

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Enzyme, Radioisotope und Oligonukleotide

Alle verwendeten Feinchemikalien waren von analytischem Reinheitsgrad und wurden, sofern nicht in Tabelle 2 aufgeführt, von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen.

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Materialien und deren Bezugsquellen

Material	Lieferfirma
Acrylamid, Bisacrylamid	Amersham Pharmacia Biotech, Upsalla, Schweden
Monoklonaler Antikörper HA.11	BabCO, Richmond, USA
YNB, Drop-out Supplement Mix	BIO 101 Inc., Carlsbad, USA
SeaKem™ LE Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
Agar, Bacto-Pepton, Bacto-Trypton, Yeast Extract	DIFCO, Detroit, USA
Adenin, Leucin, Uracil, Tryptophan	Fluka, Buchs, Schweiz
Duracryl	Genomic Solutions, Ann Arbor, USA
dNTP-Set, Restriktionsendonukleasen, alkalische Phosphatase,	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen NEB, Frankfurt am Main
Anti Mouse IgG, T4-DNA-Ligase, <i>Pfu</i> - und <i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Promega, Madison, USA
Oligonukleotide	Sigma-Genosys, Darmstadt
Sequenzierprimer	MWG, Ebersberg bei München
Superscript II Reverse Transkriptase, second strand buffer, DNA-Ligase, DNA Polymerase I, Ribonuklease H, T4-DNA Polymerase, acetyliertes BSA 1st strand Synthesis kit	Invitrogen, Karlsruhe
MegaScript T7 Kit	Ambion, Huntingdon, UK
Biotin-16-UTP	Roche, Mannheim
Biotin-11-CTP	Loxo, Dossenheim
SAPE	Molekulare Probes, Karlsruhe
Anti-streptavidin Antikörper	Linaris, Wertheim - Bettingen
α [³² P]-dATP, γ [³³ P]-ATP	ICN, Pharmaceuticals, USA

2.1.2 Nährmedien

Alle Medien für Mikroorganismen wurden autoklaviert (121 °C, 2x10⁵ hPa, 20 min). Bei Bedarf wurden dem Medium - nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C - die benötigten Antibiotika zugesetzt.

Tabelle 3: Auflistung und Zusammensetzung der verwendeten Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung (alle Angaben pro Liter)	Kulturmedium für
LB	10 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, (15 g Agar)	Bakterien
YEP	10 g Pepton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
EMM	3 g Kaliumhydrogenphthalat, 2,2 g Na ₂ HPO ₄ , 5 g NH ₄ Cl, 20 g Glukose, 1,05 g MgCl ₂ , 1 g KCl, 0,04 g Na ₂ SO ₄ , 14,7 mg CaCl ₂ , 1 mg Pantothersäure, 10 mg Nicotinsäure, 10 mg Inositol, 10 mg Biotin, 0,5 mg Borsäure, 1 mg Citrat, 0,4 mg MnSO ₄ , 0,4 mg ZnSO ₄ , 0,2 mg FeCl ₂ , 0,1 mg KI, 0,04 mg Molybdänsäure, 0,04 mg CuSO ₄ , 250 mg Adenin, 180 mg Tryptophan, 180 mg Uracil, 180 mg Leucin, 180 mg Histidin, (20 g Agar)	<i>S. pombe</i>

Bezeichnung	Zusammensetzung (alle Angaben pro Liter)	Kulturmedium für
YNB	1,7 g YNB ohne NH ₂ SO ₄ , 5 g NH ₂ SO ₄ , 20 g Glukose, 0,8 g Drop-out Supplement Mix, 20 mg Leucin, 20 mg Histidin, 20 mg Tryptophan, 20 mg Uracil, (20 g Agar)	<i>S. cerevisiae</i>
NZM	1,7 g YNB ohne NH ₂ SO ₄ , 5 g NH ₂ SO ₄ , 10 g Galactose, 10 g Saccharose, 0,8 g Drop-out Supplement Mix, 20 mg Adenin, 20 mg Leucin, 20 mg Histidin, 20 mg Tryptophan, 10 µM FeCl ₃ in 0,1 M HCl, pH 4,2 mit 20 mM Na-Citrat,	<i>S. cerevisiae</i>
YPD	10 g Hefeextrakt, 20 g Bacto-Pepton, 20 g Glukose, (20 g Agar)	<i>S. cerevisiae</i>
YPDA	10 g Hefeextrakt, 20 g Bacto-Pepton, 20 g Glukose, 30 mg Adenin, (20 g Agar)	<i>S. cerevisiae</i>
Hoagland	Makroelemente: 66 mg Ca(NO ₃) ₂ , 12 mg NH ₂ PO ₄ , 49 mg MgSO ₄ , 49 mg KNO ₃ , Mikroelemente: 7,5 µg CuSO ₄ , 23 µg ZnSO ₄ , 81 µg MnCl ₂ , 284 µg H ₃ BO ₃ , 1,4 µg MoO ₃ , Eisen-Chelat Komplex: 1,25 ml Fe-HBED (Chaney, 1988), pH 5,7	<i>A. thaliana</i> <i>A. halleri</i>
MS	Makroelemente: 1,9 g KNO ₃ , 1,65 g HH ₄ NO ₃ , 0,44 g CaCl ₂ , 0,37 g MgSO ₄ , 0,17 g KH ₂ PO ₄ Eisen-EDTA: 27,8 mg FeSO ₄ , 37,7 mg Na ₂ EDTA Mikroelemente: 19,9 mg MnSO ₄ , 8,6 mg ZnSO ₄ , 6,3 mg H ₃ BO ₃ , 0,83 mg KJ, 0,25 mg Na ₂ MoO ₄ , 25 µg CuSO ₄ , 25 µg CoCl ₂ Vitamine: 0,1 g myo-Inositol, 0,5 g Nikotinsäure, 0,5 g Pyridoxin-HCl, 0,1 g Thiamin-HCl 10 g Saccharose, pH 5,7	<i>A. halleri</i>

Tabelle 3 fortgesetzt

2.1.3 Mikroorganismen und Plasmide

Tabelle 4: Verwendete Hefe- und Bakterienstämme

Stamm	Charakteristika	Referenz/Herkunft
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
DY 1457	<i>MATa ade6 can1 his3 leu2 trp1 ura3</i>	Zhao & Eide, 1996a
<i>zhy3</i>	<i>MATa ade6 can1 his3 leu2 trp1 ura3 zrt1::LEU2 zrt2::HIS3</i>	Zhao & Eide, 1996b
<i>Escherichia coli</i>		
DH 10B	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80dlacZ Δ M15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 endA1 araD139</i> Δ (<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK</i> Δ <i>rpsL nupG</i>	Grant <i>et al.</i> , 1990
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		
GV3101	Gm ^r , Rif ^r	Koncz & Schell, (1986)

Tabelle 5: Verwendete Plasmide

Plasmid	Charakteristika	Referenz/Herkunft
pGEM-T	f1 ori, <i>colE1</i> ori, <i>lacZ</i> , MCS, Amp ^r , SP6- und T7-Promotor	Promega, Madison, USA
pSGP72	C-term. Triple HA-Tag, <i>Leu2</i> Amp ^r	Dr. Susan Forsburg, Salk Institute, La Jolla, CA, USA
pCB302	RK2 ori, <i>nptIII</i> , MCS1, MCS2, T _{nos} -Promotor-bar-P _{nos} -Terminator	Xiang <i>et al.</i> , 1999
pYES2	GAL Promotor, URA3, Amp ^r ,	Invitrogen, Karlsruhe
pCR [®] 2.1-TOPO [®]	<i>lacZ</i> , SP6-Promotor, Amp ^r	Invitrogen, Karlsruhe

2.2 Kultivierung von Bakterien und Hefen

2.2.1 *Escherichia coli*

Die Kultivierung von *E. coli* DH10B-Zellen erfolgte bei 37 °C in LB-Medium oder auf LB-Platten unter Zugabe von 100 mg/l Ampicillin bzw. 50 mg/l Kanamycin. Flüssigkulturen wurden bei 160 U/min geschüttelt.

