

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Pflanzenanzucht und Exposition mit Schwermetallen

Saatgut der Sommergerste (*Hordeum vulgare* L. cv. Steffi) wurde auf Perlite® ausgesät, mit MS-Medium gewässert und unter konstanten Wachstumsbedingungen (16 h: 21 °C, 100  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; 8 h: 16 °C, 0  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 60 % rel. Luftfeuchtigkeit) in einem Klimaschrank (KBWF 720 - WTS Binder Labortechnik GmbH, Tutlingen, Deutschland) angezogen. Für die Schwermetallbegiftung wurden zehn Tage nach Aussaat je 50 Keimlinge in Bechergläser mit Watte transferiert und mit schwermetallhaltigen Lösungen inkubiert. Die Schwermetalle wurde als folgende Salze in MS-Medium (Murashige-Skoog Medium, St. Louis, MO, USA,) gelöst:

Cadmium:  $\text{CdCl}_2$ , Kupfer:  $\text{CuCl}_2$ , Eisen:  $\text{FeSO}_4$ , Nickel:  $\text{NiCl}_2$ , Aluminium:  $\text{Al}_2(\text{SO})_4$ , Zink:  $\text{ZnCl}_2$ .

Im Falle von Eisen wurden Fe(III)-Ionen durch Titration mit gesättigter Zitronensäure chelatiert. Der daraus resultierende pH-Wert von 2,2, bedingte eine mitgeführte Wasserkontrolle, deren pH-Wert ebenfalls auf 2,2 eingestellt wurde. Dieses gilt für die Versuche in Kapitel 4.2.1.7 beschrieben.

Für die Untersuchung von Kupfer- und Cadmiumstress wurden die Pflanzen 48 h schwermetallexponiert, für alle anderen Metalle wurden 72 h Schwermetallexpositionen gewählt. Kontrollen wurden mit denselben Lösungen ohne zugesetzte Schwermetalle exponiert. Primärblätter wurden nach Schwermetallexposition in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80\text{ °C}$  gelagert.

Für die Untersuchungen zur natürlichen Blattseneszenz wurden Gerstenpflanzen in Mitscherlich-Gefäßen auf Erde angezogen, welcher mit  $4\text{ g l}^{-1}$  Chrysal-Langzeitdünger (Multicote, Paka & Chrysal, Naarden, Niederlande) versehen war und unter den oben genannten Bedingungen geführt. Primärblätter wurden 9, 21 und 39 Tage nach Keimung geerntet und unmittelbar danach in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80\text{ °C}$  gelagert.

### **3.2 Bestimmung des Chlorophyllgehaltes**

Die Bestimmung des Chlorophyllgehaltes beruhte auf einer Transmissionsmessung an intakten Blättern. Dazu wurde ein SPAD-Analyzer (Soil Plant Analysis Development, Minolta / Hydro Agri, Dülmen, Deutschland) eingesetzt, welcher die Transmission von Wellenlängen misst, die von Chlorophyllen absorbiert werden. Pro Blattfläche wird hierbei ein relativer Chlorophyllgehalt ermittelt. Kalibrierungsexperimente zeigten für Gerstenblätter, dass die relativen SPAD-Werte über einen großen Bereich linear vom Chlorophyllgehalt abhängig sind (pers. Mitteilung Prof. Dr. Humbeck).

Für jede Bestimmung wurden zehn mittlere Segmente von Gerstenblättern gemessen.

### **3.3 Bestimmung der Photosystem II Effizienz**

Die Bestimmung der Photosystem II Effizienz erfolgte nach der Methode von Humbeck et al. (1996), die auf der von Schreiber et al. (1989) entwickelten Methode der Chlorophyll-Fluoreszenz beruhen. Die Messungen wurden mittels eines Chlorophyll-Fluorometers (Mini PAM, Walz, Effeltrich, Deutschland) durchgeführt.

Hierzu wurde nach einer 20minütigen Dunkeladaptation die Grundfluoreszenz des Chlorophylls ( $F_0$ ) durch Schwachlichtimpulse ( $650\text{ nm}$ ,  $0,1\mu\text{E} / \text{m}^2\text{s}$ ) und die maximale Fluoreszenz ( $F_m$ ) durch zusätzliche Weißlichtbestrahlung ( $4000\ \mu\text{E} / \text{m}^2\text{s}$ ) bestimmt. Die Photosystem II (PS II) Effizienz ist durch das Verhältnis ( $F_v/F_m$ ) von variabler Fluoreszenz ( $F_v$ ) zu maximaler Fluoreszenz ( $F_m$ ) gegeben, wobei  $F_v = F_m - F_0$  ist (Genty et al. 1989). Für jede Bestimmung wurden zehn mittlere Segmente von Gerstenblättern gemessen.

### **3.4 RT-PCR / PCR-Reaktionen**

Alle PCR-Reaktionen wurden in einem T<sub>3</sub> Thermocycler (Biorad, München, Deutschland) oder einem Robocycler Gradient 40 (Stratagene, La Jolla, CA, USA) durchgeführt. Primer wurden mit Hilfe von Jellyfish Version 3.0 Software (Labvelocity Inc., San Francisco, CA, USA) entworfen und von der Firma Carl-Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

Als Taq-Polymerase wurde eine in einem *E. coli*-Stamm überexprimierte und mittels Säulenchromatographie gereinigte Polymerase verwendet, welche freundlicherweise von Prof. Dr. Johannigmeier zur Verfügung gestellt wurde. Als Puffer wurde ein Standardpuffer (siehe Medien, Puffer, Lösungen und Stammlösungen) verwendet. Optimierungen der Annealing-Temperatur für Primerpaare wurden mit Hilfe von genomischer DNA aus Gerste durchgeführt (siehe DNA-Isolation).

RT-PCR Reaktionen wurden mittels eines One-Step RT-PCR Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) gemäß der Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Für die cDNA-Synthese wurde jeweils 1µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die Isolierung erfolgte aus Blättern unterschiedlicher Blattentwicklung, bzw. nach Schwermetallbegiftung. Für die PCR bzw. RT-PCR-Reaktionen wurden u.a. folgende Oligonukleotide verwendet:

| PCR-Produkt                                      | Länge (bp)       | for /rev Primer  |
|--|------------------|--|
| <i>HvMT-1a</i> *                                 | 360              | for 5'-GCCGATACCAAAGCTCATCT-3'<br>rev 5'-CCGACTCCATCAGATCATCA-3'         |
| <i>HvMT-1a</i> *                                 | 225              | for 5'-ATGTCTTGCAARYTGTGAATCAAGC-3'<br>rev 5'-GCAGTTGCAAGGTCGCACTT-3'    |
| <i>ids-1</i> * (bzw. <i>ids-1</i> pre-mRNA)      | 409 <sup>1</sup> | for 5'-GGCACGAGCAGAGGTTATAGCAGAATT3'<br>rev 5'-CCAGCACCAGCCGGTTGGTC-3'   |
| <i>ids-1</i> (bzw. <i>ids-1</i> pre-mRNA) nested | 238 <sup>1</sup> | for 5'-GGATCAAGCTGCGGCTGCG-3'<br>rev 5'-GAGGCCGCCCATGGCTGC-3'            |
| <i>HvMT-2a</i> *                                 | 208              | for 5'-ATGTCTTGCTGCGGAGAAAAGTGC-3'<br>rev 5'-GCGGCAGCGCCTGCAAGT-3'       |
| <i>HvMT-2b</i> *                                 | 241              | for 5'-ATGTCGTGCTGCGGAGGAARCTGC-3'<br>rev 5'-GCAGMTGCAYGGGTTGCAG-GTGC-3' |
| <i>HvMT-3a</i>                                   | 152              | for 5'-AGGCACTCTCCGATCACAAG-3'<br>rev 5'-TCTGTTGTGTTGTTGCCGTG-3'         |
| <i>HvMT-4a</i>                                   | 400              | for 5'- AACGCCTGAAAAGATCGAGA -3'<br>rev 5'- TTGTGCGTGTGTGGAAAGT -3'      |
| <i>HvBCB</i>                                     | 866              | for 5'-CCTTCCGGTCACAAGAGCAAT- 3'<br>rev 5'-TATGTTGATCAGCTGCTGCG -3'      |

|                             |     |   |
|-----------------------------|-----|---|
| <i>HvBCB*</i><br>nested PCR | 371 | for 5'-CCTTGGACACCGACTACAGC-3'<br>rev 5'-CTTCTGCCGCTACCTCTGTC-3'  |
| <i>HvCCH</i>                | 486 | for 5'-CCAGGCTCTTCCTCTCCTCT-3'<br>rev 5'-GACAGAGTCATGTGTGGGGA'-3' |
| <i>HvCCH*</i><br>nested PCR | 250 | for 5'-GTGCTCACCAAATGGAAGG-3'<br>rev 5'-CTGCACCGGAGGTAACCC-3'     |
| PCS                         | 466 | for 5'-CATGTCCTGCTACCTCACGA-3'<br>rev 5'-ATACCACGGTGCCTGAGATA-3'  |
| PCS*                        | 199 | for 5'-GGAGGGGAAGCGGCTGTT-3'<br>rev 5'-GTTCTGCTGCCGAGAAACAT-3'    |
| $\beta$ -Actin              | 403 | for 5'-TGAGCTGCCTGATGGGCAGG-3'<br>rev 5'-GCGATTGTCCACCGGAAGTGC-3' |

