Trennung erfolgte über eine Vorsäule (Nucleosil-C-3, 11 x 2 mm, Macherey Nagel, Düren) und anschließend über eine Nucleosil-C-3-Säule (500-5 PPN; 125 x 2 mm, Macherey Nagel).

Als mobile Phase wurde 0,1 % (v/v) TFA in H₂O (A) und 0,1 % (v/v) TFA in ACN (B), bei einer Flussrate von 200 µl/min, in einem Gradienten wie folgt eingesetzt: 0 % B (0-1 min), 60 % B (1-30 min), 0 % B (30-35 min). Das Probenvolumen betrug 30 µl. Die Signalverläufe wurden bei 254 nm detektiert.

2.5.10 Micro-Sequenzanalyse von Proteinen/Peptiden

2.5.10.1 Alkylierung reduzierter Sulfhydrylgruppen

In Vorbereitung auf die Micro-Sequenzierung wurde eine Reduktion mit nachfolgender Alkylierung von Cysteinresten ausgesuchter Proteinfractionen der LC-MS-Analyse (Kap. 2.5.9.2) durchgeführt. Die im Stickstoffstrom getrocknete Probe wurde in 50 µl Puffer (0,25 M Tris/HCl, pH-Wert 8,5; 4 mM EDTA und 6 M Guanidinhydrochlorid) aufgenommen. Hierzu wurden 0,2 mg DTT gegeben und im Dunkeln unter Stickstoff für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2 µl Vinylpyridin (Raumtemperatur). Nach dem Mischen der Lösung wurde wie oben beschrieben inkubiert. Die Entsalzung des S-pyridylethylierten Proteins wurde mittels RP-HPLC über eine C-4-Säule (300-5; 50 x 3 mm, Macherey Nagel) durchgeführt.

Als mobile Phase wurde 0,1 % (v/v) TFA in H₂O (A) und 0,08 % (v/v) TFA in ACN (B), bei einer Flussrate von 1 ml/min, in einem Gradienten wie folgt eingesetzt: 0 % B (0-5 min), 70 % B (5-15 min), 70 % B (15-20 min), 0 % B (20-22 min). Das Probenvolumen betrug 50 µl. Die Signalverläufe wurden bei 214 nm und 254 nm detektiert, die Fraktionen manuell anhand der Absorptionsmaxima bei 214 nm gesammelt, im Stickstoffstrom getrocknet und bis zur Micro-Sequenzierung bei -20 °C gelagert.

2.5.10.2 In-Gel-Proteinverdau und Peptidelution

Zum Verdau der durch SDS-PAGE isolierten Proteine diente die Serin-Protease Trypsin (sequencing grade; Boehringer Mannheim, Mannheim). Die spezifische Spaltung der Peptidbindung erfolgt an der Carboxylgruppe von Lysin und Arginin bei einem pH-Wert von 7,5-9,0. Aus dem coomassiegefärbten SDS-Gel (Kap. 2.5.6.1) wurden die Proteinbanden mittels Skalpell scharf begrenzt ausgeschnitten, in Glasvials 3 x mit H₂O

(gradient grade) gewaschen und anschließend mechanisch zerkleinert. Dieser Gelschlamm wurde für 20 min bei 30 °C getrocknet. Nach Zugabe von 20 µl Puffer (50 mM NH₄CO₃, pH-Wert 8,0) und 1,0 µg Trypsin (in 2 µl 1 mM HCl) wurde der Verdau über Nacht im Wasserbad bei 25 °C inkubiert. Der Überstand wurde in Glasvials bei –80 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

2.5.10.3 RP-HPLC-Trennung tryptisch verdauter Proteine

Die chromatographische Trennung der Peptidspaltprodukte des In-Gel-Proteinverdau (Kap. 2.5.10.2) erfolgte aus organisatorischen Gründen mit zwei verschiedenen Techniken. Die Peptidseparation wurde von Herrn Dr. K. P. Rücknagel, Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung Halle/Saale, an einem LC-10A HPLC-System (Shimadzu) durchgeführt. Als stationäre Phase wurde eine C-3-Säule (550-5 PPN; 125 x 0,3 mm; Macherey Nagel) eingesetzt. Die mobile Phase setzte sich aus 0,09 % (v/v) TFA in H₂O (A) und 0,08 % (v/v) TFA in ACN (B) zusammen. Bei einer Säulentemperatur von 40 °C und einer Flussrate von 4 µl/min wurden die Proben (Injektionsvolumen ca. 20 µl) mit folgendem Gradienten getrennt: 0 % B (0-2 min), 60 % B (2-62 min) und 60 % B (62-70 min). Die Messung der Absorption des Eluates erfolgte mittels Photo-Dioden-Array bei 200 nm bis 350 nm. Die Peptidfraktionen wurden manuell anhand der Maxima der Absorption bei 214 nm gesammelt und im Stickstoffstrom auf etwa 30 µl eingeeengt. Bis zur Micro-Sequenzierung erfolgte die Lagerung der Peptidlösungen bei –80 °C.

