

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
2,4-D	Sigma, München
ABA	Sigma, München
ACC	Sigma, München
Acrylamid-Bis-Acrylamidlg. (19:1)	Qbiogene, Heidelberg
Agar	Merck KGaA, Darmstadt
Agarose NEE0	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat	Roth, Karlsruhe
APS	Roth, Karlsruhe
Bacto LB Broth	DIFCO Laboratories, USA
Bacto Peptone	DIFCO Laboratories, USA
Bacto Tryptone	DIFCO Laboratories, USA
Bacto Yeast Extract	DIFCO Laboratories, USA
BAP	Sigma, München
BASTA	Hoechst Schering AgrEvo GmbH, Frankfurt/Main
BL	Sigma, München
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Bradford-Reagenz	BioRad, München
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt
BSA	Merck KGaA, Darmstadt
Calziumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Calziumnitrat	Roth, Karlsruhe
Coomassie-Brilliant-Blue-R250	Fluka, München
CTAB	SERVA, Heidelberg
DMSO	Roth, Karlsruhe
DTT	Sigma, München
EDFS	Sigma, München
EDTA	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Formaldehydlösung	Merck KGaA, Darmstadt

Formamid	Merck KGaA, Darmstadt
Glutathion-Agarose-Beads	Sigma, München
Glycerin	Sigma, München
Harnstoff	Merck KGaA, Darmstadt
Igepal	Sigma, München
IPTG	Duchefa, Haarlem,NL
Isoamylalkohol	Merck KGaA, Darmstadt
Kobaltchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Kupfersulfat	Merck KGaA, Darmstadt
Litiumchlorid	Sigma, München
Magnesiumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck KGaA, Darmstadt
Manganchlorid	Riedel-de Haën, Seelze
MOPS	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhypochloridlg.	Roth, Karlsruhe
Natriummolybdat	Sigma, München
N-Lauroylsarkosin	Sigma, München
PEG	Sigma, München
Phenol	Roth, Karlsruhe
PMSF	Sigma, München
Rubidiumchlorid	Sigma, München
Scim Dry Milk	Fluka, Buchs, Schweiz
SDS	Roth, Karlsruhe
Silvet	Lehle Seeds, USA
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tris	SERVA, Heidelberg
Triton X-100	SERVA, Heidelberg
Tween 20	Merck KGaA, Darmstadt
Xylencyclanol	Fluka, Buchs, Schweiz
Zinksulfat	Merck KGaA, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Sigma, München

2.1.2 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	FVS/2	Integra Bioscience, Fernwald
Binokular	Olympus SZX12	Olympus, Hamburg
Elektroblotkammer	Mini Trans-Blot Electrophoresis Transfer Cell	BioRad, München
Elektroporations- apparatur	<i>E. coli</i> Pulser	BioRad, München
Geldokumentations- anlage	GelVUE und Gene Genius Bioimaging System	Synoptics Ltd., Cambridge UK
Gelelektrophorese- kammer	MBT10EL	Neolab, Berlin
Gelelektrophorese- kammer (PAGE)	Mighty-Small-II SE 250/SE260	Hoefer Scientific Instruments, S.F. USA
Inkubationsschüttler	Incubator Shaker Model 25	New Brunswick Scientific Co. Inc., USA
Mikroskop	Zeiss Axioskop Zplus	Zeiss, Jena
PCR-Gerät	T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Photometer	UV/VIS Spectrophotometer DU 530	Beckman, Fullerton USA
Schüttelinkubator	Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg
Spannungsquelle	PowerNPpac 300	BioRad, München
Speed Vac Konzentrator	Univapo 150H	Progen Scientific Ltd., Mexborough, UK
Sterilbank	Gelaire	Flow Lab., Meckenheim
Tischzentrifuge	5415 D	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge gekühlt	5415 R	Eppendorf, Hamburg
Ultraschall- Homogenisator	Sonotrode UW 2070	Bandelin electronic, Berlin
Zentrifuge	CPR	Beckmann, München
Zentrifuge	J2-21	Beckmann, München

2.1.3 *Arabidopsis thaliana*, Bakterien und Vektoren

Arabidopsis thaliana

Als pflanzlicher Modellorganismus wurde *Arabidopsis thaliana* verwendet. Zur Anwendung kamen die Ökotypen Columbia (Col.0) und Wassilewskija (WS) und die in diesem Hintergrund erzeugten T-DNA-Insertionslinien.