Bei den mit einem \* markierten Primerpaaren handelt es sich um Primer für PCR-Produkte, welche als RNA-Sonde Digoxigenin-UTP markiert wurden. Bei einigen RT-PCR-Produkten wurde das erhaltene PCR-Fragment als „Template“ für eine „nested-PCR“ eingesetzt. Dies ist durch den Zusatz „nested PCR“ angegeben. <sup>1</sup>Das PCR-Produkt enthält ein zusätzliches 70 bp-DNA-Intron.

### 3.5 Bakterienstämme und Vektoren

Als Vektor für die Klonierung der aus der RFDD-PCR Analyse resultierenden cDNA-Fragmente wurde der "pGEM<sup>®</sup>-T Vector" benutzt. Dieses Plasmid ist Teil des von der Firma Promega (Mannheim, Deutschland) vertriebenen "Kits" zur Klonierung von PCR-Produkten "pGEM<sup>®</sup>-T Vector System I". Der Vektor trägt neben einem *E. coli*-Replikationsursprung für Multicopyplasmide, T7- und SP6-RNA Polymerase-Transkriptionsinitiationsstellen und Promotoren, welche die "Multiple cloning region" (MCR) flankieren. Die MCR befindet sich im offenen Leseraster (ORF, engl. open reading frame) des *lacZ*-Gens. *lac*-Operon-Sequenzen, einschließlich der *lac*-Repressorbindestelle sind ebenfalls vorhanden. Des weiteren

besitzt der Vektor den Replikationsursprung vom Phagen  $\phi$ 1 und ein Ampicillinresistenzgen, das eine  $\beta$ -Lactamase codiert.

Die Vektoren wurden in kompetente Zellen eines der unten erwähnten Bakterienstammes transformiert:

|                                      |               |   |
|--------------------------------------|---------------|---|
| <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ | <i>supE44</i> | $\Delta$ <i>lac</i> U169( $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15) |
|                                      | <i>hsdR17</i> | <i>recA1</i> <i>endA1 gyrA96</i>                              |
|                                      | <i>thi-1</i>  | <i>relA1</i>  |

### 3.6 DNA / RNA Größenstandards

Für die Größen- oder Längenbestimmung von DNA-Fragmenten nach Agarosegelelektrophorese wurde "GeneRuler™ " eine 100 bp "DNA-Leiter" der Firma MBI Fermentas (St-Leon-Rot, Deutschland) verwendet.

Für die Bestimmung von Transkriptlängen wurden der "RNA-Längenstandard I, Digoxigenin-markiert (0,3 bis 6,9 kb)" der Firma Roche (Mannheim, Deutschland) benutzt.

### 3.7 DNA-Isolation

Ca. 100 mg Blattmaterial wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert, in 2 ml Eppendorf-Gefäße überführt und mit 0,9 ml CTAB-Puffer resuspendiert. Diese Suspension wurde für 30 min bei 60 °C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Danach wurde ein Volumenteil (VT) Chloroform / Isoamylalkohol 24:1 zugefügt und 2 min per Hand geschüttelt. Daraufhin wurde die Lösung für 10 min bei maximaler Drehzahl in einer Tischzentrifuge bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurde die obere, wässrige Phase in ein neues 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt, mit 0,8 VT Isopropanol gemischt und wie oben beschreiben zentrifugiert. Anschließend wurde die Lösung dekantiert und das verbliebene DNA-haltige Pellet mit

500 µl eisgekühltem 80 %igen Ethanol überschichtet. Diese Suspension wurde nochmals unter den oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend dekantiert und das DNA-Pellet für 10 min bei RT getrocknet. Anschließend wurde die DNA in 100 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und die Konzentration photometrisch bei 260 nm bestimmt,

wobei  $C_{\text{DNA}} = \text{OD}_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor} [\mu\text{g} / \mu\text{l}]$  ist.

### 3.8 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial erfolgte nach der von Chergwin et al (1979) beschriebenen Methode.

Zunächst wurde das Pflanzenmaterial in einem vorgekühlten Mörser unter flüssigem Stickstoff zerrieben und in vorgekühlte 50 ml Flaschen überführt. Nachdem das Pflanzenmaterial auf ca. 0 °C aufgetaut war, wurden 15 ml Lysis-Puffer (RNA, pH 7,5) zugegeben und mit einem "IKA Ultra-Turrax<sup>®</sup> T25 basic" (IKA<sup>®</sup> Labortechnik, Staufen) bei maximaler Drehzahl (24000 rpm) für ca. 3 min zu einem homogenen Masse vermischt. Dieses Homogenat wurde daraufhin für 15 min bei 37°C und 390 rpm in einem Thermoschüttler (G24 environmental incubator shaker, New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen, Deutschland) inkubiert. Um zu starke Schaumbildung zu vermeiden, wurden kurz vor Ende dieser Inkubation 2-3 Tropfen n-Octanol zugesetzt. Danach wurden Zellwandbruchstücke und andere unlösliche Zellbestandteile bei 10 °C und 9400 g für 20 min pelletiert.

Nach Bestimmung des Volumens des Überstandes, wurde dieser in 50 ml Zentrifugenröhrchen ("Centrifuge bottles polyallomer 50ml", Beckmann Coulter Inc., Unterschleissheim-Lohhof, Deutschland ) überführt und durch die Zugabe des 0,02fachen Volumens 3 M NaAc-Puffers (pH 5,0) und des 0,75fachen Volumens 96 %igem Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt.

Das durch Zentrifugieren bei 10.000 g und 4 °C für 20 min erhaltene Pellet wurde in 12 ml TES-Puffer (pH 7,4) mit Hilfe des Ultra-Turrax<sup>®</sup>-Homogenisators bei mittlerer Drehzahl (9000 rpm) gelöst. Anschließend wurde die homogene Lösung in eine 50 ml Flasche überführt und ein 0,5faches Volumen Phenol (TE-(pH 7,8)-gesättigt), ein 0,5faches Volumen Chloroform sowie ein 0,02faches Volumen Isoamylalkohol zugesetzt. Danach wurde die Flüssigkeit für 15 min bei RT und 390 rpm in einem Thermoschüttler inkubiert und für 10 min bei RT 15500 g zentrifugiert. Die obere Phase wurde mit dem gleichen Volumen an Chloroform in eine neue 50 ml Flasche überführt und wie oben beschrieben inkubiert und zentrifugiert. Anschließend wurde das Volumen der oberen Phase bestimmt und nach Überführung in 15 ml Corex<sup>®</sup>II-Zentrifugengefäße (C-8441, LabGlass, Vineland, USA) durch Zugabe des 0,33fachen Volumens 8 M LiCl-Lösung über Nacht bei 4 °C gefällt.

Am darauf folgenden Tag wurde die RNA durch 20minütiges Zentrifugieren bei 4 °C und 10.000 g pelletiert und für ca. 10 min bei RT getrocknet. Danach wurde das Pellet in 5 ml TES-Puffer (pH 7,4) durch mehrmaliges Pipettieren und 10 minütige Inkubation in einem 65 °C warmen Schüttelwasserbad gelöst. Hiernach wurde die Gesamt-RNA durch Zugabe des 0,1fachen Volumens 4 M NaCl-Lösung und des 2,5fachen Volumens 96 %igem Ethanol für 25 min bei -80 °C gefällt.