Weiterhin wurden Peptidfragmente an einer HP 11000-HPLC-Anlage (Hewlett-Packard, Böblingen) chromatographisch getrennt. Eingesetzt wurde eine Vydac-C-18-Säule (5 µm, 250 x 4,6 mm) als stationäre Phase. Die mobile Phase setzte sich aus 0,1 % (v/v) TFA in H₂O (A) und 0,01 % (v/v) TFA in 70 %igem Propanol (B) zusammen. Die Säulentemperatur betrug 40 °C. Bei einer Flussrate von 0,5 ml/min wurden die Proben (50 µl Injektionsvolumen) mittels folgendem Gradienten getrennt: 0 % B (0-2 min), 100 % B (2-70 min) und 100 % B (70-75 min). Die Absorption des Eluates wurde durch ein Photo-Dioden-Array im Bereich von 200 nm bis 350 nm aufgenommen und die Peptidfraktionen manuell anhand der Maxima der Absorption bei 214 nm gesammelt. Bis zur Protein/Peptid-Sequenzierung (Micro-Sequenzanalyse) erfolgte die Lagerung bei –80 °C.

2.5.10.4 Protein/Peptid-Sequenzierung

Die N-terminale Sequenzanalyse der tryptisch verdauten Peptidfragmente mittels Edmann-Abbau wurde in Zusammenarbeit von Herrn Dr. Th. Nürnberger, IPB Halle/Saale und der TOPLAB GmbH (Martiensried) durchgeführt.

Die von Herrn Dr. K. P. Rücknagel, Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung Halle/Saale ausgeführte Protein-/Peptid-Sequenzierung erfolgte mit den Aminosäuresequenzern ABI 476A Protein Sequencer und Procise cLC Protein Sequencing System (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) nach Herstellerangaben. Die Proteinsequenzen wurden durch Nutzung von Online-Angeboten verschiedener Institute ausgewertet. Die Homologievergleiche erfolgten mit Sequenzeinträgen aus Protein- bzw. DNA-Datenbanken (SWISS-Prot, PDB, TrEMBL u.a.). Verwendet wurden dafür die Programme BLASTP 2.2.2 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; Altschul et al., 1997) und FASTA33 (<http://www.ebi.ac.uk/fasta33>; Pearson, 1990).

2.6 Qualitative und quantitative Bestimmung freier Aminosäuren

2.6.1 Extraktion

Die Extraktion der nicht proteinogenen Aminosäurefraktion (NP-Fraktion) wurde nach Hofmann et al. (1995) aus Frischmaterial, das in flüssigem Stickstoff gemörsert und sofort zu jeweils Portionen aus 5 g abgewogen wurde, durchgeführt. Über Nacht erfolgte die Extraktion in 25 ml bidest. H₂O bei 4 °C. Nach 10 min Zentrifugation bei 10.000 g (K24 D) und –2 °C wurde der Überstand durch Baumwollwatte filtriert und nochmals wie oben für 45 min zentrifugiert. Dieser Überstand wurde durch einen Glasfaserfilter filtriert. Nach der flüssig-flüssig-Extraktion mit jeweils 5 ml Chloroform wurde die wässrige Phase bei –25 °C lyophilisiert und bei –80 °C eingefroren.

2.6.2 Aminosäurederivatisierung

Für eine GC-C-IRMS-Analyse (Kap. 2.6.3) ist es aufgrund des Dipolcharakters der Aminosäuren notwendig, mittels geeigneter Derivatisierung die Flüchtigkeit der Proben zu erhöhen. In diesem Falle wurden die Aminosäuren nach Brand et al. (1994) verestert und nachfolgend acetyliert.

Das lyophilisierte Material wurde mit 1,12 mg Aminosäurestandard (Merck, Darmstadt) eingewogen und mehrmals mit Methylenchlorid im Rotavapor getrocknet. Anschließend wurden die Proben mit 10 ml einer im Eisbad frisch hergestellten Lösung aus Acetylchlorid und n-Propanol (1:4) versetzt und unter Rühren bei 110 °C 1 h im Heizblock verestert. Danach wurden die Proben abgekühlt und bei 45-50 °C im Heizblock bis zur Trockne eingeengt. Die Trifluoracetylierung erfolgte mit 300 µl TFAA über Nacht bei Raumtemperatur. Die derivatisierten Proben lagerten bis zur Analyse bei 4 °C.

2.6.3 Qualitative und quantitative Aminosäureanalyse mittels GC-C-IRMS

Die qualitative und quantitative Analyse der derivatisierten Aminosäuren wurde am Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle, Sektion Chemische Ökotoxikologie mittels GC-C-IRMS (Gas-Chromatographie-Verbrennungs-Isotopen-Verhältnis-Massenspektrometrie) nach Hofmann et al. (eingereicht) durchgeführt.

2.6.4 Qualitative und quantitative Aminosäureanalyse mittels Aminosäure-Analyzer

Die Fraktion der freien Aminosäuren wurde für diesen Versuch wie oben beschrieben extrahiert und lyophilisiert. Die Analysen erfolgten am A100 Automatic Amino Acid Analyzer (Arbeitsgruppe Aminosäureanalytik Dr. Fuchs, Knauer GmbH, Berlin).