Tabelle 2-1 Verwendetes Pflanzenmaterial

Kultivar	Eigenschaften	Herkunft/Referenz
Columbia Col.0	—	Wildtyp
Wassilewskija WS	—	Wildtyp
<i>cul3ako</i> ¹	T-DNA Insertion, Nullmutante	INRA-Versailles, Bechtold <i>et al.</i> , 1993; Bouchez <i>et al.</i> , 1993
<i>cul3bko</i>	T-DNA Insertion, Nullmutante	GABI-KAT
<i>axr1-12</i>	Punktmutation in <i>AXR1</i>	Lincoln <i>et al.</i> , 1990

¹Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Pascal Genschik, Institut de Biologie Moléculaire des Plantes du CNRS, Strasbourg

Vektoren

Tabelle 2-2 Verwendete Vektoren

Vektor	Genotyp/Eigenschaften/Verwendung	Referenz
pBluescriptII KS	Amp ^r , MCS, <i>lacZα</i> , Klonierungsvektor	Stratagene, Heidelberg
pCR2.1	Amp ^r , Kan ^r , MCS, <i>lacZα</i> , Klonierungsvektor	Invitrogen, Karlsruhe
pDONR221	Kan ^r , Gateway-Entry-Vektor	Invitrogen, Karlsruhe
pDEST15	Amp ^r , <i>E. coli</i> GST-Expressionsvektor	Invitrogen, Karlsruhe

Bakterien**Tabelle 2-3** Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ , ϕ 80d, <i>lacZ</i> Δ M15, <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ m _k ⁻), <i>supE44</i> , <i>thi1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169	Woodcock <i>et al.</i> 1989
<i>E. coli</i> XL1Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F' <i>proAB</i> , <i>lacI</i> Δ M15, Tn10, (Tet ^r)]	Stratagene, La Jolla (USA)
<i>E. coli</i> DB3.1	F ⁻ , <i>gyrA462</i> , <i>endA1</i> , Δ (sr1- <i>recA</i>) <i>mcrB</i> , <i>mrr</i> , <i>hsdS20</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>supE44</i> , <i>ara14</i> , <i>galK2</i> , <i>lacY1</i> , <i>proA2</i> , <i>rspL20</i> (Sm ^r) <i>xy15</i> , Δ leu, <i>mtl1</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)pLysS	F ⁻ , <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>gal</i> λ (DE3), [pLysS Cam ^r]	Stratagene, La Jolla (USA)
<i>E. coli</i> Rosetta 2	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdSB</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , <i>lacY1</i> , pRARE22 (Cm ^R), pAR5615 (Ap ^R)	Novagene, Darmstadt
TOP10	F ⁻ , <i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Φ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15, Δ <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>deoR</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , (Str ^r), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.4 Enzyme, Reaktions- und Präparations-„Kits“Enzyme

Die für molekularbiologische Arbeiten notwendigen Enzyme wurden von MBI Fermentas (St. Leon-Rot), New England Biolabs (Frankfurt/Main), Promega (Mannheim), Invitrogen (Karlsruhe), Amersham Biosciences, (Freiburg) oder Roche Diagnostics (Mannheim) bezogen.

Oligonukleotide wurden von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe), Sigma (München) und Eurogentec (Liège) synthetisiert. Eine Liste der verwendeten Oligonukleotide befindet sich im Anhang.