2.2.2 *Agrobacterium tumefaciens*

Die Kultivierung der Agrobakterien erfolgte bei 28 °C in LB-Medium oder auf LB-Platten unter Zugabe von 50 mg/l Rifampicin und 25 mg/l Gentamycin. Nach erfolgter Transformation wurden zusätzlich 50 mg/l Kanamycin dem Medium zugesetzt. Flüssigkulturen wurden bei 160 U/min geschüttelt.

2.2.3 *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe*

Alle Hefe-Stämme wurden bei 30 °C kultiviert. Für *Saccharomyces cerevisiae* Stämme wurde YNB- oder YPDA-Medium bzw. Platten verwendet, wohingegen für *Schizosaccharomyces pombe* EMM- oder YE-Medium bzw. Platten zum Einsatz kamen. Den beiden Minimalmedien (YNB bzw. EMM) wurden je nach Bedarf die benötigten essentiellen Aminosäuren Histidin, Leucin, Uracil bzw. Tryptophan zugesetzt.

2.3 Pflanzenanzucht und Streßbehandlung

2.3.1 Oberflächensterilisation

Samen von *Arabidopsis thaliana* Wildtyp-Pflanzen (Ökotyp "Columbia") wurden für zwei Minuten in 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen. Anschließend wurden sie mit einer 12 %igen (w/v) Natriumhypochlorid Lösung, der 0,05 % TWEEN 20 zugesetzt wurden, für ca. 10 Minuten sterilisiert.

2.3.2 Kultivierung in Erde

2.3.2.1 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

Samen von *Arabidopsis thaliana* (Wildtyp bzw. Mutanten) wurden auf feuchter Erde ausgelegt und über Nacht bei 4°C stratifiziert. Anschließend wurden sie für 2-3 Wochen unter Kurztagbedingungen (8 h Licht /16 h Dunkelheit – Zyklus, 22 °C und 60 % Luftfeuchtigkeit) angezogen und anschließend in Töpfe mit 5 cm Durchmesser vereinzelt. In den nächsten 2-3 Wochen wurden sie ebenfalls unter Kurztagbedingungen kultiviert und bei Bedarf anschließend unter Langtagbedingungen (16 h Licht / 8 h Dunkelheit – Zyklus, 22 °C) bis zur Samenreife kultiviert.

2.3.2.2 *Arabidopsis halleri* (L.) O`Kane & Al-Shehbaz

Stecklinge von adulten Pflanzen wurden in Erde überführt und bei 100 % Luftfeuchtigkeit und Langtagbedingungen (16 h Licht / 8 h Dunkelheit – Zyklus, 22 °C und 60 % Luftfeuchtigkeit) bewurzelt. Nach der erfolgreichen Bewurzelung wurden die Stecklinge in Töpfe mit 8 cm Durchmesser umgetopft.

2.3.3 Kultivierung in Flüssigmedium (= Schüttelkultur)

Samen von *Arabidopsis halleri* (L.) O`Kane & Al-Shehbaz wurden oberflächensterilisiert (vgl. 2.3.1) und in MS Medium für 2 Wochen unter Dauerlicht und Schütteln (50 U/min) kultiviert. Mehrere Kolben wurden mit einer Mixtur verschiedener Schwermetalle (100 μ M CdCl₂, 500 μ M CuSO₄, 500 μ M ZnCl₂) gestreßt. Nach 2, 8 und 24 Stunden wurden die kompletten Pflanzen geerntet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung des Pflanzenmaterials erfolgte bei -70 °C.

2.3.4 Kultivierung im hydroponischen System

2.3.4.1 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

Die Samen wurden wie unter 2.3.1 beschrieben sterilisiert und anschließend auf 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße, die mit 0,5 %igem (w/v) Wasseragar befüllt waren, vereinzelt. Um eine kontinuierliche Nährstoffversorgung zu gewährleisten wurden die Gefäße an der Basis abgeschnitten und in Hoaglandlösung gestellt. Nach drei bis vier Wochen unter Kurztagbedingungen (8 h Licht /16 h Dunkelheit – Zyklus, 22 °C) und bei 100 % Luftfeuchtigkeit wurden die Pflanzen in 1,5-Liter-Töpfe mit Hoaglandlösung transferiert. Das Heranwachsen der Pflanzen bis zur geeigneten Größe erfolgte ebenfalls unter Kurztagbedingungen, jedoch wurde die Luftfeuchtigkeit auf 60 % reduziert.

2.3.4.2 *Arabidopsis halleri* (L.) O`Kane & Al-Shehbaz

Stecklinge von adulten Pflanzen wurden für ein bis zwei Wochen bei 100 % Luftfeuchtigkeit in Hoaglandlösung kultiviert. Die bewurzelten Stecklinge wurden anschließend in 1,5-Liter-Töpfe mit Hoaglandmedium überführt und die Luftfeuchtigkeit wurde auf 60 % reduziert. Während der gesamten Zeit wurden die Pflanzen unter Langtagbedingungen (16 h Licht /8 h Dunkelheit – Zyklus, 22 °C) kultiviert.

2.3.5 „detached leaves“-Experimente (verändert nach Ichimura *et al.*, 2000)

Je Behandlung wurden zwei bis drei junge Blätter mit einer Rasierklinge an der Basis des Stiels abgetrennt und für 24 Stunden in MES-Puffer Lösung (pH 5,7) inkubiert. Danach wurden die Blätter vorsichtig in neue MES-Lösungen transferiert, denen zuvor verschiedene Schwermetalle bzw. H₂O₂ zugegeben wurde. Die Blätter wurden dann zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.3.6 Streßbehandlung von hydroponischen Kulturen

Nachdem 24 Stunden vor der Streßbehandlung das Medium der Pflanzen erneuert wurde, erfolgte die Streßbehandlung durch Umsetzen der Pflanzen in neue Töpfe mit 1,5 Liter Hoagland-Medium, in das verschiedene Schwermetalle in unterschiedlichen Konzentrationen (siehe Tabelle 6) bzw. H₂O₂ gegeben wurden. Nach zwei Stunden wurden die Wurzeln geerntet und die Proben, die für Transkriptomanalysen bestimmt waren, wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben für die AAS-Analysen wurden zuerst gewaschen (siehe 2.6.1.1) und dann getrocknet oder im Falle der Sproßproben sofort getrocknet.

Bei den Langzeit-Experimenten wurden die Pflanzen in zinkfreiem, normalem und mit 30 μ M ZnSO₄ angereichertem Hoagland-Medium für eine Woche kultiviert. Nach Ablauf dieser Zeit

wurden die Wurzeln und der Sproß der Pflanzen geerntet und wie oben beschrieben eingefroren oder getrocknet.