2.7 Analytik organischer Säuren

2.7.1 Extraktion

Die Fraktion der organischen Säuren aus Moosmaterial wurde über eine Stufenextraktion nach Kleber et al. (1997) isoliert. Aus einem 70%igen Ethanolextrakt wurden mittels aufeinanderfolgende Kationen- (Dowex-50; SERVA) und Anionenaustauscher (Dowex-1; SERVA, Heidelberg) organische Säuren separiert, die im Anschluss 72 h im Wasserbad bei 40 °C eingeengt wurden. Die in 400 µl bidest. H₂O aufgenommenen Proben lagerten bis zur weiteren Analytik bei 4 °C.

2.7.2 HPLC-Analyse

Die Charakterisierung organischer Säuren mittels HPLC-Analyse (Hewlett Packard 1046A) wurde modifiziert nach Merck (Applikation 960751) durchgeführt. Als Standards wurden folgende Verbindungen (Merck) in einer Konzentration von 200 µg/ml in bidest. H₂O eingesetzt: Oxalsäure, Äpfelsäure, Zitronensäure und Weinsäure. Zur chromatographischen Trennung wurde als stationäre Phase eine Polyspher-ARAC-Säule (5 µm, 100 x 6,5 mm; Merck) und als mobile Phase 0,01 N H₂SO₄ verwendet. Das Probenvolumen betrug 20 µl. Die Separation erfolgte bei einer Säulentemperatur von 45 °C. Die Fraktionen wurden manuell anhand der Maxima der Absorption bei 206 nm gesammelt und anschließend derivatisiert.

2.7.3 Derivatisierung

Die für eine GC-MS-Analyse erforderliche Derivatisierung zur Erhöhung der Probenflüchtigkeit erfolgte nach Fiehn et al. (2000). Prinzip dieser Methode ist der Austausch des aciden Wasserstoffs gegen Trimethylsilylgruppen aus N-Methyl-N-Trimethylsilyltrifluoracetamid (MSTFA). Die HPLC-Fractionen wurden mit BaOH neutralisiert sowie bei 5.000 g (Hettich Universal 30 RF) und 20 °C zentrifugiert. Die Derivatisierung des lyophilisierten Überstandes sowie der Standardverbindungen erfolgte mit 80 µl MSTFA für 30 min bei 37 °C und nachfolgend für 2 h bei Raumtemperatur. Die Proben wurden bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.7.4 Qualitative Analyse mittels GC-MS

Die silanisierten organischen Säuren wurden in der Arbeitsgruppe Umweltchemie und Lebensmittelchemie im Institut für Analytik und Umweltchemie der Universität Halle-Wittenberg gaschromatographisch (HP 6890 Series GC System; GC-Autosampler Controller 5973 msd; 7694 Headspace Autosampler) analysiert.

2.8 Analytik phenolischer Verbindungen

2.8.1 Extraktion löslicher, phenolischer Inhaltsstoffe

Die Extraktion phenolischer Inhaltsstoffe aus Moosmaterial erfolgte modifiziert nach Strack et al. (1979). Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert. Jeweils 1,5 g FM in Zentrifugenröhrchen abgewogen und mit 300 µl 80%igem Methanol (gradient grade) homogenisiert. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der zentrifugierte Überstand (5.000 g, 15 min, Hettich Universal 30 RF) steril filtriert und bei 40 °C im Wasserbad eingengt. Für die folgenden Analysen wurden die extrahierten Proben in 150 µl 80%igem (v/v) Methanol (gradient grade) im Ultraschallbad gelöst und gegebenenfalls zentrifugiert.

2.8.2 Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes

Der Gesamtphenolgehalt wurde nach Jennings (1981) spektroskopisch ermittelt. Der Messansatz setzte sich aus 30 µl Probe, 270 µl bidest. H₂O und 500 µl Phenol-Reagenz (Folin-Coicalteau-Reagenz) zusammen. Nach 15-minütigem Schütteln bei Raumtemperatur wurde der Ansatz mit 150 µl einer Lösung aus 0,1 % (w/v) NaOH und 2 % (w/v) NaCO₃ versetzt und 30 min inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte als Sechsfachbestimmung bei 760 nm (UV/VIS 1202; Shimadzu). Die Probenkonzentration wurde anhand einer Rutin-Eichreihe im Bereich von 0,06-1,0 mM berechnet.

2.8.3 RP-HPLC-Analyse

Die Analyse der in Kapitel 2.8.1 beschriebenen Extrakte erfolgte mittels RP-HPLC (Kontron Instruments, Neufahrn). Die qualitative und quantitative Auswertung der Chromatogramme wurde mit dem Programm Kroma 3000 (Bio Tec, Basel, Schweiz) ausgeführt. Die Konzentrationen der einzelnen Verbindungen wurden anhand einer Rutin-Eichreihe im Bereich von 0,06-1,0 mM ermittelt. Vor der Injektion wurden die Proben im Verhältnis 1:15 mit 80%igem (v/v) Methanol (gradient grade) verdünnt. Als Standardsubstanzen wurden jeweils 0,25 mM folgender Verbindungen (Merck) eingesetzt: Gallussäure, 3,4-Dihydroxybenzoesäure, Vanillinsäure, 4-Hydroxybenzaldehyd, Umbelliferon, Quercetin und Zimtsäure. Die chromatographische Trennung erfolgte auf