Reaktions- und Präparations-„Kits“

Folgende Reaktions- und Präparations-„Kits“ wurden in dieser Arbeit verwendet:

NucleoSpin Extract II Kit	Macherey-Nagel, Düren
OneStep RT-PCR-Kit	Qiagen, Hilden
NucleoSpin RNA Plant Kit	Macherey-Nagel, Düren
E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I	peqlab, Erlangen
Invisorb Spin Plasmid Mini Two	Invitex, Berlin
Prime-It II Random Primer Labeling Kit	Stratagene, La Jolla
TNT T7 Quick for PCR DNA System	Promega, Mannheim
ECL Western Blotting Detection Reagents	Amersham, Freiburg
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce, Rockford

Antikörper

Der in dieser Arbeit verwendete polyklonale Antikörper wurde freundlicherweise von Prof. Friedrich Schöffl, Eberhardt-Karls Universität Tübingen zur Verfügung gestellt. Er wurde in Kaninchen erzeugt und mit α HSP17.6 bezeichnet.

2.1.5 Medien und Lösungen

Alle eingesetzten Puffer, Lösungen und Medien wurden vor der Verwendung autoklaviert, bzw. sterilfiltriert.

2.1.5.1 Medium für *Arabidopsis thaliana*

Ats-Medium (Estelle and Somerville, 1987)

<u>Stocklösung</u>		<u>Volumen für 1 Liter</u>
KNO ₃	1,0 M	5,0 ml
Kaliumphosphatpuffer pH 5,5	1,0 M	2,5 ml
MgSO ₄	1,0 M	2,0 ml
Ca(NO ₃) ₂	1,0 M	2,0 ml
EDFS	20,0 mM	2,5 ml
<u>Microelemente-Lösung</u>		1,0 ml
H ₃ BO ₃	70,0 mM	
MnCl ₂	14,0 mM	
CuSO ₄	0,5 mM	
ZnSO ₄	1,0 mM	
Na ₂ MoO ₄	1,0 nM	
NaCl	10,0 mM	
CoCl ₂	0,1 nM	

Für Festmedium wurden 8,0 bzw. 10 g/l Agar verwendet.

2.1.5.2 Medien für *E. coli*

LB-Medium (Miller, 1972)

Trypton	10,0 g/l
Hefeextrakt	5,0 g/l
NaCl	5,0 g/l

LB-Agar

LB-Medium enthält	
Agar	15,0 g/l

SOB-Medium (Hanahan, 1983)

Bacto-Trypton	20,0 g/l
NaCl	10,0 mM
KCL	2,5 mM
Hefeextrakt	5,0 g/l
nach dem Autoklavieren:	
MgCl ₂	10,0 mM
MgSO ₄	10,0 mM

SOC-Medium (Hanahan, 1983)

SOB-Medium enthält	
Glucose	20,0 mM

2.1.5.3 Antibiotika

Wenn erforderlich wurden den Medien Antibiotika in folgenden Konzentrationen zugesetzt:

Carbenicillin	50 µg/ml
Chloramphenicol ¹ (Ethanol)	34 µg/ml
Hygromycin	50 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml
Tetracyclin ¹ (Ethanol)	10 µg/ml

¹Zur Herstellung wurde das angegebene Lösungsmittel verwendet.

2.1.5.4 Lösungen für *Arabidopsis thaliana*

Sterilisation von *Arabidopsis thaliana* Samen

Sterilisationslösung

Natriumhypochloritlösung	0,1%
Triton X-100	0,001%

2.1.5.5 Lösungen für Molekularbiologische Techniken

Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli* (Birnboim und Doly, 1979)

Lösung I

D-Glucose	50,0 mM
EDTA, pH 8,0	10,0 mM
Tris/HCl, pH 8,0	25,0 mM

Lösung II

H ₂ O	3,5 ml
1 M NaOH	1,0 ml
10% (w/v) SDS	0,5 ml

Lösung III

Kaliumacetat	3,0 M
Formiat	1,8 M

Isolierung von DNA aus *Arabidopsis thaliana* (Fulton et al. 1995)**Kernlysepuffer**