Tabelle 6: Zusammenstellung der verschiedenen Behandlungen der hydroponischen Kulturen und der danach durchgeführten Analysen

Metall bzw H ₂ O ₂	<i>A. thaliana</i>	Art der Analyse	<i>A. halleri</i>	Art der Analyse
H ₂ O ₂	5 mM	RT-PCR	5 mM	RT-PCR
Cd ²⁺	10 µM	AAS / RT-PCR Microarray	10 µM	AAS
	25 µM	AAS	25 µM	AAS / RT-PCR Microarray
	50 µM	RT-PCR / Microarray	125 µM	RT-PCR / Microarray
Zn ²⁺	50 µM	RT-PCR	125 µM	RT-PCR
Cu ²⁺	10 µM	AAS / RT-PCR Microarray	10 µM	AAS / RT-PCR Microarray
			25 µM	RT-PCR

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Standardmethoden

Restriktionsspaltungen, Agarosegelelektrophoresen, die Dephosphorylierung von Vektoren mittels alkalischer Phosphatase, RNA- bzw. DNA-Fällung, Ligationen und die Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen wurden nach Standardprotokollen (Sambrook *et al.*, 1998) durchgeführt.

Plasmid-Präparation (mini bzw. midi), Aufreinigung von PCR-Produkten und die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte durch QIAGEN-Kits gemäß den Herstellerangaben.

2.4.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurden PE9700- (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim) und „DNA Engine PTC-200“-„Thermocycler“ (MJ Research, USA) eingesetzt. Als Matrize wurden Plasmid-DNA, cDNA, genomische DNA oder Bakterienkolonien verwendet. Ein Reaktionsansatz hatte ein Volumen von 50 µl und beinhaltete neben der Matrizen-DNA/RNA folgende Komponenten: je 1 µl 20 µM spezifische Oligonukleotide (siehe Anhang), 1 µl 20 mM dNTP-Mix, 5 µl 10xPCR-Reaktionspuffer (500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl, pH 9,0; 1 % (v/v) TritonX-100; 15 mM MgCl₂) 1-5 U *Taq*-DNA Polymerase (Promega, USA). Bei der Amplifikation von DNA-Fragmenten für eine funktionelle Expression wurde alternativ eine *pfu*-DNA Polymerase (Promega, USA) verwendet. Um eine optimale Effizienz zu erzielen, wurde bei diesen Reaktionen ebenfalls ein anderer 10x Reaktionspuffer (200 mM Tris-HCl, pH 8,8; 100 mM KCl; 100 mM (NH₄)₂SO₄; 20 mM MgSO₄; 1,0 % (v/v) Triton X-100; 1 mg/ml nukleasefreies BSA) verwendet.

2.4.3 RNA-Isolation

Das Pflanzengewebe wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert. 200-300 mg pulverisiertes Gewebe wurde mit 1 ml TRIZOL[®] versetzt und für 2 Minuten stark geschüttelt. Nach 5 Minuten Inkubation bei RT wurden die Proben erneut für 2 Minuten stark geschüttelt. Anschließend wurden 200 µl Chloroform zugegeben und die Probe für 30 Sekunden heftig

gemischt. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei RT wurden die Proben (12 000 U/min, 4 °C, 15 min, Rotor 16F24-11, Eppendorf) zentrifugiert. Danach wurde die obere Phase abgenommen und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Durch mehrmaliges Umdrehen des Gefäßes wurden die Lösungen vermischt. Nach einer zehnminütigen Inkubation bei RT wurden die RNA durch erneutes Zentrifugieren (12 000 U/min, 4 °C, 10 min, Rotor 16F24-11, Eppendorf) pelletiert. Nach dem Abnehmen des Überstandes wurde das Pellet mit 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (12 000 U/min, 4 °C, 5 min, Rotor 16F24-11, Eppendorf). Nach dem erneuten Abnehmen des Überstandes wurde das Pellet an der Luft getrocknet und schließlich in 20 µl RNasefreiem Wasser aufgenommen und 5 Minuten bei 50 °C inkubiert. Zur Quantifizierung und Qualitätsprüfung der RNA wurde die Absorption bei 260 nm bzw. 280 nm gemessen. Um sicher zu stellen, daß die RNA nicht degradiert war, wurde 1 µg Gesamt-RNA auf einem 1 %igem (w/v) Agarosegel aufgetrennt.

2.4.4 Isolation genomischer DNA aus Pflanzen für PCR-Reaktionen

Zwei bis drei junge Blätter wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert und mit 1 ml Extraktionspuffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM EDTA, pH 8,0; 500 mM NaCl; 1,5 % [w/v] SDS; 0,5 % [v/v] β-Mercaptoethanol) versetzt. Nach einer zehnminütigen Inkubation bei 65 °C wurden die Proben mit 300 µl einer Kaliumacetat-Lösungen (60 % [v/v] 5 M Kaliumacetat; 11,5 % [v/v] Eisessig) gründlich vermischt und für 10 bis 60 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation (14 000 U/min, 4 °C, 10 min, Rotor 16F24-11, Eppendorf) wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgesäß überführt und mit 800 µl PCI, pH 8,0 vermischt. Nach erneuter Zentrifugation (14 000 U/min, 4 °C, 5 min, Rotor 16F24-11, Eppendorf) wurde der Überstand mit 500 µl Isopropanol vermischt. Nach dem Pelletieren (14 000 U/min, 4 °C, 5 min, Rotor 16F24-11, Eppendorf) der genomischen DNA wurde diese mit 70 % [v/v] Ethanol gewaschen und anschließend an der Luft vollständig getrocknet. Das trockene Pellet wurde dann in 40 µl Wasser resuspendiert.

2.4.5 Isolation genomischer DNA für Southern-Blot Analysen

1g Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert und mit 7 ml Extraktionspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA, pH 8,0; 100 mM NaCl; 1 % [w/v] SDS; 10 mM β-Mercaptoethanol) versetzt. Nach zehn Minuten Inkubation bei 65 °C wurden dem Ansatz 2,5 ml Kaliumacetat-Lösung (60 % [v/v] 5 M Kaliumacetat; 11,5 % [v/v] Eisessig) zugegeben. Nach dem Mischen durch mehrmaliges Umdrehen der Gefäße wurde der Ansatz für mindestens 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation (5 000 U/min, 4 °C, 15 min, Rotor 16A4-44, Eppendorf) wurde der Überstand durch eine Miracloth-Membran gefiltert und mit 5 ml Isopropanol vermischt. Nach dem gründlichen Mischen des Ansatzes durch Invertieren wurde die genomische DNA pelletiert (5 000 U/min, 4 °C, 15 min, Rotor 16A4-44, Eppendorf). Anschließend wurde das Pellet mit 70 % [v/v] Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Nach dem Lösen des Pellets in 200 µl Wasser wurden 1,5 µl 1 %ige (w/v) RNA-Lösung zugegeben. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei 37 °C wurde die DNA durch Zugabe von 20 µl 3 M Natriumacetat und 220 µl Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation (14 000 U/min, 4 °C, 5 min, Rotor 16F24-11, Eppendorf) pelletiert. Anschließend wurde das Pellet mit 70 %igem [v/v] Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 30 µl Wasser resuspendiert.

2.4.6 Northern-Transfer

Für den *Northern-Transfer* wurden 10 µg Gesamt-RNA über denaturierende Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe 2.4.1). Anschließend wurde das Gel zweimal für 20 min mit Wasser gewaschen und danach für 20 min in 20x SSC (3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat; pH 7,0) Lösung äquilibriert. Der Transfer auf eine Nylonmembran (Hybond-N, Amersham Bioscience, Freiburg) erfolgte mittels Kapillarblot über Nacht. Als Transferpuffer diente 20x SSC. Nach Beendigung des Transfers wurde die RNA durch Bestrahlung mit UV-Licht (Stratalinker™ 1800, Stratagene, Heidelberg) kovalent an die Membran gebunden.