einer Nucleosil-C-18-Säule (5 μm , 250 x 4 mm; Macherey Nagel). Die mobile Phase (pH-Wert 2,6) setzte sich aus 40 mM CH_2O_2 (A) und 0,01 % (v/v) TFA in ACN (B) zusammen, das Injektionsvolumen betrug 20 μl . Bei einer Flussrate von 0,8 ml/min wurde folgender Gradient eingesetzt: 5 % B (0-5 min), 60 % B (5-40 min). Die Identifizierung der getrennten Fraktionen wurde anhand der Retentionszeiten der eingesetzten Standards sowie der bereits vorhandenen HPLC-Software-Datenbank vorgenommen. Die Fraktionen wurden manuell anhand der maximalen Absorption bei 254 nm gesammelt und bei 4 °C gelagert.

2.8.4 LC-MS/MS-Analyse

Die Charakterisierung der HPLC-Fractionen wurde mittels LC-MS/MS (positive und negative Elektrosprayionisierung) von Herrn Dr. J. Schmidt, Arbeitsgruppe Pflanzen- und Pilzinhaltsstoffe, Institut für Pflanzenbiochemie Halle/Saale, durchgeführt. Die Aufnahme der Spektren erfolgte an einem Massenspektrometer Finnigan MA TSQ 7000. Entsprechende Proben wurden vorher im Wasserbad bei 40 °C eingeeengt und in 10 μl 80%igem (v/v) Methanol (gradient grade) gelöst.

2.8.5 Nachweis von Flavonol-Kupfer-Wechselwirkungen

Die Zuordnung der isolierten phenolischen Verbindungen in die Gruppe der Flavonole wurde spektroskopisch nach Brown et al. (1998) überprüft. Diese Methode erlaubt den Nachweis der Cu-Chelatierung über Hydroxylgruppen am B-Ring der Flavonole sowie Oxidationseffekte an den Hydroxylgruppen des B- und C-Ringes anhand von charakteristischen Absorptionsverschiebungen.

Als Standardsubstanz wurde das Flavonol Quercetin verwendet. Die 1 mM Stammlösung in 80%igem (v/v) Methanol (gradient grade) wurde als Messansatz zu 25 μM in 1 ml 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH-Wert 7,4 verdünnt. Das UV/Vis-Spektrum des Flavonols wurde im Bereich von 200-600 nm (Cary 3E, Varian, Mulgrave, Australien) aufgenommen. Die Spektren der reversiblen Cu-Chelatierung wurden nach Zugabe von 25 μM CuSO_4 und nachfolgend 50 μM EDTA wie oben beschrieben gemessen.

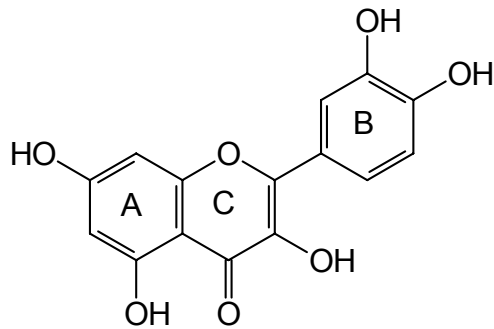


Abb. 6: Strukturformel von Quercetin.

HPLC-Fractionen der phenolischen Extrakte wurden bei 40 °C im Wasserbad eingengt, in 30 µl 80%igem (v/v) Methanol (gradient grade) gelöst und in 1 ml 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH-Wert 7,4 überführt. Das Absorptionsspektrum wurde wie oben beschrieben nach Zugabe von 25 µM CuSO₄ sowie nach Zugabe von 10-50 µM EDTA aufgenommen.

2.9 Nukleinsäureanalytik

2.9.1 Isolierung von Nukleinsäuren

2.9.1.1 Isolierung von genomischer DNA

Zur Extraktion wurden 100 mg Blattmaterial unter Zugabe von flüssigem Stickstoff fein gemörsert, anschließend mit einem vorgekühlten Spatel in 2 ml Eppendorfgefäße überführt und in 0,9 ml CTAB-Puffer (100 mM Tris/HCl, pH-Wert 8,0; 2 % N-Cetyl-N,N,N-Trimethylammoniumbromid (CTAB); 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA und 0,2 % (v/v) 2-Mercaptoethanol) suspendiert. Der Ansatz wurde für 30 min bei 60 °C unter gelegentlichem Schütteln (ca. alle 5 min) inkubiert und danach mit 1 Volumenteil Chloroformlösung (24 Volumenteile Chloroform und 1 Volumenteil Isoamylalkohol) versetzt und 2 min von Hand geschüttelt. Nach 10 minütiger Zentrifugation (18.000 g; 20 °C, Eppendorf Tischzentrifuge) wurde die obere, wässrige Phase in ein neues Tube überführt, mit 0,8 Volumenteilen Isopropanol gemischt und wie oben zentrifugiert. Nach Überschichtung des Pellets mit 500 µl kaltem 80%igem (v/v) Ethanol erfolgte nochmals eine Zentrifugation (siehe oben). Der Überstand wurde dekantiert und Ethanolreste mit einer Pipette abgezogen, so dass das trockene Pellet in bidest. H₂O aufgenommen werden konnte.