Tris	200 mM
EDTA pH 8,0	50 mM
NaCl	2 M
CTAB	2%

DNA-Extraktionspuffer

Sorbit	350 mM
Tris	100 mM
EDTA	5 mM
pH 7,5	

DNA-Präparationspuffer

DNA-Extraktionspuffer	2,5 Teile
Kernlysepuffer	2,5 Teile
5%ige Na-Sarcosyllösung	1,0 Teile
Natriumsulfit	0,33% (w/v)

TE-Puffer

Tris	10,0 mM
EDTA, pH8,0	1,0 mM

Agarosegelelektrophorese zur Trennung von DNA (Sambrook et al., 1989)**Probenauftragspuffer 6x**

EDTA, pH 8,0	100,0 mM
Glycerin	43,0% (v/v)
Bromphenolblau	0,5% (w/v)
Xylencyclanol	0,2% (w/v)

TBE 10x

Tris	108,0 g
Borsäure	61,0 g
EDTA	0,4 g
ad 1000 ml mit H ₂ O, pH 8,0	

Präparation von kompetenten Zellen aus *E. coli* (Hanahan, 1983)**FSB-Puffer**

K-MES, pH 6,2 mit KOH einstellen	10,0 mM
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	50,0 mM
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	45,0 mM
RbCl	100,0 mM
Glycerin	10,0 %

Denaturierendes RNA-Agarosegel**MEN 10x, pH 7,0**

MOPS	200,0 mM
Natriumacetat	50,0 mM
EDTA	10,0 mM

DNA-RNA-Hybridisierungen (Thomas, 1980)**SSC 20x**

NaCl	3,0 M
Natriumcitrat	0,3 M
pH 7,2 (mit Citrat eingestellt)	

Hybridisierungslösung

SDS	7,0%
EDTA, pH 8,0	1,0 mM
BSA	1,0%
In 0,5 M NaP-Puffer pH 7,0 lösen	

Waschlösung I

SSC	1x
SDS	0,5%
EDTA	1,0 mM

Waschlösung II

SSC	0,5x
SDS	0,5%
EDTA	1,0 mM

Aufreinigung von GST-getagtem Protein aus *E. coli***GST-Lysispuffer**

Tris/HCl pH 8,0	50,0 mM
KCl	250,0 mM
EDTA	1,0 mM
Triton X-100	0,2%
DTT	1,0 mM
PMSF	1,0 mM

Präparation von Gesamtprotein aus *Arabidopsis thaliana***Präparationspuffer A (mit Detergenz)**

Tris/HCl pH 7,5	100,0 mM
IGEPAL	0,1 – 0,5%
NaCl	150,0 mM

Präparationspuffer B (ohne Detergenz)

Tris/HCl pH 7,5	20,0 mM
NaCl	200,0 mM
PMSF	1,0 mM
Glycerin	10,0%

Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)**Trenngel**

Acrylamid/Bisacrylamidlösung	8 – 15%
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	2,5 ml
10% SDS	0,1 ml
10% APS	0,1 ml
TEMED	4,0 µl
H ₂ O	ad 10,0 ml

Sammelgel

Acrylamid/Bisacrylamidlösung	5,0%
1,0 M Tris/HCl, pH 6,8	630,0 µl
10% SDS	50,0 µl
10% APS	50,0 µl
TEMED	3,0 µl
H ₂ O	ad 5,0 ml

SDS-Laufpuffer 10x

Tris/HCl, pH 8,0	6,3 mM
Glycin	2,5 M
SDS	1,0%

Proteinladepuffer 4x

Glycerin	33,0%
Tris/HCl, pH 6,8	20,0 mM
SDS	6,0%
β-Mercaptoethanol	0,5 ml
Bromphenolblau	0,5%

Coomassie Färbelösung

Coomassie-Brilliant-Blue G-250	0,1% (w/v)
Methanol	50,0%
Eisessig	10,0%
1 h rühren lassen und anschließend filtrieren	