Anschließend wurde die RNA durch 20 minütiges Zentrifugieren bei 4 °C und 15.500 g pelletiert, wiederum für ca. 10 min bei RT getrocknet und in 1 ml H<sub>2</sub>O durch Pipettieren und 10 minütiger Inkubation im 65 °C Schüttelwasserbad gelöst.

Die Bestimmung der Konzentration erfolgte photometrisch bei 260 nm,

$$\text{wobei } C_{\text{RNA}} = \text{OD}_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor } [\mu\text{g} / \mu\text{l}] \text{ ist.}$$

Der Quotient der Absorptionen von 260 nm und 280 nm lag dabei zwischen 1,8 und 2,0, was für eine hochreine RNA-Isolation spricht und keine nennenswerten Proteinverunreinigungen zeigt. Die Lagerung der RNA-Lösungen erfolgte bei -80 °C.

### 3.9 Isolierung von poly(A)<sup>+</sup>-RNA

Aus den folgenden drei Gesamt-RNA Lösungen wurde die polyadenylierte RNA aufgereinigt:

1. 900 µg Gesamt-RNA, Primärblätter, 12 d, 48 h, MS-Medium (MS)
2. 900 µg Gesamt-RNA, Primärblätter, 12 d, 48 h, 0,5 mM Cadmium, MS
3. 900 µg Gesamt-RNA, Primärblätter, 12 d, 48 h, 1,0 mM Cadmium, MS

Die Isolierung der Poly(A)<sup>+</sup>-RNA aus Gesamt-RNA erfolgte mit dem "PolyATtract<sup>®</sup> mRNA Isolation System IV" von Promega (Mannheim, Deutschland) gemäß der Vorschrift des Herstellers. Das System beinhaltet biotinylierte Oligo(dT)-Fragmente, welche zunächst mit Poly(A)<sup>+</sup>-Regionen der RNAs hybridisieren. Diese Hybride werden anschließend aufgrund der hohen Affinität zwischen Streptavidin und Biotin an Streptavidin-gekoppelte Magnetpartikel gebunden. In mehreren Waschschritten, bei welchen diese mit der Poly(A)<sup>+</sup>-RNA verbundenen Partikel mit Hilfe eines Magneten im Reaktionsgefäß zurückgehalten werden, entfernt man Poly(A)<sup>-</sup>-RNA (z.B. ribosomale oder transferRNA). Sehr geringe Salzkonzentrationen liefern Bedingungen, unter welchen die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen polyadenylierter RNA und biotinylierten oligo(dT)-Fragmenten bei RT energetisch nicht begünstigt sind. Aus diesem Grund ist eine Elution der Poly(A)<sup>+</sup>-RNA mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O möglich. Die Konzentration der Poly(A)<sup>+</sup>-RNA-Lösung kann photometrisch bei 260 nm bestimmt werden.

### 3.10 Denaturierende RNA-Agarosegelelektrophorese

Für die elektrophoretische Trennung der mRNA bzw. der Gesamt-RNA wurden denaturierende Agarose-Formaldehyd-Gele verwendet. Die Gele enthielten 1 % (w/v) "Agarose zur DNA/RNA Elektrophorese" (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 6 % (v/v) Formaldehyd und 10 % (v/v) 10x MOPS-Laufpuffer (pH 7,2).



Vor der elektrophoretischen Trennung wurden 15 µg der zu untersuchenden RNA-Probe gefällt und in 18 µl RNA-Probenpuffer aufgenommen, für 10 min bei 65 °C denaturiert und bis zum Auftragen mindestens 2 min auf Eis gestellt. Als Laufpuffer für die Elektrophorese wurde 1x MOPS verwendet.

Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde das Gel für 15 min unter fließendem Leitungswasser 15 min gespült, mit 2x SSC-Puffer (pH 7,0), der 0,1 µg ml<sup>-1</sup> Ethidiumbromid enthielt gefärbt und ebenfalls mit 2x SSC 30 min bei RT, sowie über Nacht bei 4 °C entfärbt. Anschließend wurde die Ethidiumbromid gefärbten RNA-Banden mittels UV-Licht detektiert und mittels Video-Imaging gespeichert.

### **3.11 Northern-Blotting**

Nach der elektrophoretischen Trennung der RNA in denaturierenden Agarosegelen, erfolgte der Transfer der RNA auf positiv geladene Nylonmembranen (Roche, Mannheim, Deutschland). Dieser sogenannte "Northern blot" erfolgte mit dem "PosiBlot<sup>®</sup> 30-30 Pressure Blotter and Pressure Control Station" – System (s. Bedienungsanleitung, Stratagene, La Jolla, Ca, USA) im Drucktransferverfahren innerhalb von 60-75 min, mit 10x SSC (pH 7,0) als Transferpuffer und einem Druck von ca. 75 mmHg.

Nach dem Transfer wurde die RNA durch UV-Bestrahlung mit der Membran kovalent gebunden. Die Prähybridisierung mit 20 ml High-SDS-Hybridisierungspuffer erfolgte mit Hilfe eines OV3 Hybridisierungsofens in Borosilikat-Hybridisierungsröhren (beides Whatman-Biometra<sup>®</sup>, Göttingen, Deutschland) für 1,5 h bei 50 °C. Nach dem Abgießen des Prähybridisierungspuffers wurde die Hybridisierung mit der zuvor auf 68 °C für 10 min erwärmten und für 2 min bei -20 °C abgekühlten Sonde (High-SDS-Hybridisierungspuffer mit entsprechender DIG-markierter Sonde) bei 50 °C über Nacht durchgeführt.

Unspezifisch gebundene Sondenmoleküle wurden danach mit Waschpuffer-1 bei RT für je 2x 15 min und mit Waschpuffer-2 bei 50 °C für je 2x 15 min von der Membran gewaschen.

Die Detektion der DIG-markierten Sonden wurde mit Hilfe des "DIG Luminescent Detection Kit" gemäß der Vorschrift der Hersteller (Roche, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Die Membran wurde 3min in Waschpuffer-3, danach 45 min in 1x Blocklösung (RNA) zur Absättigung freier unspezifischer Proteinbindestellen und hiernach für 30 min in Antikörperlösung (1x Blocklösung (RNA) mit 1:10000 Anti-Digoxigenin-F<sub>ab</sub>-Fragment-alkalische Phosphatase-Konjugat (Anti-DIG-AP Konjugat)) jeweils bei RT inkubiert. Nicht spezifisch an der Membran haftendes Anti-DIG-AP-Konjugat wurde mit Waschpuffer-3 bei RT für je 2x 15 min abgewaschen.

Nach dem Äquilibrieren der Membran mit 1:10 verdünntem Detektionspuffer (RNA) für 2 min bei RT wurde die Membran zwischen zwei Acetat-Folien gelegt und gleichmäßig mit 1:60 in Detektionspuffer verdünnter CSPD<sup>®</sup>-Lösung benetzt und für 20 min bei 37°C inkubiert. Die Membran wurde nach dieser Detektionsreaktion zwischen Klarsichtfolie gelegt und je nach Signalstärke für 5 min bis 24 h auf einen Röntgenfilm (Hyperfilm<sup>™</sup>ECL<sup>™</sup>, Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg, Deutschland ) aufgelegt.

### **3.12 RFDD-PCR (Restriction Fragment Differential Display – PCR)**

Mit der ursprünglich von Liang et al. (1992) publizierten Methode des "Differential display" ist es möglich, zu bestimmten Entwicklungszeitpunkten eines Organismus, Organs, Gewebes oder auch einzelner Zellen Unterschiede im Expressionsmuster einer großen Anzahl von Genen auf Transkriptebene sichtbar zu machen.

Da die Technik deutliche Grenzen, wie bevorzugte Vervielfältigung der Transkript-3'-Enden, oder nur scheinbar differentiell induzierte cDNAs, aufweist (Debouck 1995), wurde sie zur sogenannten "Restriction fragment differential display-PCR"

(RFDD-PCR) weiterentwickelt (Money et al. 1996, Matz et al. 1997, Habu et al. 1997).

Bei einer "RFDD-PCR" werden die cDNA Populationen nicht direkt per PCR vervielfältigt und anschließend detektiert, sondern zunächst mit einem Restriktionsenzym (4-Basen-Erkennungssequenz) geschnitten. An die dabei entstandenen überhängenden Enden werden Adapter angebracht, welche mit den einzusetzenden selektiven PCR-Primern hybridisieren. Diese Primer sind so gestaltet, dass für eine erfolgreiche Vervielfältigung durch PCR drei Basen ihres 3'-Endes mit drei Basen des Endes der cDNA-Fragmente hybridisieren und deshalb komplementär zu diesem sein müssen.