2.9.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Gewinnung von qualitativ hochwertiger Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte die Isolierung mittels QIAprep Spin Plasmid Kits (Quiagen, Hilden). Das Verfahren beruht auf dem Prinzip einer alkalischen Lyse und nachfolgender Bindung der Plasmid-DNA an eine Säulenmatrix (Anionentauscher). Ausgehend von einer Übernachtskultur (5 ml LB-Medium; 50 µg/ml Ampicillin) wurde die Plasmid-DNA nach den Herstellerangaben isoliert. Die DNA wurde mit 50 µl bidest. H₂O eluiert und bei 4 °C gelagert.

2.9.1.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Quiagen) laut den Herstellerangaben durchgeführt.

2.9.1.4 Isolierung von RNA

Die Isolierung pflanzlicher RNA erfolgte mit dem RNeasy Plant Mini Kit nach den Herstellerangaben (Quiagen). Als Ausgangsmaterial dienten jeweils 100 mg Frischmaterial. Die Proben wurden unter flüssigem Stickstoff fein gemörsert und in 450 µl Extraktionspuffer aufgenommen (8 M Guanidiniumchlorid; 20 mM MES/NaOH, pH-Wert 7,0; 20 mM EDTA). Nach kurzer Zentrifugation (20.000 g; 2 min; Hettich Universal 30 RF) wurde der Überstand auf die QIAshredder-Säule gegeben und 2 min bei 20.000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde mit 225 µl Ethanol versetzt und in der Mini-Spin-Säule bei 20.000 g für 15 s zentrifugiert. Anschließend erfolgten die Waschschriffe mit 700 µl RW1-Puffer sowie 2 x mit 500 µl RPE-Puffer. Zur Elution der gebundenen RNA diente 50 µl steriles DEPC-Wasser. Zentrifugiert wurde bei 20.000 g für 1 min. Die Proben lagerten bei –80 °C.

2.9.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über die Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm gegen bidest. Wasser (Diode Array Spectrophotometer 8452A; Hewlett Packard). Die OD₂₆₀ von 1,0 entspricht bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 µg/ml und bei RNA einer Konzentration von 40 µg/ml. Präparative Proteinkontaminationen wurden anhand des Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ überprüft. Unter optimalen Bedingungen liegt

dieser Quotient bei 1,8-1,9. Die DNA-Konzentrationen der Plasmid-Präparationen wurden durch einen Vergleich der Bandenintensitäten im Agarosegel bestimmt. Als Standard wurde pUC18 mit einer definierten Konzentration von 0,5 µg/µl eingesetzt.

2.9.3 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren

2.9.3.1 Standard-Agarosegelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte in horizontalen Elektrophoresekammern. Es wurden 1%ige (w/v) Agarosegele (1 % (w/v) in 1 x TAE-Puffer aus 40 mM Tris/HCl, pH-Wert 8,0; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA) eingesetzt. Vor dem Gießen des Geles wurde zur Anfärbung der DNA 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Als Laufpuffer diente 1 x TAE-Puffer. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 0,2 Vol. Stop-Mix (0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 0,25 % (w/v) Xylencyanol FF und 30 % (w/v) Glycerin) versetzt. Als Größenmarker wurde der pGEM-Marker von Promega (Mannheim) sowie der Marker PCR 100 bp Low (Sigma) verwendet. Die Trennung erfolgte bei 80 V für 30 min. Im Anschluss wurde die DNA unter UV-Licht am Transilluminator sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert.

2.9.3.2 Denaturierende Agarosegelelektrophorese

Als Probenvorbereitung wurde das entsprechende Volumen für 15 µg RNA mit sterilem DEPC-Wasser auf 50 µl aufgefüllt und mittels 4 M NaCl auf die Endkonzentration von 0,1 M NaCl (Gesamtvolumen) eingestellt. Nach Zugabe des 2-fachen Volumens eiskalten Ethanols erfolgte die Inkubation bei -80 °C für 20 min bzw. über Nacht. Anschließend wurden die Proben bei 15.000 g und 4 °C für 20 min (Hettich Universal 30 RF) zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 100 µl 70%igem, -20 °C kaltem Ethanol gewaschen und wie oben zentrifugiert. Das trockene RNA-Pellet wurde in 18 µl denaturierenden Probenpuffer (4,5 µl steriles DEPC-Wasser; 2,0 µl Laufpuffer (Kap. 2.9.3.1); 10,0 µl Formamid; 3,5 µl Formaldehyd; 2,5 µl Glycerin und 0,04 % (v/v) Bromphenolblau) aufgenommen. Die gelösten Proben denaturierten 10 min bei 65 °C und wurden für 2 min im Eisbad abgekühlt.