Entfärber

Methanol	5,0%
Eisessig	9,0%

Western-Blot und Immunodetektion immobilisierter Proteine**Transferpuffer**

Tris	25,0 mM
Glycin	190,0 mM
Methanol	20,0%

PBS-Puffer 10x

NaCl	730,0 mM
KCl	30,0 mM
Na ₂ HPO ₄ · 7 H ₂ O	43,0 mM
KH ₂ PO ₄	15,0 mM

T-PBS-Puffer

Tween 20	0,1%
in 1x PBS	

Pulldown**Bindepuffer**

Tris/HCl pH 7,5	50,0 mM
NaCl	150,0 mM
MgCl ₂	5,0 mM
Igepal	0,2%
PMSF	1,0 mM

2.2 Methoden

2.2.1 Anzuchtbedingungen und Aufbewahrung von *Escherichia coli*

Die Zellen von *E. coli* wurden in LB-Medium bzw. auf LB-Agar bei 37°C inkubiert und zur Selektion auf rekombinante Plasmide mit dem entsprechenden Antibiotikum supplementiert.

Für Dauerkulturen wurden die Zellen über Nacht inkubiert, anschließend 1:1 mit 70%igem Glycerin gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80°C gelagert.

2.2.2 Anzuchtbedingungen für *Arabidopsis thaliana*

Die Kultivierung von *Arabidopsis* erfolgte bei einer Temperatur von 22°C. Die Photoperiode bestand aus 16 Stunden Licht und 8 Stunden Dunkelheit.

Nicht sofort eingesetztes Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80°C gelagert.

Topfkultur

Zur Anzucht von Pflanzen in Erde wurde so genannte P-Erde Einheitserde, die mit PELIGRAN (Knauf Gips KG, Iphofen) in einem Verhältnis von 1:4 vermischt war, verwendet. Bei der Aussaat wurde die Erde mit dem Fungizid Previcur (Bayer Crop Science Deutschland GmbH) angegossen.

Sterilkultur

Die Anzucht von Pflanzen in Flüssigkultur erfolgte in 20 ml Ats-Medium in 100-ml-Erlenmeyerkolben unter langsamem Schwenken. Als Festmedium wurde ebenfalls Ats-Medium mit 8,0 g/l Agar in horizontalen Petrischalen verwendet. Für senkrechte Kulturen wurde die Konzentration von Agar auf 10 g/l erhöht.

Samensterilisation

Zur Oberflächensterilisation von Samen wurden diese in einem 2,0 ml Reaktionsgefäß in Sterilisationslösung für 20 Minuten geschüttelt, anschließend zweimal mit sterilem Wasser gewaschen und in 0,1%iger Agarose in H₂O bidest. aufgenommen. Vor der Aussaat wurden die Samen für 2 Tage bei 4°C stratifiziert.

2.2.3 Kreuzung von *Arabidopsis thaliana*

Zum Kreuzen wurden von ungeöffneten Knospen der als weiblicher Kreuzungspartner vorgesehenen Pflanze mit Hilfe einer Pinzette alle Blütenorgane mit Ausnahme des Stempels entfernt. Im Anschluss wurde eine geöffnete Blüte des männlichen Kreuzungspartners mit der Pinzette so am Blütengrund gefasst, dass sich die Blüte beim Zusammendrücken der Pinzette weit öffnete, und der Stempel des weiblichen Kreuzungspartners mit den Staubgefäßen des männlichen Partners bestäubt werden konnte.

2.2.4 DNA-Präparationen

2.2.4.1 Plasmidpräparation aus *E. coli* (Birnboim und Doly, 1979)

Von 1,5 ml einer Übernachtskultur in LB des entsprechenden Stamms wurden die Zellen geerntet (7000 rpm, 1 min, RT), der Überstand verworfen und das Sediment in 100 µl Lösung I resuspendiert. Anschließend wurden 100 µl Lösung II zugegeben und vorsichtig gemischt. Nach der Zugabe von 150 µl Lösung III wurde wiederum vorsichtig invertiert und für 15 Minuten bei 0°C inkubiert. Diese Mischung wurde zentrifugiert (13200 rpm, 15 min, RT) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Plasmid-DNA wurde mittels 400 µl Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation (13200 rpm, 20 min, RT) sedimentiert. Das Präzipitat wurde zweimal mit je 750 µl 70%igem Ethanol von Salzresten befreit, anschließend getrocknet und in 30 – 40 µl H₂O aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei – 20°C.