Die Anzahl der unter Verwendung eines selektiven Primers mittels PCR vervielfältigten, markierten und anschließend detektierten cDNA-Fragmente verringert sich dadurch um über 98 % und ermöglicht so eine sehr viel bessere Auflösung von differentiell exprimierten cDNA-Banden.

Für die Durchführung der RFDD-PCR Technik wurde der "displayPROFILE™ Kit" (Display Systems Biotech, Azigen Bioscience A/S, Kopenhagen, Dänemark) entsprechend der Vorschrift des Herstellers verwendet.

### 3.12.1 cDNA Synthese

Für die Erststrang-cDNA-Synthese wurden von den drei zuvor isolierten polyadenylierten RNA-Lösungen (siehe mRNA-Isolation) je 400 ng RNA entsprechende Volumina in einem Vakuumrotationsverdampfer (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland) vollständig eingengt und in je 15  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen.

Der folgende Erststrang-Synthese-Reaktionsansatz und wurde mit jeder der drei Proben durchgeführt:

|            |                                 |  |
|------------|---------------------------------|--|
| 15,0       | $\mu\text{l}$                   | poly(A) <sup>+</sup> -mRNA Lösung (entsprechend 400 ng RNA)                                  |
| 1,5        | $\mu\text{l}$                   | Oligo 5'-T <sub>25</sub> V (V=A,C or G) Primer (12,5 $\mu\text{M}$ )                         |
| 2,5        | $\mu\text{l}$                   | 10x cDNA Puffer 1 (500 mM Tris-HCL pH 8,3; 800 mM KCl; 100 mM MgCl <sub>2</sub> ; 40 mM DTT) |
| 5,0        | $\mu\text{l}$                   | dNTP-Mix (je 5 mM)   |
| <u>1,0</u> | <u><math>\mu\text{l}</math></u> | displayTHERMO-RT (100 U $\mu\text{l}^{-1}$ )   |
| 25,0       | $\mu\text{l}$                   |  |

Dieser Reaktionsansatz wurde für 2 h bei 42 °C im Thermocycler (RoboCycler Gradient 40, Stratagene, La Jolla, USA) inkubiert. Zu jedem Erststrang-Reaktionsansatz wurden anschließend je 50  $\mu\text{l}$  des folgenden "Zweitstrang-Synthese-Mastermixes" zugegeben:

|            |                                 |   |
|------------|---------------------------------|---|
| 22,5       | $\mu\text{l}$                   | 10x cDNA Puffer 2 (350 mM Tris-HCl pH 7,4; 40 mM MgCl <sub>2</sub> ; 10 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 30 mM DTT) |
| 7,5        | $\mu\text{l}$                   | dNTP-Mix (je 5 mM)  |
| 3,6        | $\mu\text{l}$                   | DNA Polymerase I (10 U $\mu\text{l}^{-1}$ )   |
| 2,4        | $\mu\text{l}$                   | RNase H (1 U $\mu\text{l}^{-1}$ )   |
| <u>114</u> | <u><math>\mu\text{l}</math></u> | H <sub>2</sub> O  |
| 3 x 50     | $\mu\text{l}$                   |   |

Jeder 75 µl Zweitstrang-Reaktionsansatz wurde für 2 h bei 16 °C inkubiert. Zu jedem 75 µl Reaktionsansatz wurden 125 µl H<sub>2</sub>O, 100 µl TE (pH 7,8) gesättigtes Phenol und 100 µl Chloroform gegeben, kräftig geschüttelt, 5 min bei RT und maximaler Drehzahl in einer Tischzentrifuge ("Biofuge fresco", Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland) zentrifugiert und die obere wässrige Phase vorsichtig abgenommen. Die in dieser Phase vorhandene cDNA wurde durch Zugabe eines 0,1fachen Volumens 3 M NaAc-Puffer (pH 5,0) sowie eines doppelten Volumens 96 %igem Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt.

Anschließend wurde die cDNA durch Zentrifugieren bei 4 °C und maximaler Drehzahl für 20 min in der Tischzentrifuge pelletiert, mit 50 µl 70 %igem Ethanol gewaschen, 15 min bei RT getrocknet und in 20 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Zur Kontrolle der erfolgreichen cDNA Synthese wurden jeweils 10 µl der cDNA-Lösung mittels 1,5 %iger Agarosegel-(TAE)-Elektrophorese getrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht als schwach diffuse Bande von 100-2000 bp detektiert.

### 3.12.2 Template Herstellung

Die verbliebenen 10 µl cDNA Lösung wurden bei folgender Endonuklease-Restriktion eingesetzt:

|            |           |  |
|------------|-----------|--|
| 2,0        | µl        | 10x displayPROFILE Puffer (100 mM Tris-Acetat pH 7,5; 100 mM Magnesiumacetat; 500 mM Kaliumacetat) |
| 10,0       | µl        | cDNA Lösung  |
| 7,5        | µl        | H <sub>2</sub> O   |
| <u>0,5</u> | <u>µl</u> | <i>TaqI</i> Restriktionsenzyme (10 U µl <sup>-1</sup> )  |
| 20,0       | µl        |  |

Diese 20 µl Reaktionsansätze wurden für 2 h bei 65 °C in einem Thermocycler inkubiert.

Für die Adapterligation wurde folgender "Mastermix" angesetzt und je 7,5 µl davon zu jedem Restriktionsansatz hinzugefügt.

(siehe nächste Seite)

## Material und Methoden

---

|            |           |                                       |
|------------|-----------|---------------------------------------|
| 2,25       | μl        | 10x displayPROFILE Puffer             |
| 2,25       | μl        | Adapter Mix (15 μM)                   |
| 3,75       | μl        | ATP (10 mM)                           |
| 13,35      | μl        | H <sub>2</sub> O                      |
| <u>0,9</u> | <u>μl</u> | T4 DNA Ligase (1 U μl <sup>-1</sup> ) |
| 3 x 7,5    | μl        |                                       |

Die Ligationsansätze (27,5 μl Endvolumen) wurden für 3 h bei 37 °C in einem Thermocycler inkubiert und anschließend bei -20 °C gelagert. Zur Kontrolle von Restriktionsverdauung und Ligation wurde folgende PCR durchgeführt:

|            |           |   |
|------------|-----------|---|
| 8,7        | μl        | H <sub>2</sub> O  |
| 2,0        | μl        | displayTAQ FL 10x Reaktionspuffer (100 mM Tris-HCl pH 8,3;<br>500 mM KCl; 15 mM MgCl <sub>2</sub> ) |
| 0,2        | μl        | cDNA-Fragmente (Ligationsansatz)  |
| 0,8        | μl        | dNTP-Mix (je 5 mM)  |
| 8,0        | μl        | Kontrollprimer (1 μM)   |
| <u>0,3</u> | <u>μl</u> | displayTAQ FL (5 U μl <sup>-1</sup> )   |
| 20         | μl        |   |

|                  |       |      |                             |
|------------------|-------|------|-----------------------------|
| PCR-Bedingungen: | 94 °C | 30s  | Denaturieren                |
| 30 Zyklen:       | 94 °C | 30s  | Denaturieren                |
|                  | 55 °C | 30s  | Annealing                   |
|                  | 72 °C | 1min | Synthese, 5min Nachsynthese |

Zur Überprüfung der cDNA Restriktion und Adapterligation wurden 10 μl des PCR Ansatzes mittels 1,5 %iger Agarosegel-(TAE)-Elektrophorese getrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht als diffuse Bande im Bereich von 50 bp bis 1000 bp detektiert.