2.4.7 Southern-Transfer

Für den *Southern-Transfer* wurden 20 µg genomische DNA mittels Restriktionsendonukleasen vollständig gespalten und über ein 0,8 %iges (w/v) nichtdenaturierendes Agarosegel (siehe 2.4.1) aufgetrennt. Im Anschluß an die Auftrennung wurde das Gel kurz in Wasser gewaschen und anschließend für 30 Minuten in 0,25 M HCl-Lösung unter leichtem Schütteln inkubiert. Nachdem das Gel erneut mit Wasser gewaschen wurde, erfolgten zwei zwanzigminütige Inkubationen in Denaturierungslösung (1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH). Anschließend wurde das Gel sooft in Neutralisierungslösung (1,5 M NaCl; 0,5 M Tris-HCl; pH 7,0) gewaschen, bis der pH-Wert der Lösung nach der Inkubation unter 9,0 lag. Der Transfer der genomischen DNA auf eine Nylonmembran (Hybond-N, Amersham Biosciences, Freiburg) erfolgte mittels Kapillarblot über Nacht. Als Transferlösung diente 20x SSC (3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat; pH 7,0). Um die DNA kovalent an die Membran zu binden, wurde sie mit UV-Licht bestrahlt (Stratalinker™ 1800, Stratagene, Heidelberg).

2.4.8 Radioaktive Markierung von DNA Fragmenten

Um radioaktive DNA-Sonden herzustellen, wurden 25-50 ng gereinigtes DNA-Fragment (siehe 2.4.1) mit 50 µCi α -[³²P]-dATP durch den „Megaprime-DNA labelling kit“ (Amersham Biosciences, Freiburg) nach Herstellerangaben markiert. Die Abtrennung nicht-inkorporierter Nukleotide erfolgte unter Verwendung von „Probe Quant™ G-50 Micro Columns“ (Amersham Biosciences, Freiburg) nach Herstellerangaben. Anschließend wurde die Sonde für 10 min bei 95 °C denaturiert und sofort verwendet.

2.4.9 Radioaktive Hybridisierung

Alle Schritte der Hybridisierung erfolgten unter ständiger Rotation in Hybridisierungsöfen. Zu Beginn wurde die Membran in eine Hybridisierungsröhre transferiert und für mindestens 2 Stunden mit Church-Puffer (0,5 M NaHPO₄; 1 % (w/v) BSA; 1 mM EDTA, 7 % (w/v) SDS; pH 7,2) bei 65 °C prähybridisiert. Anschließend wurde der Church-Puffer durch neuen Puffer ersetzt und die radioaktiv markierte Sonde (siehe 2.4.8) zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht und wurde bei einer Temperatur zwischen 58 °C und 65 °C durchgeführt. Am nächsten Tag wurde die Membran einmal mit 2x SSC für 5 Minuten bei RT gewaschen. Anschließend erfolgte ein zweiter Waschschriff für 20 min mit Waschlösung (0,1x SSC; 0,1 % (w/v) SDS), der sooft wiederholt wurde, bis die detektierte Radioaktivität einen angemessenen Wert erreicht hatte. Der zweite Waschschriff wurde - je nach Experiment - bei Temperaturen zwischen 45 °C und 65 °C durchgeführt. Die Membran wurde anschließend für mindestens einen Tag auf einen Phosphoscreen (Amersham Bioscience, Freiburg) gelegt. Die Entwicklung erfolgte mit dem Phosphorimager (Storm™, Amersham Biosciences, Freiburg).

2.4.10 RT-PCR

Als Matrize für die RT-PCR Reaktion diente 1 µl cDNA, die mit Hilfe des „RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit“ (MBI Fermentas, St Leon-Roth) oder dem „SuperScript II First-Strand Synthesis System for RT-PCR“ (Invitrogen, Karlsruhe) synthetisiert wurde. Für die Synthesereaktion wurden 1 µg Gesamt-RNA verwendet, die zuvor mit DNase I (Invitrogen, Karlsruhe) behandelt wurde. Sowohl die cDNA-Synthese als auch die DNase-Behandlung wurden laut Herstellerangaben durchgeführt.

2.4.11 RACE (Rapid Amplification of CDNA Ends)

Für die Synthese der „5'-RACE ready cDNA“ und 3'-RACE ready cDNA“ wurde 1 µg Gesamt-RNA verwendet (SMART™ RACE cDNA Amplification Kit, Clontech, Palo Alto, USA). Die Produkte dieser Reaktionen wurden vor der RACE-PCR mit Tricine-EDTA Puffer (10 mM Tricine-KOH, pH 8,5; 1 mM EDTA) 1:10 verdünnt. Alle Schritte wurden laut Herstellerangaben durchgeführt.

2.4.12 Quantitative real-time PCR

Zu Beginn wurden 1,5 µg Gesamt-RNA mit DNase I (Invitrogen, Karlsruhe) behandelt. Im nächsten Schritt wurde mit Hilfe des „SuperScript II First-Strand Synthesis System for RT-PCR“ (Invitrogen, Karlsruhe) eine cDNA synthetisiert, die im Anschluß 1:50 mit Wasser verdünnt wurde. Die PCR-Reaktion wurde mit dem ABI Prism® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt. Jede Probe wurde aus technischen Gründen als Triplikat analysiert und hatte folgende Zusammensetzung: 10 µl SYBR® Green PCR Mastermix (Applied Biosystems, Foster City, USA), 5 µl cDNA, 5 µl Primer-Mix (0,5 µM je Primer). Die erhaltenen Daten wurden mit Hilfe des Programms ABI Prism® 7000 SDS Software (Applied Biosystems, Foster City, USA) ausgewertet. Hierbei wurden alle Parameter gemäß der Voreinstellung übernommen und der CT-Wert wurde über die Funktion auto-CT ermittelt. Für jede Probe wurde anschließend der Δ CT-Wert berechnet (Δ CT = CT_(Kandidatengen) - CT_(konstitutive Kontrolle)). Danach wurde darauf basierend der $\Delta\Delta$ CT bestimmt ($\Delta\Delta$ CT = Δ CT_{Behandlung} - Δ CT_{Kontrolle}). Schlußendlich wurde die relative Transkripthäufigkeit nach der folgenden Formel berechnet: relative Transkripthäufigkeit = $2^{-\Delta\Delta$ CT}.

2.4.13 Agrobakterien-Transformation

Eine Einzelkolonie von *Agrobacterium tumefaciens* wurde über Nacht in selektivem LB-Medium bei 28 °C und 200 U/min angezogen. Mit dieser Kultur wurden 50 ml selektives LB-Medium angeimpft. Nachdem die Hauptkultur eine optische Dichte von 0,5-1,0 erreicht hatte, wurde sie auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (3 500 U/min, 4 °C, 5 min, Rotor 16A4-44, Eppendorf). Das Pellet wurde dann in 1 ml eiskalter 20 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und Aliquots von 100 µl auf vorgekühlte Eppis verteilt, die anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Nach dem Auftauen der Zellen wurde 1 µg Plasmid-DNA zugegeben und der Ansatz bei 37 °C für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurde 1 ml LB-Medium (ohne Antibiotikum) zugegeben und die Zellen bei 28 °C und leichtem Schütteln für 2-4 Stunden inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (6 000 U/min, RT, 5 min, Rotor 16F24-11, Eppendorf) wurden die Zellen in 75 µl LB-Medium resuspendiert, auf selektive LB-Platten ausgestrichen und für zwei Tage bei 28 °C kultiviert.