Zur elektrophoretischen Auftrennung von RNA wurden denaturierende Agarose-Horizontalgele verwendet. Die Agarose (1 %) wurde im Laufpuffer (40 mM Mops; 10 mM NaOAc; 1 mM EDTA; pH-Wert 7,0) geschmolzen und nach Abkühlen auf ca. 50 °C mit

Formaldehyd (Endkonzentration 2 % (w/v)) gemischt. Nach dem Erkalten des Gels wurde der Laufpuffer aufgefüllt und die vorbereiteten Proben aufgetragen (10 µg pro Spur). Zum Eindringen der Proben wurden 100 mA für 5 min angelegt. Die eigentliche elektrophoretische Trennung wurde bei 45 mA/60 V durchgeführt. Als Größenstandard wurde der DIG (Digoxigenin)-markierte DNA-Längenstandard III (0,12-21,2 kb; Boehringer Mannheim) eingesetzt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel für 30 min unter fließendem Wasser gewaschen und für wiederum 30 min in 0,1 M Tris, pH-Wert 9,0 mit 1 mg Ethidiumbromid unter Schütteln gefärbt. Über Nacht erfolgte das Entfärben in frischem 0,1 M Tris, pH-Wert 9,0 bei 4 °C.

2.9.4 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Restriktion des MT p2-18-Inserts aus dem Vektor pBK-CMV erfolgte mit den Endonukleasen EcoRI und XhoI. Die DNA-Lösung (5 µg DNA) wurde mit 10 µl 2 x Y⁺/Tango-Puffer und je 1 µl (5 U) EcoRI und XhoI (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) gemischt und mit sterilem, bidest. H₂O auf 20 µl Gesamtansatz gebracht. Nach 2 h Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,02 M EDTA (pH-Wert 8,0) gestoppt und die Fragmente, wie in Kapitel 2.9.3.1 beschrieben, elektrophoretisch aufgetrennt und aus dem Gel extrahiert.

2.9.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Klonierung von PCR-Produkten wurde das pGEM-T Vector System (Promega) entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Die Amplifizierung der DNA-Fragmente erfolgte direkt vor der Ligation. Es wurden mit 3 µl des jeweiligen PCR-Ansatzes das maximal bei der Ligation einsetzbare Volumen verwendet. Ligiert wurde bei Raumtemperatur für 1 Stunde oder bei 4 °C über Nacht. Gleich im Anschluss daran wurde die Transformation durchgeführt.

2.9.6 Transformation

2.9.6.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung von kompetenten *E. coli*-Zellen wurde zunächst eine Vorkultur aus 3 ml LB-Medium (Sambrook et al., 1989) unter Zusatz von 50 µg/ml Kanamycin mit kompetenten *E. coli* XL1-Blue- bzw. DH5 α -Zellen angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln angezogen. Die Hauptkultur aus 200 ml LB-Medium (50 µg/ml Kanamycin) wurde mit 2 ml der Vorkultur angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,8 angezogen. Die Kultur wurde für 15 min auf Eis abgekühlt und danach abzentrifugiert (5.000 g; 4 °C; 15 min; Hettich Universal 30 RF). Im Anschluss wurde das Pellet 2 x mit je 200 ml eiskaltem, bidest. Wasser und einmal mit 30 ml 10%igem (v/v) Glycerin gewaschen, in 0,5-0,7 ml 10%igem (v/v) Glycerin aufgenommen und in 40 µl Aliquots bei –80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.9.6.2 Transformation/Vektor pBK-CMV

Für die Herstellung einer DIG-markierten Sonde wurde vorbereitend pBK-CMV-Plasmid [MT p2-18] (Schäfer et al., 1998) in kompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen kloniert. Der Vektor pBK-CMV (4,5 kb) vermittelte eine Kanamycin-Resistenz. Das Insert (0,6 kb) wurde in die EcoRI und XhoI-Site kloniert (Dr. H. Schäfer, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Th. Rausch; Botanisches Institut der Universität Heidelberg).

Die Transformation nach Dower et al. (1988) wurde am Gene Pulser (BioRad) durchgeführt. Pro Ansatz wurden 40 µl kompetente Zellen und 2 µl Ligationsansatz (80 ng Plasmid-DNA in 10 µl bidest. H₂O) eingesetzt. Die Zellen tauten auf Eis auf, wurden mit der Plasmid-DNA versetzt und nach 1 min Inkubation auf Eis in die sterile, vorgekühlte Elektroporationsküvette mit 0,2 cm Elektrodenabstand (Peglab, Erlangen) überführt. Die eigentliche Elektroporation erfolgte bei 25 µF, 2,5 kV und 200 Ω, wodurch eine Feldstärke von 12,5 kV/cm und Zeitkonstanten um 4,0 ms erreicht wurden. Sofort nach dem Impuls wurde 1 ml LB-Medium zugegeben. Die Zellen wurden für 1 h bei 37 °C inkubiert und im Anschluss auf selektiven LB-Nährboden (50 µg/ml Kanamycin) ausplattiert.

2.9.6.3 Transformation/Vektor pGEM-T

Zur Klonierung von PCR-Produkten wurden 5 µl des zuvor abzentrifugierten Ligationsansatzes zu den –80 °C kalten, kompetenten *E. coli* DH5α-Zellen gegeben und 20 min auf Eis inkubiert (nach 10 min einmal sanft gemischt). Die Bakterien wurden exakt 45 s einem Hitzeschock bei 41 °C ausgesetzt und sofort für 2 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 950 µl LB-Medium (20 °C) wurde für 30 min bei 37 °C geschüttelt und je 100 µl auf LB/Ampicillin/X-Gal-Platten ausplattiert und bei 37 °C für 16-20 h inkubiert.