### 3.12.3 <sup>33</sup>P-Endmarkierung, Vervielfältigung der cDNA-Fragmente und Detektion

Die Markierung des "0-extension Primers" erfolgte in folgendem einen PCR-Ansatz:

|             |           |  |
|-------------|-----------|--|
| 0,28        | μl        | H <sub>2</sub> O   |
| 0,10        | μl        | 10x displayPROFILE Puffer  |
| 0,40        | μl        | "0-extension Primer" (10 μM)                                       |
| 0,20        | μl        | [γ <sup>33</sup> P]-ATP (3000 Ci mmol <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup> |
| <u>0,02</u> | <u>μl</u> | T4 Polynukleotidkinase (5 U μl <sup>-1</sup> )                     |
| 1,00        | μl        | x Anzahl der durchzuführenden Polymerasekettenreaktionen           |

Die Markierungsreaktion wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. Mit dem markierten "0-extension" Primer, je zwei selektiven Primern (Eu-8 und EU-10) und den drei verschiedenen cDNA-Fragment-Lösungen (Kontrolle, 0,5 mM Cadmium; 1,0 mM Cadmium) wurden insgesamt 6 verschiedene PCR-Ansätze nach folgendem Schema angesetzt:

|            |           |   |
|------------|-----------|---|
| 11,6       | μl        | H <sub>2</sub> O  |
| 2,0        | μl        | displayTAQ FL 10x Reaktionspuffer                                 |
| 0,8        | μl        | dNTP-Mix (je 5 mM)  |
| 1,0        | μl        | markierter "0-extension" Primer (4 μM)                            |
| 4,0        | μl        | displayPROBE Primer (selektive Primer Eu-1, Eu-9 oder Eu16, 1 μM) |
| 0,3        | μl        | cDNA-Fragmente (Ligationsansatz))                                 |
| <u>0,3</u> | <u>μl</u> | displayTAQ FL (5 U μl <sup>-1</sup> )                             |
| 20         | μl        |   |

---

<sup>1</sup> Zur radioaktiven Markierung von Oligonukleotiden wurde [γ<sup>33</sup>P]-ATP (3000 Ci mmol<sup>-1</sup>) der Firma Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH (Freiburg, Deutschland) benutzt.

"Touch down"-PCR Bedingungen:

|            |                                       |      |                             |   |
|------------|---------------------------------------|------|-----------------------------|---|
|            | 94 °C                                 | 30s  | Denaturieren                |   |
| 10 Zyklen: | 94 °C                                 | 30s  | Denaturieren                |   |
|            | 60 °C                                 | 30s  | $\Delta T = -0,5\text{ °C}$ | "Annealing" (nach jedem Zyklus wird die |
|            | Annealingtemperatur um 0,5°C gesenkt) |      |                             |   |
|            | 72 °C                                 | 1min | Synthese                    |   |
| 25 Zyklen: | 94 °C                                 | 30s  | Denaturieren                |   |
|            | 55 °C                                 | 30s  | Annealing                   |   |
|            | 72 °C                                 | 1min | Synthese, 5min Nachsynthese |   |

Nach der PCR wurde jeder Ansatz mit 15  $\mu\text{l}$  Ladepuffer (95 % Formamid (v/v), 20 mM EDTA, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 0,05 % (w/v) Xylencyanol FF) gemischt, für 5 min bei 85 °C erhitzt, unmittelbar danach auf Eis transferiert und anschließend je 2x 3  $\mu\text{l}$  auf ein 8 % Harnstoff Polyacrylamid-Sequenziergel "CastAway™ Precast Sequencing System" von Stratagene (La Jolla, USA) aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel getrocknet und für ca. 20- 24 h auf einen Röntgenfilm aufgelegt (BIOMAX™MR, Eastman KODAK Company, Rochester, USA).

Der belichtete Film wurde nach Entwicklung, Fixierung und Trocknung in exakter Position unter die Glasplatte, auf der sich das getrocknete Gel befand, gelegt. Differentiell exprimierte cDNA Fragmente wurden mit Rasierklingschnitten eng begrenzt, mit 20  $\mu\text{l}$  1x TE-Puffer (pH 8,0) rehydratisiert, mit Nadel und Lanzettnadel von der Glasplatte entfernt und in 40  $\mu\text{l}$  1x TE-Puffer (pH 8,0) überführt.

Anschließend wurde das Gelstück 4 h bei 80 °C gelöst. Die so eluierten cDNA-Fragmente wurden mit folgender PCR vervielfältigt:

|      |               |  |
|------|---------------|--|
| 20,0 | $\mu\text{l}$ | H <sub>2</sub> O   |
| 4,0  | $\mu\text{l}$ | displayTAQ FL 10x Reaktionspuffer                              |
| 1,6  | $\mu\text{l}$ | dNTP-Mix (je 5 mM)   |
| 0,8  | $\mu\text{l}$ | "0-extension" Primer (10 $\mu\text{M}$ ) (siehe nächste Seite) |



|            |           |  |
|------------|-----------|--|
| 8,0        | μl        | displayPROBE Primer (der RFDD-PCR entsprechender selektiver Primer, Eu-1, Eu-9 oder Eu-16, 1 μM) |
| 5,0        | μl        | Lösung mit dem eluierten cDNA-Fragment   |
| <u>0,6</u> | <u>μl</u> | displayTAQ FL (5 U μl <sup>-1</sup> )  |
| 40,0       | μl        |  |

|                  |            |       |              |                             |
|------------------|------------|-------|--------------|-----------------------------|
| PCR-Bedingungen: | 94 °C      | 30s   | Denaturieren |                             |
|                  | 35 Zyklen: | 94° C | 30s          | Denaturieren                |
|                  |            | 55° C | 30s          | Annealing                   |
|                  |            | 72° C | 1min         | Synthese, 5min Nachsynthese |

### 3.12.4 Herstellung von cDNA-Sonden

Die durch RFDD-PCR isolierten cDNA-Fragmente wurden mit Hilfe von "DIG DNA Labeling Mix, 10 x conc." (Roche) in folgender PCR markiert.

|                        |           |   |
|------------------------|-----------|---|
| 19,8                   | μl        | H <sub>2</sub> O  |
| 4,0                    | μl        | 10x PCR Reaktionspuffer (100 mM Tris-HCl pH 8,3; 500 mM KCl; 15 mM MgCl <sub>2</sub> )                      |
| 2,4                    | μl        | dNTP-Mix (je 2,5mM)   |
| - siehe nächste Seite- |           |   |
| 2,0                    | μl        | "DIG DNA labeling Mix, 10x conc." (je 1 mM dATP, dGTP und dCTP, sowie 0,65 mM dTTP und 0,35 mM DIG-11-dUTP) |
| 0,8                    | μl        | "0-extension" Primer (1 μM)   |
| 8,0                    | μl        | displayPROBE Primer (entsprechend Eu-8 oder Eu10)   |
| 1,0                    | μl        | cDNA-Fragment Lösung (entweder Reamplifikationsansatz oder geeignete Verdünnung von Kolonie-PCR-Ansätzen)   |
| <u>2,0</u>             | <u>μl</u> | Johanningmeier <i>Taq</i> DNA Polymerase  |
| 40                     | μl        |   |

Es wurden die gleichen PCR-Bedingungen wie bei der Vervielfältigung der cDNA-Fragmente nach der Isolierung aus dem RFDD-PCR-Gel verwendet. Mindestens 2 x 15 μl jedes PCR-Ansatzes wurden mit einer 1,2 % Agarosegel-(TAE)-Elektrophorese getrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt, unter UV-Licht die

markierten Sonden ausgeschnitten und aus dem Gel eluiert. Die so hergestellten und gereinigten cDNA-Sonden wurden vollständig in 30 ml High-SDS-Hybridisierungspuffer gelöst.

### **3.13 DNA-Agarosegelelektrophorese**

Zur größenabhängigen Trennung von DNA-Fragmenten diente eine horizontale Agarosegelelektrophorese. DNA-Gele wurden mit 1,2-1,5 %iger (w/v) "Agarose zur DNA/RNA Elektrophorese" (Roth, Karlsruhe, Deutschland) in 1x TAE-Puffer (pH 8,0) gegossen. Nach Abkühlen des Gels auf ca. 60 °C wurden 3 µl / 100 ml Ethidiumbromid zugefügt. Die DNA-Proben wurden mit 6x DNA-Proben-Ladepuffer versehen und H<sub>2</sub>O auf das jeweilige Ladevolumen aufgefüllt. Als Laufpuffer wurde 1x TAE-Puffer (pH 8,0) verwendet. Ein 100 bp DNA-Leiter (MBI Fermentas, St-Leon-Rot, Deutschland) diente als DNA-Größenstandard.

### **3.14 Reinigung von DNA aus Agarosegelen**

Zur Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das "QIAquick Gel Extraktion Kit" von QIAGEN gemäß der Vorschrift des Herstellers verwendet.