2.4.14 Pflanzentransformation

Eine 400 ml Übernachtkultur (28 °C, 200 U/min) von *Agrobacterium tumefaciens* in selektivem YEP-Medium wurde zentrifugiert und in 900 ml 5 % (w/v) Saccharoselösung resuspendiert. Nachdem zusätzlich 180 µl Silwet-77 (Lehle Seeds, Round Rock, USA) zugegeben wurden, wurde die Infloreszenz von ca. 6 Wochen alten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen in diese Suspension mehrmals eingetaucht. Nachdem die Pflanzen über Nacht in Dunkelheit gehalten wurden, erfolgte der Transfer ins Gewächshaus, wo die Pflanzen bis zur Samenreife kultiviert wurden. Die reifen Samen wurden auf gedämpfte Erde ausgebracht und für ein bis mehrere Tage bei 4 °C stratifiziert. Nach der Keimung der Samen wurden die drei bis vier Tage alten Pflanzen mit 0,1 %iger (v/v) Basta-Lösung besprüht. Diese Prozedur wurde im Abstand von 2-3 Tagen zweimal wiederholt.

2.4.15 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Mit 5 ml einer Übernachtkultur wurden 100 ml YPD-Medium angeimpft. Nachdem die Zellen eine optische Dichte (OD₆₀₀) von 0,6 erreicht hatten, wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 000 U/min, RT, 5 min, Rotor 16A4-44, Eppendorf) geerntet. Die Zellen wurden mit 20 ml Lösung A (10 mM BICINE; 1 M Sorbitol; 3 % (v/v) Ethylenglykol; pH 8,35) gewaschen und erneut zentrifugiert (5 000 U/min, RT, 5 min, Rotor 16A4-44, Eppendorf). Anschließend wurden die Zellen in 2 ml Lösung A aufgenommen und in 200 µl Aliquots bei -70 °C eingefroren. Nach frühestens 30 Minuten wurden die Zellen wieder auf RT gebracht und mit 1 µg Plasmid-DNA und 50 µg Heringsspema-DNA versetzt. Nachdem der gesamte Ansatz für 5 min bei 30 °C inkubiert wurde, erfolgte die Zugabe von 1 ml Lösung B (200 mM BICINE; 40 % (v/v) PEG 1000; pH 8,35). Daraufhin wurden die Hefezellen für eine Stunde bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz zentrifugiert (3 000 U/min, RT, 2 min, Centrifuge 5415 D, Eppendorf) und die Zellen in 800 µl Lösung C (10 mM BICINE; 150 mM NaCl; pH 8,35) resuspendiert. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt und die Zellen anschließend auf selektiven YNB-Platten ausplattiert. Nach zwei bis drei Tagen Inkubation bei 30 °C waren Koloniebildungen zu beobachten.

2.4.16 Hefe-Wachstums-Test

Die verschiedenen *Saccharomyces cerevisiae* Stämme wurden über Nacht in selektivem NZM-Medium angezogen (150 U/min, 30 °C). Am nächsten Tag wurde die optische Dichte der Kulturen photometrisch bei 600 nm bestimmt. Anschließend wurden die verschiedenen Ansätze so verdünnt, daß eine Start-OD von 0,05 erreicht wurde. Während des Wachstumsversuches wurden die Zellen in NZM-Medium kultiviert, dem verschiedene Konzentrationen ZnSO₄ zugesetzt wurden. Nach ca. 24 Stunden bei 30 °C und 150 U/min wurde die optische Dichte der Kulturen bei 600 nm bestimmt.

2.4.17 cDNA-AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

2.4.17.1 Gesamt- und m-RNA Isolation

Aus *Arabidopsis halleri* Pflanzen (L.) O`Kane & Al-Shehbaz, die für 0 (= Kontrolle), 2, 8 und 24 Stunden mit einer Mixtur aus verschiedenen Schwermetallen (100 µM CdCl₂, 500 µM CuSO₄, 500 µM ZnCl₂) behandelt wurden, wurde Gesamt-RNA isoliert (siehe 2.4.3). Im Anschluß wurden aus 150 µg Gesamt-RNA mit Hilfe des „Dynabeads mRNA purification

Kits“ (DYNAL Biotech GmbH, Hamburg) laut Herstellerprotokoll m-RNA isoliert. Am Ende wurde die m-RNA in 10 µl Tris/HCl (DYNAL Biotech GmbH, Hamburg) aufgenommen.

2.4.17.2 cDNA Synthese

Die gesamte eluierte m-RNA wurde für die Erststrangsynthese verwendet. Das Umschreiben der m-RNA in cDNA wurde laut Herstellerangaben durchgeführt (1st strand Synthesis kit, GibcoBRL). Nach Beendigung der Erststrangsynthese wurde die cDNA für 15 Minuten mit RNase H (Invitrogen, Karlsruhe) behandelt. Anschließend wurden 40 µl Zweitstrangsynthese-Mix (4 µl 10x second strand buffer; 1 µl DNA Polymerase I [5 U/µl]; 2 µl 20 mM dNTPs; 33 µl Millipore-Wasser) zugegeben und der Ansatz für 2 h bei 16 °C inkubiert. Nach dem Ablauf der Inkubationszeit wurden 140 µl Wasser zugegeben und der Ansatz mit 200 µl PCI, pH 8,0 versetzt und intensiv vermischt. Nach der anschließenden Zentrifugation (14 000 U/min, RT, 5 min, Rotor 16F24-11, Eppendorf) wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 1/10 Volumen 3 M NaAc, pH 5,2 versetzt und gemischt. Nach der Zugabe von 2 Volumenteilen 96 % (v/v) Ethanol und erneutem Mischen wurde der Reaktionsansatz über Nacht bei -20 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Ansatz zentrifugiert (14 000 U/min, 4 °C, 10 min, 16F24-11, Eppendorf) und das Pellet mit 50 µl 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen. Nach dem erneuten Zentrifugieren (14 000 U/min, 4 °C, 5 min, Rotor 16F24-11, Eppendorf) wurde das Pellet an der Luft vollständig getrocknet und anschließend in 20 µl Wasser resuspendiert.

2.4.17.3 Restriktionsverdau und Adapterligation

Die Hälfte (= 10 µl) der resuspendierten cDNA wurde dem *TaqI*-Mix (4 µl 10x NEB Buffer3; 4 µl BSA [1µg/µl]; 1,25 µl *TaqI* [20 U/µl]; 20,75 µl Wasser) zugegeben. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 65 °C wurden 10 µl *ApoI*-Mix (1 µl 10x NEB Buffer3; 1 µl BSA [1 µg/µl]; 1,25 µl *ApoI* [4 U/µl]; 6,75 µl Wasser). Nach weiteren zwei Stunden bei 50 °C wurde der Adapter-Mix (1 µl 10x NEB Buffer3; 1,2 µl 10 mM ATP; 1 µl *ApoI*-Adapter [5 pmol/µl]; 1 µl *TaqI*-Adapter [50 pmol/µl]; 1,25 µl T4 DNA Ligase [4 U/µl]; 4,55 µl Wasser) hinzugefügt und der Ansatz bei 37 °C für 3 Stunden inkubiert. Die Adapterlösungen wurden wie folgt hergestellt: äquimolare Mengen von *ApoI*-Adapter fw und *ApoI*-Adapter rev, bzw. *TaqI*-Adapter fw und *TaqI*-Adapter rev wurden vermischt und für 3 Minuten bei 95 °C denaturiert und anschließend langsam auf RT abgekühlt.