2.2.4.2 Isolierung von genomischer DNA aus *A. thaliana* (Fulton *et al.* 1995)

Unmittelbar vor Beginn der Präparation wurde der DNA-Präparationspuffer vorbereitet. Es wurden 50 – 100 mg Blattmaterial in einer Retschmühle in Gegenwart von 200 µl Präparationspuffer zerkleinert, danach weitere 500 µl Präparationspuffer zugegeben, gründlich durchmischt und für 30 – 120 min bei 65°C inkubiert. Sodann wurden die Proben mit 750 µl Chloroform/Isoamylalkohol (25:1) extrahiert und für 10 min bei 13200 rpm und RT zentrifugiert. Von der oberen Phase wurden 500 µl in ein neues Gefäß überführt und mit 400 µl Isopropanol gut vermischt. Durch Zentrifugation (13200 rpm, 10 min, RT) wurde die präzipitierte DNA sedimentiert, der Überstand entfernt und das Sediment mit 750 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Entfernen des Überstands wurde die DNA bei 65°C getrocknet, bis das Sediment glasig erschien. Die DNA wurde in 30 – 50 µl TE-Puffer oder H₂O aufgenommen und durch Inkubation bei 65°C für 15 min gelöst.

2.2.5 Präparation von kompetenten Zellen aus *E. coli* (Hanahan, 1985)

Aus einer *E. coli* Übernachtskultur in LB-Medium wurden 200 ml SOB-Medium in einem 500-ml-Kolben so angeimpft, dass die Kultur eine OD₆₀₀ von 0,1 hatte. Diese wurde bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von OD₆₀₀ = 0,5 – 0,6 geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (4000 rpm, 15 min, 4°C), das Sediment in 10 ml eiskaltem FSB-Puffer resuspendiert und für 15 – 30 min bei 0°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (4000 rpm, 15 min, 4°C) wurde das Sediment in 3 ml eiskaltem FSB-Puffer resuspendiert, mit 105 µl DMSO versetzt und wiederum für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden weitere 105 µl DMSO zugegeben, die Zellen in 200-µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80°C gelagert.

2.2.6 Transformation von *E. coli* Zellen (Hanahan, 1983)

Kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 100 – 500 ng DNA versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten auf Eis wurden die Zellen für 90 Sekunden einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und anschließend wieder bei 0°C inkubiert (max. 2 min). Zur phänischen Expression wurden die Zellen mit 800 µl SOC-Medium versetzt

und für 1 Stunde bei 37°C geschüttelt. Von dieser Zellsuspension wurden 300 µl auf Selektionsagarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.7 Isolierung von RNA aus *Arabidopsis thaliana*

In einem Reaktionsgefäß wurden 2 ml Phenol und 2 ml Tris/HCl (1,0 M, pH 9,0) vorgelegt. 1,0 g Pflanzenmaterial wurden im stickstoffgekühlten Mörser fein zerrieben und in dieses Reaktionsgefäß überführt. Diese Suspension wurde für mindestens eine Minute heftig geschüttelt und anschließend zentrifugiert (4000 rpm, 20 min, 4°C). Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt, mit 1,5 ml 3,0 M Natriumacetat versetzt, auf 15 ml mit 96%igem Ethanol aufgefüllt, gemischt und über Nacht bei – 20°C inkubiert. Nach Zentrifugation (4000 rpm, 30 min, 4°C) wurde das Präzipitat kurz getrocknet und in 600 µl H₂O gelöst. Die RNA wurde mit 200 µl 10 M LiCl über Nacht bei 4°C gefällt. Nach der Zentrifugation (13000 rpm, 30 min, 4°C) wurde das Sediment mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30 – 50 µl H₂O aufgenommen.