2.9.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation spezifischer Metallothioneingensequenzen aus genomischer DNA von *Fontinalis antipyretica* wurden aus Metallothionein-ähnlicher mRNA-Sequenz Oligonucleotidprimer abgeleitet und eingesetzt (eine nähere Charakterisierung der Primer ist in Kap. 2.9.8 dargestellt): Primer pMT1: *Triticum aestivum* (wali1; wheat aluminum induced; L11879; Snowden und Gardner, 1993). Die Reaktion wurde in einem Volumen von 50 µl im RoboCycler-Gradient 40 (Stratagene Cloning Systems, Heidelberg) durchgeführt.

Reaktionsansatz:

36,0 µl	steriles H ₂ O
5,0 µl	10 x PCR Reaktionspuffer (100 mM Tris/HCl, pH-Wert 8,3; 500 mM KCl; 15 mM MgCl ₂)
2,0 µl	dNTP-Mix (je 2,5 mM)
2,0 µl	Primer pMT1-1 oder MT2-1 (5 mM)
2,0 µl	Primer pMT1-2 oder MT2-2 (5 mM)
2,0 µl	genomische DNA (1:100)
<u>1,0 µl</u>	Taq DNA-Polymerase
<u>50,0 µl.</u>	

Touch down-PCR (TD-PCR)-Bedingungen:

Der Ansatz wurde zur Denaturierung der DNA 3 min bei 94 °C inkubiert. Anschließend folgten 10 Zyklen:

Denaturierung	94 °C	1 min
“Annealing“	60 °C	30 s

Synthese	72 °C	30 s	$\Delta T = -1,0 \text{ °C}$ (nach jedem Zyklus wird die Temperatur um 1 °C gesenkt)
----------	-------	------	--

sowie 25 Zyklen:

Denaturierung	94 °C	1 min
“Annealing“	50 °C	30 s
Synthese	72 °C	30 s
Nachsynthese	72 °C	5 min.

2.9.8 Kolonie-PCR

Das Vorhandensein des DNA-Fragmentes wurde mit Hilfe der Kolonie-PCR unter Verwendung von Vektor-Primern überprüft. Dazu wurden zufällig ausgewählte Kolonien mit sterilen Pipettenspitzen in je 50 µl steriles H₂O überführt, für 5 min bei 95 °C inkubiert und in der Verdünnung 1:100 in folgendem PCR-Ansatz verwendet:

Reaktionsansatz:

8,4 µl	steriles H ₂ O
2,0 µl	10 x PCR Reaktionspuffer (100 mM Tris/HCl, pH-Wert 8,3; 500 mM KCl; 15 mM MgCl ₂)
1,8 µl	dNTP-Mix (je 2,5 mM)
2,4 µl	T7-Vektor-Primer (5 mM)
2,4 µl	SP6-Vektor-Primer (5 mM)
2,0 µl	Kolonie-Lösung (1:100)
<u>1,0 µl</u>	Taq DNA-Polymerase (Johannigmeier)
<u>20,0 µl.</u>	

PCR-Bedingungen:

Die Reaktion wurde in einem Thermocycler T1 (Biometra) durchgeführt. Nach der Denaturierung der DNA für 30 s bei 94 °C folgten 35 Zyklen:

Denaturierung	94 °C	30 s
“Annealing“	55 °C	30 s
Synthese	72 °C	1 min
Nachsynthese	72 °C	5 min.

Zur Kontrolle der Amplifizierung des gewünschten Fragmentes wurden je 10 µl Reaktionsansatz mittels Standard-Agarosegelelektrophorese (Kap. 2.9.3.1) aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht ausgewertet.

Tab. 2: Verwendete Primer (Metabion, Martiensried) für TD-PCR, Kolonie-PCR und Sequenzierungsreaktion.

Primer	Orientierung	Sequenz 5'→3'	Beschreibung
NewT7	forward (22-mer)	GTAATACGACTCACTATAGGGC	hybridisiert die Basen 69-47 upstream der Insertionsstelle im Vektor pGEM-T
SP6	reverse (22-mer)	AGCTATTTAGGTGACACTATAG	hybridisiert die Basen 74-96 downstream der Insertionsstelle im Vektor pGEM-T
pMT1-1	forward (21-mer)	TCAAGCTGCGGCTGCGGCTCA	Basenposition in <i>Triticum aestivum</i> (wali1)/L11879: 89-103
pMT1-2	reverse (21-mer)	GCAGTTGCAAGGGTTGCACTT	Basenposition in <i>Triticum aestivum</i> (wali1)/L11879: 288-269

2.9.9 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte nach dem von Sanger et al. (1977) entwickelten Kettenabbruchverfahren mit dem BigDye Terminator 3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) nach Herstellerangaben und einem automatischen Sequenziergerät vom Typ ABI Prism370 DNA Sequencer (Applied Biosystems). Zur Auswertung der Sequenzdaten wurden die Computerprogramme Chromas (Version 2.2; <http://www.technelysium.com.au/chromas>) sowie Sequencer 4.01 (<http://www.genecodes.com>) verwendet. Homologievergleiche mit Datenbanksequenzen wurden mit Hilfe der Programme BLASTX (Altschul et al., 1997) und BLASTN (Altschul et al., 1990) des National Centre for Biotechnological Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) durchgeführt.