### **3.15 Ligation von DNA-Fragmenten**

Für die Klonierung von PCR-Produkten wurde das "pGEM<sup>®</sup>-T Vector System" der Firma Promega (Mannheim, Deutschland) gemäß der Vorschrift des Herstellers verwendet. Die Vervielfältigung der zu klonierenden bei der RFDD-PCR isolierten cDNA-Fragmente erfolgte mittels PCR. Eingesetzt wurden ca. 100 ng PCR-Amplifikat, wobei ggf. in H<sub>2</sub>O eluierte PCR-Fragmente vor der Ligation mit Hilfe

eines Vakuumrotationsverdampfer (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland) aufkonzentriert wurden.

### **3.16 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen und Transformation von Vektoren**

Zur Herstellung von transformations-kompetenten *E. coli* DH5 $\alpha$  Zellen wurde die Rubidiumchlorid-Methode verwendet. 2 ml einer Über-Nach-Kultur des *E. coli* DH5 $\alpha$  Stammes wurden in 100 ml LB-Medium überführt und solange bei 37 °C und 170 rpm in einem Thermoschüttler (INNOVA™ 4000 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen) inkubiert, bis eine OD<sub>590nm</sub> = 0,6 erreicht war. Die Flüssigkultur wurde in ein geeignetes Zentrifugengefäß überführt, für 15 min in einem Eisbad abgekühlt und anschließend durch Zentrifugieren bei 4.000 g und 4 °C für 5 min pelletiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes, wurde das Pellet vorsichtig mit dem 0,4fachen Volumen (der ursprünglichen Flüssigkultur) an eiskaltem TfbI-Puffer resuspendiert, für 10 min in einem Eisbad abgekühlt und die Zellen abermals durch Zentrifugieren bei 4.000 g und 4 °C für 5 min pelletiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wurde das Pellet vorsichtig mit dem 0,04fachen Volumen an eiskaltem TfbII-Puffer resuspendiert und für 20 min in einem Eisbad inkubiert. Nachfolgend wurde der Ansatz auf Eis in 1,5 ml Schraubverschluss-Reaktionsgefäße zu je 150  $\mu$ l aliquotiert. Die Aliquots wurde unmittelbar danach in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Transformation bei -80 °C gelagert.

Zur Transformation der kompetenten Zellen wurde pro 150  $\mu$ l Aliquot 5  $\mu$ l Ligationsansatz hinzugefügt und auf Eis für 20 min inkubiert, wobei nach 10 min der Transformationsansatz einmal vorsichtig gemischt wurde. Im Anschluss daran wurde der Ansatz 1 min bei 41 °C erwärmt, danach für 2 min auf Eis abgekühlt und für 30 min in 950 $\mu$ l LB-Medium bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden je 150  $\mu$ l auf LB/Amp/X-Gal-Platten ausplattiert und für 16-20 h bei 37 °C inkubiert.

### 3.17 Kolonie-PCR

Da nach der Transformation von *E. coli* DH5  $\alpha$  mit dem verwendeten pGEM<sup>®</sup>-T Vektor die wachsenden Bakterienklonien auf den LB/Amp/X-Gal-IPTG-Platten kein "Blau-Weiss-Screening" möglich war<sup>2</sup> enthalten mit Sicherheit einen Vektor. Der verwendete Vektor pGEM<sup>®</sup>-T trägt im Gegensatz zum *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  ein Ampicillinresistenzgen, welches für die Vermehrung der Bakterien auf dem Ampicillin-selektiv-Medium essentiell ist. Um zu klären, welche der auf den Platten sichtbaren Kolonien einen Vektor mit cDNA-Fragment besitzt, konnte das "Blau-Weiss-Screening" nicht herangezogen werden. Aus diesem Grund wurden Kolonie-PCR Reaktionen durchgeführt. Es wurden i.d.R. fünf Kolonien von den Platten entnommen und in je 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O überführt. Die Bakterienlösung wurde für 5min bei 95 °C inkubiert und in hundertfacher Verdünnung als Template in dem unten aufgeführten PCR-Ansatz verwendet. Als Primer wurden die vektorspezifischen Primer NewT7 und SP6 verwendet, welche eine sehr viel besser Amplifikation der cDNA-Inserts ermöglichten, als die zuvor verwendeten Eu-Primer. NewT7 hybridisiert 69-47 Basen "upstream" und SP6 74-96 Basen "downstream" der Insertionsstelle des Vektors pGEM<sup>®</sup>-T. Das daraus resultierende PCR-Produkt besteht damit aus flankierenden Vektoranteil (130 bp) und dem cDNA-Insert.

|      |         |  |
|------|---------|--|
| 16,7 | $\mu$ l | H <sub>2</sub> O   |
| 4,0  | $\mu$ l | 10x PCR Reaktionspuffer (100 mM Tris-HCl pH 8,3; 500 mM KCl; 15 mM MgCl <sub>2</sub> ) |
| 3,5  | $\mu$ l | dNTP-Mix (je 2,5 mM)   |
| 1,0  | $\mu$ l | NewT7-Primer (1 $\mu$ M)   |
| 1,0  | $\mu$ l | SP6-Primer (1 $\mu$ M)   |
| 5,0  | $\mu$ l | Kolonie Lösung (1:100 verdünnt)  |
| 2,0  | $\mu$ l | Johanningmeier <i>Taq</i> DNA Polymerase   |
| 40   | $\mu$ l |  |

---

<sup>2</sup> Unabhängig von der Zugabe des Induktors IPTG, akkumulierten alle Kolonien den Farbstoff X (5-Bromo-4-chloro-3-Indol) und nahmen so die blaue Farbe an. Eine Erklärung hierfür könnte die geringe Länge der inserierten cDNA-Fragmente sein (mit wenigen oder keinen STOP-Codons), welche ins *lacZ*-Gen des Vektors eingebracht wurden und es so trotz zusätzlicher Aminosäuren im Genprodukt ( $\alpha$ -UE der  $\beta$ -Galactosidase) ein zur  $\alpha$ -Komplementation befähigtes Protein entstehen konnte.

Es wurden die gleichen PCR-Bedingungen wie bei der Vervielfältigung der aus dem RFDD-PCR-Gel isolierten cDNA-Fragmente verwendet. Von jeder PCR-Reaktion wurden 10 µl mit einer 1,5 % Agarosegel-(TAE)-Elektrophorese getrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht detektiert. PCR-Produkte mit einer Größe > 130 bp wurden aus dem Gel eluiert und Sequenziert. Nach der Sequenzierung wurden die cDNA-Fragmente für "Northern" Analysen zu Sonden markiert.

### **3.18 Herstellung von *E. coli*-Gefrierkulturen**

Flüssige *E. coli* LB/Amp (Amp /Tet) ÜNK wurden in 5ml "Cryo-Röhrchen" mit Außengewinde und Silikondichtung (Roth, Karlsruhe, Deutschland) wurden mit 15 % (v/v) sterilem 99,5 %igen Glycerin vermischt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

### **3.19 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli***

Plasmide aus den *E. coli* Transformanden wurden mit dem "QIAprep Spin Miniprep Kit" (QIAGEN, San Francisco, CA, USA) gemäß der Vorschrift des Herstellers isoliert.

### **3.20 DNA-Sequenzierung**

Alle PCR-Produkte wurden nach dem von Sanger et al. (1977) entwickelten Kettenabbruchverfahren mit dem "BigDye Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit" von Applied Biosystems (s. Bedienungsanleitung des Herstellers) und einem automatischen Sequenziergerät vom Typ ABI Prism™ 370 DNA-Sequencer (Applied Biosystems) sequenziert.

Für die Sequenzierreaktionen wurden folgende Primer verwendet:

NewT7 (for): 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'

SP6 (rev): 5'-AGCTATTTAGGTGACACTATAG-3'

### **3.21 Protein-Isolation**

Die Isolation cysteinreicher Proteine erfolgte in Anlehnung nach der Vorschrift von Murphy et al. (1997). Je 1,5 g Blattmaterial wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert und mit einer Spatelspitze PVP versetzt. Das Homogenat wurde in Zentrifugenröhrchen überführt und mit Homogemisierungspuffer versetzt. Die nachfolgende Inkubation erfolgte für 15 min unter gelegentlichem Rühren bei 4 °C und unter Lichtausschluß. Anschließend wurde die Suspension durch mehrere Lagen Zellstoff filtriert und für 30 min bei 20.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Endkonzentration von 50 % Aceton verdünnt und die Suspension für 20 min bei 10.000 g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand auf eine Endkonzentration von 80 % Aceton verdünnt und die Proteine dieser Fraktion für 60 min bei -20 °C gefällt.