2.4.17.4 Präamplifikation

Für die Präamplifikation wurden 20 µl des Ligationsansatzes verwendet. Diese Menge wurde dem Präamplifikationsmix (5 µl 10x PCR Puffer; 0,7 µl 20 mM dNTPs; 1 µl *ApoI* Primer [100 ng/µl]; 1 µl *TaqI* Primer [100 ng/µl]; 0,5 µl *Taq/pfu*-Polymerase [160/1]; 21,8 µl Wasser) hinzugefügt und mittels PCR amplifiziert. Das verwendete Programm („Präamplifikation“) ist im Anhang aufgeführt.

2.4.17.5 Radioaktive Markierung der *ApoI*+2-Primer

Dem *ApoI*-Primer-Mix (1,3 µl 50µM *ApoI*+2 Primer; 3µl 10x Kinase Puffer; 0,7 µl T4 Polynukleotidkinase [5 U/µl]; 18,3 µl Wasser) wurden 6,7 µl [$\gamma^{33}\text{P}$]-ATP hinzugefügt und die Reaktion bei 37 °C für 30-60 Minuten inkubiert.

2.4.17.6 Selektive Amplifikation

Für die selektive Amplifikation wurde 1 µl einer 1:10 Verdünnung der Präamplifikation dem Amplifikationsmix (1 µl 9 µM *TaqI*+2 Primer; 0,5 µl radioaktiv markierte *ApoI*+2 Primer; 0,4 µl 20 mM dNTPs; 1 µl 10x PCR Puffer; 0,2 µl *Taq*-Polymerase [5 U/µl]; 5,9 µl Wasser) zugegeben. Für die PCR-Reaktion wurde das Programm „selektive Amplifikation“ (siehe Anhang) verwendet. Die PCR-Reaktion wurde über ein 7 M Harnstoff-Gel (32 g Harnstoff; 15 ml 5x TBE-Puffer; 15 ml Bis/Acrylamid (19:1); 350 µl 10 % (w/v) APS; 44 µl TEMED, ad 75 ml Wasser) bei 1800V und 60W aufgetrennt. Nach dem Lauf wurde das Gel auf Filterpapier (3MM, Whatman, England) transferiert und bei 80 °C vakuumgetrocknet. Die Autoradiographie erfolgte durch Auflegen von BioMax MR Röntgenfilmen (Amersham Bioscience, Freiburg) für 3-14 Tage.

2.4.17.7 Klonierung von AFLP-Fragmenten

Die Fragmente von Interesse wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mit 30 µl TE-Puffer überschichtet. Nach einer Inkubation bei 37 °C über Nacht wurde der Ansatz zentrifugiert (14 000 U/min, RT, 2 min, Rotor 16F24-11, Eppendorf). 1-5 µl des Überstandes wurden dem PCR-Mix (5 µl 10x PCR-Puffer; 0,5 µl 20 mM dNTPs; 1 µl 20 µM *ApoI*+2 Primer; 1 µl 20 µM *TaqI*+2 Primer; 0,25 µl *Taq*-Polymerase [5 U/µl]; 41,25 µl Wasser) für die folgende PCR eingesetzt. Zur Reamplifikation wurde das Programm „selektive Amplifikation“ (siehe Anhang) verwendet. Die erhaltenen PCR Produkte wurden über ein 1 %iges (w/v) Agarosegel aufgetrennt und die Banden mit Hilfe des Qiagen Gel-Extraction Kits aus dem Gel eluiert. Die Extraktion wurde laut Herstellerangaben durchgeführt und das Volumen für die Eluation der DNA beträgt 20 µl. 8 µl des Eluates wurden für die pGEM-T Ligation (vgl. 2.4.1) eingesetzt. Anschließend wurden kompetente *E. coli*-Zellen mit 2 µl des Ligationsansatzes transformiert (vgl. 2.4.1). Nach erfolgreicher Transformation wurden pro Ansatz vier Klone sequenziert.

2.4.18 Affymetrix-Microarray

2.4.18.1 RNA Isolation.

Die Isolation der Gesamt-RNA wurde wie unter 2.4.3 beschrieben durchgeführt.

2.4.18.2 cDNA-Synthese.

In einem Gesamtvolumen von 11 µl wurden 10 µg Gesamt-RNA und 1 µg T7-(dT)₂₄-Primer bei 70 °C inkubiert. Nach Ablauf von 10 Minuten wurde der Ansatz auf Eis gestellt, um ein schnelles Abkühlen zu erreichen. Anschließend wurden 7 µl Reaktionsmix (4 µl 5x first strand Buffer; 2 µl 0,1 M DTT; 1 µl 10 mM dNTPs) zugegeben und für 2 Minuten bei 42 °C inkubiert. Nach der Zugabe von 2 µl Superscript[®] II Enzym (200 U/µl) wurde der Reaktionsansatz für 60 Minuten bei 42 °C inkubiert. Nach Abschluß der Erststrangsynthese wurde der Ansatz auf Eis abgekühlt und anschließend der Zweitstrangsynthese-Mix (91 µl RNase-freies H₂O; 30 µl 5x second strand buffer; 3 µl 10 mM dNTPs; 1 µl *E. coli*-DNA-Ligase [10 U/µl]; 4 µl *E. coli*-DNA-Polymerase I [10 U/µl]; 1 µl *E. coli*-RNase H [2 U/µl]) zugegeben. Daraufhin wurde der Ansatz vorsichtig mit einer Pipette gemischt und für 2 Stunden bei 16 °C inkubiert. Nach Zugabe von 2 µl T4-DNA-Polymerase (5 U/µl) wurde der Reaktionsmix für weitere 5 Minuten bei 16 °C inkubiert und die Zweitstrangsynthese anschließend durch die Zugabe von 10 µl 0,5 M EDTA gestopt.

Zur Aufreinigung der synthetisierten cDNA wurde der komplette Reaktionsansatz mit 162 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, pH 8.0) versetzt und kräftig vermischt. Das Gemisch wurde dann in ein Phase-Loc Gel Eppendorfgefäß (Eppendorf) überführt und zentrifugiert (10 800 U/min, 4 °C, 2 min, Rotor 16F24-11, Eppendorf). Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und es wurden 0,5 Vol. 7,5 M Ammoniumacetat und nach gewissenhaftem Mischen zusätzlich 2,5 Vol. 96 % (v/v) Ethanol (-20 °C) zugegeben. Nach erneutem kräftigen Mischen wurde der Ansatz zentrifugiert (10 800 U/min, 4 °C, 30 min, Rotor 16F24-11, Eppendorf). Anschließend wurde das Pellet mit 70 %igem (v/v) Ethanol (-20 °C) gewaschen und erneut zentrifugiert (10 800 U/min, 4 °C, 30 min, Rotor 16F24-11, Eppendorf). Nach nochmaligem Waschen mit 70 %igem (v/v) Ethanol (-20 °C) wurde die gefällte cDNA an der Luft getrocknet und schließlich in 3 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert.