2.9.10 Nachweis spezifischer RNA

2.9.10.1 Nichtradioaktive Sondenmarkierung

Die Markierung des DNA-Fragmentes MT p2-18 erfolgte nichtradioaktiv mittels Digoxigenin (DIG) gekoppeltem dUTP über Random Primer. Hierzu wurde 1 µg Fragment in 30 µl sterilem Wasser für 10 min in kochendem Wasser denaturiert und im Eisbad auf –20 °C für 2 min abgekühlt. Nach Zugabe von 4 µl Dig-High-Prime-Lösung (Dig High Prime; Boehringer Mannheim) wurde der Ansatz für 30 s mit 10.000 g (Hettich Universal 30 RF) zentrifugiert und für 20 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch 10-minütiges Erhitzen bei 65 °C und 1-minütiger Inkubation bei –20 °C beendet. Anhand eines Dot-Blots mit Dig-markierter Kontroll-DNA (DIG Luminescent Detection Kit; Boehringer Mannheim) wurde die Effizienz der Sonde getestet.

2.9.10.2 Transfer auf Nylonmembranen

Das Gel wurde für 5 min in sterilem Wasser und ebenso wie das Blotpapier für 5 min in Transferpuffer (1,5 M NaCl; 150 mM Natriumcitrat) vorsichtig äquilibriert. Der Transfer auf die positiv geladene Nylonmembran (Boehringer Mannheim) erfolgte mit Hilfe einer Vakuumblot-Apparatur (Stratagene) für 45 min bei 75 mbar. Nach dem Transfer wurde die RNA durch doppelseitige UV-Bestrahlung (120 mJ) kovalent an die Membran gebunden (Stratalinker; Stratagene).

2.9.10.3 RNA-DNA-Hybridisierung (Northern-Hybridisierung)

Die Prehybridisierungslösung, ein SDS-Puffer bestehend aus 50 % (v/v) Formamid; 30 x SSC (0,45 M Natriumcitrat, pH-Wert 7,0 und 4,5 M NaCl); 1 M Natriumphosphat, pH-Wert 7,0; 10 % (w/v) Blocklösung (DIG-Luminescent Detection Kit; Boehringer Mannheim) sowie 10 % (w/v) N-Lauroylsarcosin, wurde vor Gebrauch 10 min auf 65 °C erhitzt und 2 min bei –20 °C abgekühlt. Die Nylonmembran wurde in einer sterilen Plastiktüte mit 40 ml Prehybridisierungslösung für 1,5 h bei 50 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Diese Lösung wurde verworfen. Anschließend erfolgte die Zugabe der zuvor 10 min bei 95 °C erhitzten DIG-RNA-Sonde in 25 ml SDS-Puffer (Hybridisierungslösung); die Membran wurde über Nacht bei 50 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Danach erfolgte das Waschen der Membran für jeweils 2 x 15 min bei Raumtemperatur in je

150 ml Waschlösung I (2 x SSC und 0,1 % (w/v) SDS) und in je 150 ml Waschlösung II (0,1 x SSC und 0,1 % (w/v) SDS) bei 50 °C im Schüttelwasserbad und anschließend die Äquilibrierung für 3 min in Waschpuffer (0,1 M Maleinsäure, pH-Wert 7,5; 0,15 M NaCl; 0,3 % (w/v) Tween). Weiterhin wurde die Membran bei Raumtemperatur in 100 ml Blocklösung (1 % (w/v) Blockreagenz in 0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl, pH-Wert 7,5; Boehringer Mannheim) für 45 min inkubiert. Die Lösung wurde abgossen und danach 40 ml des anti-DIG-Alkalische Phosphatase-Konjugats (Fab-Fragmente; Boehringer Mannheim) in einer Verdünnung von 1:10.000 zugesetzt und für weitere 30 min bei 24 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach dem 2-maligen Waschen mit je 150 ml Waschpuffer für je 15 min wurde die Membran in Detektionspuffer (0,1M Tris/HCl, pH-Wert 9,5; 0,1 M NaCl) für 2 min äquilibriert. Für die Detektion wurde die Membran 25 min mit 1 ml Chemilumineszenz-Substrat (CSPD; 1: 100 in Detektionspuffer; Boehringer Mannheim) bei 37 °C inkubiert. Die Membran wurde zwischen zwei Lagen Folie gelegt und mit einem Röntgenfilm exponiert. Für weitere Versuche lagerte die Membran in einer Plastiktüte bei 4 °C.

2.10. Statistische Auswertung

Die Bestimmungen der Standardabweichungen erfolgten mit dem Tabellenkalkulationsprogramm MS Excel 2000. Berechnungen der statistischen Signifikanzniveaus wurden mit dem Programm SIGMASTAT 2,01 durchgeführt. Zur Überprüfung der Mittelwertgleichheit verschiedener Messreihen wurde der t-Test angewendet. Der Grenzwert der Wahrscheinlichkeit P wurde auf $P < 0,05$ festgelegt (Timischl, 2000).