Das gefällte Protein wurde nachfolgend für 20 min bei 10.000 g und 4 °C abzentrifugiert, getrocknet und in 500 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. Der quantitative Nachweis der Proteinmenge erfolgte durch Messung der Extinktion bei 595 nm nach Zugabe von Proteinreagenz der Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland) gemäß der Vorschrift des Herstellers.

Die in H<sub>2</sub>O gelösten Proteine wurden nach Bestimmung der Konzentration auf eine Endkonzentration von 1 µg/µl Protein /H<sub>2</sub>O verdünnt und bei -20 °C gelagert.

### **3.22 SEC (Size-Exclusion-Chromatography)**

Die Eppendorfgläser mit den isolierten, in Wasser gelösten Proteinproben (siehe Kapitel 2.21) wurden vor der chromatographischen Trennung in einer Tischzentrifuge bei maximaler Drehzahl für 30 s zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile aus dem Überstand zu pelletieren. Zur Trennung wurde eine Superdex 75, 30/10 HR Säule (Amersham

Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) und eine HPLC (LaChrom System, Merck-Hitachi) verwendet (Pumpe: L-7420, Fluoreszenz-Detektor L-7480, Dioden-Array-Detektor L-7450, Interface L-7000). Appliziert wurden 50 µl der Proteinsuspension, entsprechend 50 µg Protein. Als Laufmittel wurde ein 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  pH 8,5 Puffer verwendet, die Flussrate betrug 0,4 ml/min.

Als Standard wurde ein kommerzielles, cadmiumhaltiges Metallothionein aus Kaninchenleber unter den gleichen Bedingungen getrennt (MT-2, Lot 80k7013, 4,5 % Cd-Gehalt, Sigma, St.Louis, MO, USA). Die Detektion erfolgte bei 254 nm, dem Absorptionsmaximum der Cadmiumsulfidbindung, sowie bei dem Absorptionsmaximum von aromatischen Aminosäuren bei 280 nm. Die getrennten Proteinproben wurden in 1,6 ml Fraktionen gesammelt.

### **3.23 GF-AAS (Graphit-Furnace-Atomic-Absorbance-Spectroscopy)**

Der Cadmiumgehalt der mittels SEC getrennten Proteine wurde mittels GF-AAS (Analyst 800, Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA) nach der von El Gazhie et al. (2004) beschriebenen Methode ermittelt. Die Bestimmung der Cadmiumgehalte beruht auf dem Mittelwert von drei Analysen. Zuvor wurden Werte für eine Eichgerade mit  $\text{CdCl}_2$ -Konzentrationen zwischen 0-100 µg /L in 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  ermittelt.

### **3.24 CZE (Capillary-Zone-Electrophoresis)**

Die mittels Gelfiltration (SEC) aufgetrennten Proteine wurden mit 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  pH 8,5 eluiert und in 1,6 ml Fraktionen gesammelt. Die Fraktion mit der Retentionszeit 39-43 min wurde gefriergetrocknet und in 100 µl  $\text{H}_2\text{O}$  resuspendiert. Die darin enthaltenen Proteine wurden mittels CZE (Hewlett Packard 3D CE) nach der von Virtanen und Bordin (1998) für die Trennung von Metallothionein-Isoformen beschriebenen Methode elektrophoretisch aufgetrennt und die Absorptionen mittels Dioden-Array Detektor (DAAD) analysiert.

### CE -Bedingungen:

|            |                                 |
|------------|---------------------------------|
| Kapillare: | FS (Länge <sub>eff</sub> 58cm)  |
| Spannung:  | 15 kV /20°C, positive Polarität |
| Puffer:    | 100 mM MOPS pH 8,0              |
| Injektion: | 50 mbar x 5sec                  |

### **3.25 ESI-MS (Electrospray-Ionisation-Mass-Spectrometry)**

Die Aufnahme der ESI-MS Spektren der thiolhaltigen Peptide erfolgte mittels ESQUIRE-LC Ionentrap-Spektrometer mit ESI Quelle (Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland). Die Proben wurden mit einer Kolbenpumpe (Cole-Parmer Instrument Company, Bunker Court Vernon Hills, IL, USA) mit einer Flussrate von 3  $\mu\text{l min}^{-1}$  injiziert.

### **3.26 Phytochelatine: Isolation, Derivatisierung und Nachweis**

Thiolhaltige Peptide, zu denen Glutathion und die Phytochelatine gehören, wurden nach der von Grill et al. (1991) beschriebenen Methode extrahiert. Dazu wurden 100-200 mg Blattmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert und in einem Verhältnis von 1:2 mit 1 N NaOH, welcher zuvor 1 mg  $\text{NaBH}_4 \text{ ml}^{-1}$  NaOH zugesetzt wurde, aufgenommen. Diese Suspension wurde homogenisiert und für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Homogenat für 10 min bei 11.000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand mit 3,6 N HCl (70  $\mu\text{l}$  /250 $\mu\text{l}$  Überstand) auf pH 2 angesäuert. Nach einer 15 min Inkubation auf Eis und nachfolgender Zentrifugation für 5 min bei 11.000 g und 4 °C wurde der Überstand für die Bestimmung der Phytochelatine unmittelbar danach verwendet.

Der analytische Nachweis der Phytochelatine erfolgte nach der Methode von Grill et al. (1991) mittels Reversed Phase HPLC (RP-HPLC) und Online-Nachsäulenderivatisierung mit 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure(DTNB). Bei der Reaktion von DTNB mit Thiolgruppen kommt es zur Freisetzung von TNB (5-Thio-2-nitrobenzoesäure), dessen spezifische Absorption bei 410 nm detektiert werden kann (Ellman 1959).



### HPLC-Bedingungen:

|               |   |  |
|---------------|---|--|
| Säule:        |   | C-18 (SuperPac PEP S, Pharmacia), 5 $\mu\text{m}$ , 4x 250 mm        |
| mobile Phase: | A | H <sub>2</sub> O, pH 3 mit TFA                                       |
|               | B | ACN  |
| Gradient:     |   | 2-20 % B in A in 20 min;<br>20,1-25 min 20 % B;<br>25,1-30 min 2 % B |
| Fluss:        |   | 1 ml min <sup>-1</sup>   |

### Nachsäulenderivatisierung:

|                    |  |
|--------------------|--|
| DTNB:              | 300 $\mu\text{M}$ in 500 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 8,0 |
| Fluss:             | 0,4 ml min <sup>-1</sup>   |
| Reaktionsschleife: | 1 ml   |
| Detektion:         | 410 nm   |

### **3.27 Tocopherol-Bestimmung**

Die Bestimmung von  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tocopherol aus 12 Tage alten Primärblättern nach 48 h Exposition der Pflanzen mit 1 mM Kupfer- bzw. Cadmiumchlorid haltigen Lösugen (MS-Medium) sowie einer mitgeführten Kontrolle (MS-Medium) wurde freundlicher Weise in Kooperation der AG Prof. K. Krupinska, Botanisches Institut, Christian-Albrechts-Universität durchgeführt.

Die Extraktion und Nachweis der Tocopherole erfolgte wie in Falk et al. (2003) beschrieben. Dabei wurden jeweils 100-200 mg Blattmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert und in einem zweifachen Volumen an *n*-Heptan/2-Propanol (99,5+0,5) aufgenommen. Die Suspension wurde für 24 h bei -20 °C inkubiert für 20 min bei 15.000 g und 4 °C zentrifugiert. Je 20  $\mu\text{l}$  des Überstandes wurden für die Tocopherol-Bestimmung verwendet. Tocopherolgehalte wurden mittels Fluoreszenzdetektor (RF10AXL, Shimadzu-Deutschland, Duisburg, D) detektiert. Zur Kalibrierung des Systems wurden kommerziell erworbene Standards verwendet (Merck, Darmstadt, Deutschland). Die erhaltenen Werte beruhen auf drei unabhängigen Extraktionen aus jeweils 50 Primärblättern.