2.2.8 Denaturierende Agarosegelelektrophorese zur Trennung von RNA und Northern-Blotting

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung der RNA, wurde ein 1,2%iges Agarosegel in 1x MEN/20% Formaldehyd verwendet. Vor der Auftragung der RNA wurde diese mit dem gleichen Volumen Formamid, mit dem halben Volumen Formaldehyd, MEN (1x konzentriert) und 0,2 µl Ethidiumbromidlösung versetzt, für 15 Minuten bei 55°C denaturiert, mit BPB-Ladepuffer versetzt und anschließend bis zur Auftragung auf Eis gelagert.

Der Transfer der RNA auf positiv geladene Nylonmembran erfolgte mit 10x SSC als Transferpuffer für 10 bis 12 Stunden (Thomas, 1980). Zur Fixierung wurde die Membran in noch feuchtem Zustand mit UV-Licht gecrosslinked.

2.2.9 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten und Hybridisierung (Thomas, 1980)

Die Markierung von ds-DNA-Fragmenten erfolgt mit 50 μCi α -[^{32}P]-dCTP (3000 Ci/mmol) und dem Prime-It® II Random Primer Labeling Kit (Stratagene, La Jolla (USA)) nach Angaben des Herstellers. Die markierte DNA wurde mittels Nick Columns (Sephadex G-50 DNA Grade, Amersham Biosciences) aufgereinigt.

Für die Prähybridisierung wurde die Membran zunächst für 1 – 2 h in Hybridisierungslösung bei 65 °C geschwenkt. Anschließend wurde die Hybridisierungslösung erneuert und zu dieser die hitzedenaturierte (95°C, 10 min) radioaktiv markierte DNA-Sonde hinzugegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 65°C über Nacht. Nicht gebundene Sonde wurde anschließend in zwei Waschschrinen (je 1 – 2 h mit Waschlösung I und Waschlösung II) bei 65°C abgespült. Die Detektion erfolgte mit Röntgenfilmen bei – 80°C.

2.2.10 Präparation des Gesamtproteins aus *Arabidopsis thaliana*

Zur Extraktion des Gesamtproteins aus *Arabidopsis* wurden ca. 100 – 200 mg Pflanzenmaterial in Anwesenheit von 100 – 200 μl Extraktionspuffer bei 4°C in einem Mörser zerrieben. Diese Suspension wurde in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei 4°C inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (13200 rpm, 10 min, 4°C) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.2.11 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe des Proteinbestimmungs-Kits (BioRad, München) nach der Methode von Bradford (1976) spektralphotometrisch bestimmt. Als Referenzsubstanz diente Rinderserumalbumin (BSA).

2.2.12 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung von Proteinen erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese in einem diskontinuierlichen Gelsystem nach der Methode von Laemmli (1970) mit einem

5% Sammel- und einem Trenngel, dessen Acrylamid-Bis-Acrylamidkonzentration je nach Anwendung zwischen 8 bis 15% betrug. Analytische Gelelektrophoresen wurden bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA durchgeführt. Im Anschluss wurden die Gele mit Coomassie-Brilliant-Blue R-250 gefärbt (Merril, 1981) oder für einen Western-Blot weiterverwendet.

2.2.13 Immobilisierung von Proteinen auf PVDF-Membran

Zur Western-Blot-Analyse wurden Proteine nach analytischer SDS-PAGE in einer Elektroblottkammer bei einer konstanten Stromstärke von 50 mA über Nacht auf PVDF-Membran übertragen (modifiziert nach Towbin *et al.* 1979). Die Membran wurde zuvor 30 s in Methanol, 2 min in bidest. H₂O und 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Die erfolgreiche Übertragung wurde durch eine reversible Ponceau-Färbung überprüft. Durch mehrmaliges Waschen in bidest. H₂O konnte die Färbung komplett rückgängig gemacht werden.