2.4.18.3 *In vitro* Transkription

1,5 µl der resuspendierten cDNA wurden mit dem Reaktionsmix (2 µl 75 mM ATP; 2 µl 75 mM GTP; 1,5 µl 75 mM CTP; 1,5 µl 75 mM UTP; 2 µl 10x Buffer Mix; 2 µl 10x Enzym Mix; T7-MegaScript Kit, Ambion) und biotinylierten Nukleotiden (3,75 µl 10 mM Bio-11-CTP; 3,75 µl 10 mM Biotin 16-UTP; Roche; Enzo) versetzt und mit der Pipette vorsichtig vermischt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz bei 37 °C für 6 Stunden inkubiert. Die Aufreinigung der *in vitro* Transkription wurde laut Herstellerprotokoll mit dem RNaseasy Kit (Qiagen) durchgeführt. Zur Elution der cRNA wurden 30 µl RNase freies Wasser (50 °C) verwendet. Der Durchlauf wurde anschließend noch einmal auf die Säule aufgetragen um eine maximale Ausbeute zu erzielen. Die Menge und Reinheit der cRNA wurde anschließend photometrisch bei 260 nm bzw. 280 nm bestimmt. Im Falle einer zu geringen cRNA Konzentration wurde die cRNA wie unter 2.4.1 beschrieben gefällt und in einem geringeren Volumen RNase-freiem Wasser erneut resuspendiert.

2.4.18.4 Fragmentierung der cRNA

Durch die Zugabe von 4 µl 5x Fragmentierungspuffer (200 mM Tris/Acetat, pH 8,1; 500 mM KOAc; 150 mM MgOAc) zu 16 µg cRNA und der anschließenden Inkubation bei 95 °C für 35 Minuten wurde die cRNA fragmentiert. Bis zur folgenden Hybridisierung wurden die Proben bei -20 °C gelagert. Zur Überprüfung der Fragmentierung wurden 1 µl des Ansatzes und 0,8 µg der noch nicht fragmentierten cRNA mittels eines 1,0 %igen (w/v) Agarosegels analysiert.

2.4.18.5 Hybridisierung und Färben der Microarrays

Dem Hybridisierungs-Mix (5 µl control B2; 15 µl 20x Hybridization controls; 3 µl Hering Sperm DNA; 3 µl BSA; 150 µl 2x Hybridization Buffer; 104 µl DEPC-Wasser) wurde die gesamte fragmentierte cRNA (= 15,2 µg) hinzugegeben. Nach dem gründlichen Mischen wurde der Ansatz zunächst bei 99 °C und anschließend bei 45 °C je 5 Minuten inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Proben zentrifugiert (12 000 U/min, RT, 5 min, Centrifuge 5415 D, Eppendorf). Vom Überstand wurden 200 µl für die Hybridisierung verwendet. Nach Ablauf der Hybridisierung (16 h, 45 °C, 60 U/min) wurden die Microarrays gefärbt und gescannt. Die Färbung wurde bis auf zwei Modifikationen laut Herstellerangaben durchgeführt. Erstens wurde das Volumen der Färbelösung (400 µl 2x MES Farbe-Puffer; 32 µl BSA [50 mg/ml]; 8 µl Streptavidin R-phycoerythrin Konjugat [1 mg/ml]; 360 µl DEPC-Wasser) und der Antikörperlösung (400 µl 2x MES Farbe Puffer; 32 µl BSA [50 mg/ml]; 8 µl

goated IgG [10mg/ml]; 4,8 µl biotinylierter Antikörper [0,5 mg/ml]; 302 µl DEPC-Wasser) von 600 µl auf 800 µl erhöht. Des Weiteren wurde für den dritten Färbeschritt nicht eine neue Färbelösung hergestellt, sondern die Lösung von Färbeschritt 1 wiederverwendet. Für die Färbung und Verstärkung des „Arabidopsis genome arrays“ (Affymetrix, Santa Clara, USA) wurden die beiden Waschprotokolle EukGE-WS1v4 und EukGE-WS2v4 verwendet.

2.4.18.6 Scannen und Standardisierung der Microarrays

Nach dem Färben der Microarrays wurden die Chips gescannt. Die erhaltenen Daten wurden mit Hilfe der Auswertesoftware Affymetrix Microarray Suite 5.0 normalisiert. Hierfür wurden alle Parameter laut Voreinstellung übernommen und der TGT-Wert wurde auf 500 gesetzt. Die erhaltenen Daten wurden als Excel-Tabelle exportiert.

2.4.18.7 Auswertung der Microarrays

Die Auswertung der Daten wurde mit Microsoft Excel durchgeführt. Alle Signalwerte unter 25 wurden auf 25 gesetzt und es wurden nur Gene für die weitere Auswertung verwendet, die in den behandelten Proben (Schwermetallstreß) bzw. bei *Arabidopsis halleri* (konstitutiver Vergleich) als „present“ oder „marginal“ eingestuft wurden. Gene wurden als induziert gewertet, wenn sie in zwei von drei unabhängigen Experimenten mindestens 2fach induziert waren (Schwermetallstreß). Gene wurden beim hoch stringenten Filter als konstitutiv höher exprimiert eingestuft, wenn sie in allen Experimenten (*A. thaliana* und *A. halleri*) als „present“ gewertet wurden und der Mittelwert des Signals der ersten drei *A. halleri*-Proben mindestens 8fach höher war als der Mittelwert des Signals der ersten drei *A. thaliana*-Proben. Nach der Durchführung weiterer unabhängiger Experimente wurde auch ein – in seiner Stringenz etwas reduzierter- Filter angewendet. Gene wurden als konstitutiv höher exprimiert eingestuft, wenn sie in drei von fünf unabhängigen Experimenten von *A. halleri* als „present“ oder „marginal“ gewertet wurden und der Mittelwert des Signals der *A. halleri*-Proben mindestens 7fach höher war als der Mittelwert des Signals der *A. thaliana*-Proben.

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 2-D Gelelektrophorese

2.5.1.1 Proteinisolation

Etwa 1,5 g Wurzelgewebe wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert und mit 3 Volumen Homogenisierungspuffer (100 mM HEPES-KOH, pH 7,5; 5 % (v/v) Glycerin; 5 mM EDTA, 0,5 % (w/v) PVP; 3 mM DTT; 1 mM PMSF; 1 % (v/v) Proteaseinhibitor-Cocktail (Sigma); 0,1 % (v/v) β-Mercaptoethanol) vermischt. Um einen optimalen Aufschluß zu erreichen wurden die Proben drei Minuten mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert (5 000 U/min, 4 °C, 5 min, Rotor: 16 A4-44, Eppendorf) und der Überstand abgenommen. Nach erneutem Zentrifugieren (14 000 U/min, 4 °C, 10 min, Rotor: 16 F24-11, Eppendorf) wurde der Überstand abgenommen und mit gleichen Volumen an Tris gepuffertem Phenol (pH 7,5-8,0) vermischt und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der anschließenden Zentrifugation (5 000 U/min, 4 °C, 15 min, Rotor: 16 A4-44, Eppendorf) wurde die untere Phase entnommen und dieser Rückextraktionspuffer (0,1 M Tris, pH 8,4; 20 mM KCl; 10 mM EDTA; 0,4 % (v/v) β-Mercaptoethanol) zugegeben. Anschließend wurde der Ansatz kräftig gemischt und zentrifugiert (5000 U/min, 4 °C, 15 min, Rotor 16 A4-44, Eppendorf). Danach wurde die untere Phase erneut entnommen und der Extraktionsschritt

nochmals wiederholt. Nach Beendigung der zweiten Rückextraktion wurde die untere Phase mit mindestens 5 Volumen 0,1 M Ammoniumacetat (in Methanol gelöst) versetzt und gut gemischt. Anschließend wurde der Ansatz bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ für mindestens 2 Stunden gelagert, um eine quantitative Präzipitation der Proteine zu gewährleisten. Nach Beendigung der Inkubation wurde der Ansatz zentrifugiert (5 000 U/min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 min, Rotor 16A4-44, Eppendorf) und das Pellet in 0,1 M Ammoniumacetat (in Methanol gelöst) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (5 000 U/min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 min, Rotor 16 A4-44, Eppendorf) wurde das Pellet noch zweimal in 80 % (v/v) Tris-gepufferten Aceton, pH 8,0 resuspendiert. Am Schluß wurde der Ansatz zentrifugiert (5000 U/min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 min, Rotor 16 A4-44, Eppendorf), das Pellet in 200 μl Probenpuffer (7 M Harnstoff; 2 M Thioharnstoff; 50 mM DTT; 2 % (w/v) IPG; 4 % (w/v) CHAPS; 0,4 % SDS; 5 mM K_2CO_3) aufgenommen und die Proteinkonzentration bestimmt (siehe 2.5.1.2).