### HPLC-Bedingungen:

|               |   |
|---------------|---|
| Säule:        | LiChrosphere Si 100, 5 $\mu\text{m}$ , 10 x 250mm   |
| mobile Phase: | <i>n</i> -Heptan/2-Propanol (99,5+0,5)  |
| Fluss:        | 1 ml min <sup>-1</sup>  |
| Detektion     | $\lambda_{\text{excitation}}=290 \text{ nm}$ , $\lambda_{\text{emission}}=328 \text{ nm}$ |

### **3.28 Medien, Puffer, Lösungen und Stammlösungen**

Alle Puffer und Lösungen wurden mit Wasser, welches durch eine PURELAB Plus<sup>TM</sup>-Wasserreinigungsanlage (USF Reinstwasser-systeme GmbH, Ransbach Baumbach, Deutschland) gesäubert und anschließend autoklaviert wurde, hergestellt. Dieses sterile Reinstwasser wird im Text als H<sub>2</sub>O angegeben.

#### 10 % SDS-Lösung

10 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS), autoklavieren

#### 10x Blocklösung (RNA)

10 % (w/v) Blockreagenz (Roche) in Maleinsäure-NaCl-Puffer durch 4minütiges vorsichtiges Erwärmen in der Mikrowelle (alle 30 s schütteln) lösen, autoklavieren und bei 4 °C lagern.

#### 10x PCR-Puffer

100 mM Tris-HCl,  
500 mM KCl,  
10, 12,5 oder 15 mM MgCl<sub>2</sub>,  
pH 8.8 mit HCl einstellen

## Material und Methoden

---

### 10x MOPS-Laufpuffer

0,4 M MOPS,  
0,1 M Natriumacetat,  
10 mM Natrium-EDTA,  
pH 7,2 mit NaOH einstellen, autoklavieren

### 10x TE-Puffer

0,1 M Tris,  
2m M Natrium-EDTA,  
pH 8,0 mit 5 N bzw. 10 N HCL-Lösung einstellen, autoklavieren

### 1 M Na-Phosphatpuffer

1 M Natriumphosphat,  
pH 7,0 mit Phosphorsäure einstellen, autoklavieren

### 1x Blocklösung (RNA)

10 % (v/v) 10x Blocklösung (RNA),  
90 % (v/v) Maleinsäure-NaCl-Puffer

### 10 % N-Lauroylsarcosin-Lösung

10 % N-Lauroylsarcosin, sterilfiltrieren

### 20x SSC

3 M Natriumchlorid,  
0,3 M Natriumcitrat,  
pH 7,0 mit Zitronensäure einstellen, autoklavieren

### 3 M NaAc-Puffer (verschiedene pH-Werte)

3 M Natriumacetat,  
pH 4,6 und pH 5,0 mit konzentrierter Essigsäure einstellen, autoklavieren

## Material und Methoden

---

### 4 M NaCl-Lösung

4 M Natriumchlorid, autoklavieren

### 50x TAE-Puffer

2 M Tris,

50 mM Natrium-EDTA,

pH 8,0 mit Essigsäure einstellen, autoklavieren

### 6x DNA-Proben-Ladepuffer

60 % (v/v) Glycerin (99,8 %),

60 mM Natrium-EDTA,

0,01 % (w/v) Bromphenolblau, autoklavieren

### 8 M LiCl-Lösung

8 M Lithiumchlorid, autoklavieren

### Ampicillin-Stammlösung (50 mg ml<sup>-1</sup>)

5 % (w/v) Natrium-Ampicillinsalz in H<sub>2</sub>O lösen, sterilfiltrieren

### CI (DNA-Isolation)

24 Volumenteile Chloroform

1 Volumenteil Isoamylalkohol

### CTAB-Puffer (DNA-Isolation)

100 mM Tris

2 % N-Cetyl-N,N,N-Trimethylammoniumbromid (CTAB)

1,4 M NaCl

20 mM EDTA

0,2 % Mercaptoethanol (kurz vor Gebrauch hinzufügen)

pH 8,0 mit HCl einstellen, autoklavieren

## Material und Methoden

---

### Detektionspuffer (RNA)

0,1 M Tris,  
0,1 M Natriumchlorid,  
pH 9,5 mit 5 N bzw. 10 N HCl einstellen, autoklavieren

### Dye

50 % (v/v) Glycerin,  
0,04 % (w/v) Bromphenolblau, autoklavieren

### High-SDS-Hybridisierungspuffer

7 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS),  
50 % (v/v) deionisiertes Formamid,  
25 % (v/v) 20x SSC,  
20 % (v/v) 10x Blocklösung (RNA),  
5 % (v/v) 1 M Na-Phosphatpuffer (pH 7,0),  
1 % (v/v) 10 % N-Lauroylsarcosin-Lösung

### Homogenisierungspuffer (Proteinextraktion)

20 mM Tris,  
0,25 M Saccharose,  
5 mM DDT (Dithiothieitol),  
1 mM PMSF (Phenylmethylsulfonfluorid),  
0,1 % (w/w) Leupeptin,  
pH 8,2 mit HCl einstellen, anschließend mit Helium entgasen

### LB-Medium und LB-Platten

1 % (w/v) Bacto<sup>®</sup> tryptone,  
0,5 % (w/v) Bacto<sup>®</sup> yeast extract,  
1 % (w/v) Natriumchlorid,  
für LB-Platten 1,5 % (w/v) Agar-Agar zusetzen,  
pH 7,0 mit 5 N NaOH einstellen, autoklavieren

## Material und Methoden

---

### LB/Amp/X-Gal-Platten

Ansatz wie bei LB-Platten, jedoch werden, wenn die Lösung nach Autoklavieren ca. 50 °C erreicht hat,

0,08 % (v/v) X-Gal-Stammlösung (50 mg ml<sup>-1</sup>) und

0,2 % (v/v) Ampicillin-Stammlösung (50 mg ml<sup>-1</sup>) zusetzen. Danach wie Herstellung von LB-Platten

### Lysispuffer (RNA)

4,5 M Guanidinium-Thiocyanat,

50 mM HEPES,

2 % (w/v) N-Lauroylsarcosin,

pH 7,5 mit 5N KOH-Lösung einstellen,

1 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol erst kurz vor Gebrauch zusetzen

### Maleinsäure-NaCl-Puffer

0,15 M Natriumchlorid,

0,1 M Maleinsäure,

pH 7,5 mit NaOH-Plätzchen einstellen, autoklavieren

### RNA-Probenpuffer

40 % (v/v) deionisiertes Formamid,

20 % (v/v) Dye,

16 % (v/v) dest. H<sub>2</sub>O,

14 % (v/v) 37%ige Formaldehyd-Lösung,

10 % (v/v) 10x MOPS-Laufpuffer (pH 7,2)

### TE-Puffer

10 mM Tris-HCl pH 7,5,

1 mM EDTA

### TES-Puffer

10mM Tris,  
5mM EDTA,  
1% (w/v) SDS  
pH 7,4 mit HCL-Lösung einstellen, autoklavieren

### Tfbl-Puffer

20 % (v/v) 0,5 M Rubidiumchlorid-Lösung,  
15 % (v/v) Glycerin (99,8 %, autoklaviert),  
10 % (v/v) 0,5 M Mangan(II)-Chlorid-Lösung,  
6 % (v/v) 0,5 M Kaliumacetat-Lösung,  
2 % (v/v) 0,5 M Calciumchlorid-Lösung,  
pH 5,8 mit verdünnter Essigsäure einstellen, auffüllen und sterilfiltrieren

### TfbII-Puffer

15 % (v/v) 0,5 M Calciumchlorid-Lösung,  
15 % (v/v) Glycerin (99,8 %, autoklavieren),  
2 % (v/v) 0,5 M MOPS-Lösung,  
2% (v/v) 0,5 M Rubidiumchlorid-Lösung,  
pH 6,5 mit 1 N KOH-Lösung einstellen, auffüllen und sterilfiltrieren

### Waschpuffer-1

10 % (v/v) 20x SSC,  
0,1 % (v/v) 10% SDS-Lösung

### Waschpuffer-2

2,5 % (v/v) 20x SSC,  
0,1 % (v/v) 10% SDS-Lösung

### Waschpuffer-3

10 % (v/v) Maleinsäure-NaCl-Puffer,  
0,3 % (v/v) Tween<sup>®</sup>20

### X-Gal-Stammlösung (50 mg ml<sup>-1</sup>)

100 mg 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactosid (X-Gal) in 2 ml N, N'-Dimethylformamid lösen, in lichtgeschützten Gefäßen bei -20 °C lagern.