2.2.14 Immunodetektion immobilisierter Proteine

Zum Nachweis immobilisierter Proteine wurde die Membran 2 – 8 Stunden mit Blocking-Puffer (3% fettfreie Trockenmilch in T-PBS-Puffer) inkubiert und anschließend 2 h mit dem primären Antikörper behandelt, der 1:1000 in Blocking-Puffer verdünnt wurde. Überschüssiger Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen (je 10 min) in T-PBS-Puffer entfernt. Danach erfolgte eine zweistündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Anti-rabbit-IgG-Peroxidase-Konjugat) der 1:2000 in Blocking-Puffer verdünnt wurde. Überschüssiger Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen (je 10 min) in T-PBS-Puffer entfernt. Der indirekte Nachweis des Erstantikörpers erfolgte durch den Chemilumineszenzfarbstoff Luminol als Substrat der Peroxidase nach Angaben des Herstellers (Amersham, Freiburg und Pierce, Rockford). Die Membran wurde anschließend auf Röntgenfilmen (Kodak X-Omat) nach Angaben des Herstellers exponiert.

2.2.15 Heterologe Genexpression in *E. coli*

Als Wirtsorganismen für die Expression heterologer Gene wurden *E. coli* BL21(DE3) pLysS oder *E. coli* Rosetta 2 verwendet. Hierzu wurden 20 ml LB-Medium, 1% Glucose enthaltend, 1:10 mit einer ÜN-Kultur des plasmidtragenden *E. coli* Stamms angeimpft und bei 37°C geschüttelt (180 rpm). Bei Erreichen einer $OD_{600} = 0,8$ wurde die Expression durch IPTG-Zugabe (1,0 mM final) für 1 – 4 h induziert. Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation (6000 rpm, 15 min, RT) geerntet.

2.2.16 Aufreinigung von GST-getagtem Protein aus *E. coli*

Das Zellsediment wurde in 1,0 ml eiskaltem GST-Lysispuffer pro 10 ml Kultur resuspendiert und die Zellen durch Ultraschall aufgeschlossen. Nach einer Inkubation von 20 min auf Eis wurden unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation (13000 rpm, 10 min, 4°C) entfernt. Der Überstand wurde in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und für 1 h mit einer 50%igen Suspension Glutathion-Agarose-Beads (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) unter leichtem Schwenken bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde für 30 sec bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Glutathion-Agarose-Beads dreimal mit je 1 ml GST-Lysispuffer gewaschen. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE.

2.2.17 Pulldown (Co-Affinitätsaufreinigung)

Aus jedem *in vitro* Translationsansatz (durchgeführt nach Angaben des Herstellers) wurden nach der Translation 1-2 µl entnommen, um später die eingesetzte Proteinmenge (*input*) abschätzen zu können. Das Restvolumen wurde zu gleichen Teilen auf zwei 1,5 ml Mikrozentrifugationsgefäße aufgeteilt, da jeder Ansatz mit einem GST-Fusionsprotein von einer Kontrolle mit GST begleitet wurde. Einem Ansatz wurde 1 µg GST zugegeben (Negativkontrolle), dem zweiten Ansatz 1 µg GST-Fusionsprotein. Die Ansätze wurden mit kaltem Bindepuffer auf 200 µl aufgefüllt und für vier Stunden bei 4°C unter Schwenken inkubiert. Die Proben wurden fünf Mal mit 1 ml eisgekühltem Bindepuffer gewaschen (4°C, 5 min, Schwenker) und danach jeweils abzentrifugiert (4000 rpm, 20 sec, 4°C). Nach dem Waschen wurden die Agarose-Beads in 4x Laemmli-Puffer aufgenommen

und für 10 min auf 90°C erhitzt. Nach dem Aufkochen inkubierten die Proben 2 min auf Eis. Anschließend wurde der gesamte Ansatz mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

Die Trenngele wurden nach dem Lauf durch Anlegen eines Vakuums für 60 min bei 60°C auf 3 mm Whatmanpapier getrocknet. Die durch *in vitro* Transkription/Translation [³⁵S]-markierten Proteine wurden anschließend durch Autoradiographie sichtbar gemacht.