2.5.1.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 3 μl der Probe mit 3 μl 0,1 M HCl und 1 ml $\frac{1}{4}$ Bradfordreagenz (Bio-Rad, München) versetzt und gründlich vermischt. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei RT wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Zur genauen Konzentrationsbestimmung wurden verschiedene BSA Verdünnungen analog behandelt und mit den Proteinproben verglichen.

2.5.1.3 Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)

Für die Isoelektrische Fokussierung wurde 18 cm-IEF Streifen (Immobiline DryStrip pH 4–7, Amersham Pharmacia Biotech, Upsalla, Schweden) verwendet, auf die 150 μg Gesamtprotein aufgetragen wurden. Die Proteinproben wurden mit Rehydrationspuffer (8 M Harnstoff; 2 % (w/v) CHAPS; 0,3 % (w/v) DTT; 0,5 % (w/v) IPG; 0,002 % (w/v) Bromphenolblau) auf 450 μl aufgefüllt. Die Proben wurden in den Streifenhalter eingefüllt und mit dem IEF-Streifen (Gelseite nach unten) abgedeckt. Anschließend wurde der Streifen mit DryStrip Cover Fluid (Amersham Pharmacia Biotech, Upsalla, Schweden) überschichtet. Die Fokussierung erfolgte im IPGphor (Amersham Pharmacia Biotech, Upsalla, Schweden) nach dem in Tabelle 7 aufgeführten Programm.

Tabelle 7: Programm der isoelektrischen Fokussierung für 18 cm IEF-Streifen, pH 4-7

Schritt	Zeit	Spannung
1	12 h	50 V
2	1 h	200 V
3	1 h	500 V
4	1 h	1000 V
5	1 h	im Gradient auf 8000 V
6	4,5 h	8000 V

2.5.1.4 SDS-PAGE (2. Dimension)

Nach Beendigung der isoelektrischen Fokussierung wurden die Streifen in ein Wasserbad getaucht, in neue Streifenhalter gelegt (Gelseite nach oben) und mit Lösung A (50 mM Tris-HCl, pH 8,8; 6 M Harnstoff; 30 % (v/v) Glycerin; 2 % (w/v) SDS; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau; 1 % (w/v) DTT) überschichtet. Nach 15 min wurde die Lösung durch Lösung B (50 mM Tris-HCl, pH 8,8; 6 M Harnstoff; 30 % (v/v) Glycerin; 2 % (w/v) SDS; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau; 2,5 % (w/v) Jodoacetamid) ersetzt. Nach weiteren 15 Minuten wurden die Streifen aus den Streifenhaltern entnommen und in die Tasche der SDS-Gele

transferiert, die bereits mit Elektrophorese-Puffer (25 mM Tris-HCl, pH 8,8; 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS) gefüllt war. Für ein SDS-Gel wurden 28 ml Tridest, 22 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 1 ml 10 % (w/v) SDS, 30 µl TEMED und 450 µl 10 % (w/v) APS verwendet. Zur Befestigung des IEF-Streifens in der Tasche des SDS-Gels wurde heiße 0,5 %ige (w/v) Agarose verwendet. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in den ersten 30 min bei 3 W pro Gel. Anschließend wurde die Leistung auf 10 W pro Gel erhöht. Kurz bevor die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese gestoppt, die Gele fixiert und gefärbt (siehe 2.5.1.5).

2.5.1.5 Silberfärbung

Alle Schritte dieses Protokolls wurden bei RT und unter leichtem Schütteln durchgeführt. Vor der eigentlichen Silberfärbung wurden die Gele über Nacht in Fixierlösung (40 % (v/v) Ethanol; 10 % (v/v) Essigsäure) fixiert. Am nächsten Tag wurden die Gele zweimal mit 30 % (v/v) Ethanol und einmal mit Millipore-Wasser gewaschen. Jeder dieser Schritte dauerte 20 min. Anschließend wurden die Gele für exakt eine Minute in 0,2g/l Natriumthiosulfat inkubiert und im Anschluß dreimal kurz mit Wasser gewaschen. Danach erfolgte eine 20-minütige Inkubation in Silbernitratlösung (2 g/l AgNO₃; 750 µl/l Formaldehyd). Nachdem das Gel wieder dreimal kurz mit Millipore-Wasser gewaschen wurde, folgte eine Inkubation in Entwicklerlösung (30 g/l Na₂CO₃; 4 mg/l Natriumthiosulfat; 500 µl/l Formaldehyd). Dieser Schritt wurde durch den Transfer der Gele in Stopplösung (5 % (v/v) Essigsäure) beendet. Danach wurden die Gele in Millipore-Wasser gewaschen und bis zur Trocknung in Konservierungslösung (20 % (v/v) Ethanol; 3 % (v/v) Glycerin) aufbewahrt.

2.6 Analytische Methoden

2.6.1 Atomabsorptionsspektrometrie

2.6.1.1 Waschen der Proben

Alle Schritte wurden bei 4 °C, für jeweils 10 Minuten und unter leichtem Schütteln ausgeführt. Direkt nach dem Ernten wurden die Wurzelproben einmal mit Millipore-Wasser, dreimal mit 10 mM CaCl₂-Lösung und abschließend wieder mit Millipore-Wasser gewaschen.

2.6.1.2 Aufschluß und Analyse der Proben

Das Pflanzenmaterial wurde mittels einer Gefriertrocknungsanlage (Lyovac GT2, Steris, Hurth) vollständig getrocknet und anschließend das Trockengewicht bestimmt. Die Proben wurden mit 6 ml konzentrierter HNO₃ (Ultrapure, Merck) und 4 ml Wasser versetzt und mit der Mikrowelle aufgeschlossen (microPrep A, MLS, Leitkirch). Anschließend wurde die Konzentration der verschiedenen Metalle mit einem AAnalyst 800 (Perkin Elmer, Rödgau-Jügesheim) bestimmt. Hierfür wurde bei den Metallen Zink und Cadmium der Flammenmodus (Acetylen-Luft-Gemisch) verwendet, wohingegen für die Kupferbestimmungen der Graphitrohrmodus (Argon-Luft-Gemisch) verwendet wurde. Für die Konzentrationsbestimmungen der einzelnen Metalle wurden folgende charakteristische Wellenlängen gewählt. Die Messungen für Zink erfolgten bei 213,9 nm, für Kupfer bei 324,8 nm und Cadmium wurde bei 228,8 nm vermessen. Zur genauen Konzentrationsbestimmung wurde für jedes Metall vor der eigentlichen Messung eine Eichgerade erstellt.