

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Chemikalien, Lösungsmittel, Enzyme und Oligonukleotide

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Laborchemikalien im analytischen Reinheitsgrad von den Firmen Merck (Darmstadt), GibcoBRL (Eggenstein), Biorad (München), Amersham Pharmacia (Freiburg), Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Fluka (Buchs, Schweiz) oder Serva (Heidelberg) bezogen. Organische Lösungsmittel stammten von Carl Roth GmbH (Karlsruhe) und Merck (Darmstadt). Die verwendeten Radiochemikalien α -[³²P]-dATP und α -[³²P]-UTP wurden von ICN Pharmaceuticals (Irvine, USA) geliefert.

Restriktionsenzyme, Ribonuklease A, DNA-Polymerasen und T4-DNA-Ligase wurden von Boehringer (Mannheim), Roche Diagnostics (Mannheim), GibcoBRL (Eggenstein), Appligene (Heidelberg), Promega (Madison, USA) oder Amersham Pharmacia (Freiburg) bezogen.

Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert. Eine Liste der verwendeten Oligonukleotide befindet sich im Anhang.

2.1.2 Pflanzenmaterial

Als pflanzlicher Modellorganismus wurde *Arabidopsis thaliana* verwendet. Aus der großen Kollektion bekannter Ökotypen dieser Art wurden für die Untersuchungen die zur Zeit am besten charakterisierten Ökotypen *Columbia* und *Landsberg* ausgewählt. Durch das *Arabidopsis*-Genomprojekt und andere Sequenzierprojekte ist nahezu die gesamte DNA-Sequenz des Erbguts dieser beiden Ökotypen bekannt (*Arabidopsis Genom Initiative* 2000). Für die Sequenzpolymorphismen zwischen den Genomen der beiden verwendeten Ökotypen existiert eine für nichtkommerzielle Anwender kostenfrei zugängliche Datenbank der Firma Cereon[®] Genomics (Cambridge).

Weiterhin wurde für Komplementationsanalysen die im Ökotyp *Landsberg* durch Transposonmutagenese erzeugte Mutante *ttg2-1* (*transparent testa glabra 2*) (Johnson *et al.* 2002) verwendet, die freundlicherweise von David Smyth (*Monash University*, Victoria, Australien) zur Verfügung gestellt wurde.

2.1.3 Medien für die Kultur der Pflanzen

Die Kultivierung von *Arabidopsis thaliana* erfolgte überwiegend auf einem Gemisch von gleichen Teilen Sand und Einheitserde ED 73 (Einheitserde Werkverband, Sinntal-Jossa). Die Anzucht axenischer Ganzpflanzen von *Arabidopsis thaliana* erfolgte auf einem modifizierten Medium nach Murashige und Skoog (1962), bezogen von Sigma-Aldrich (Deisenhofen). Zur Herstellung festen Mediums für Selektionsplatten wurden 8 g/l Bacto-Agar zugesetzt.

2.1.4 Mikroorganismen

Der Bakterienstamm *Escherichia coli* DH 5 α wurde als Wirt für die zu klonierende DNA eingesetzt. Die relevanten genetischen Marker dieses Stammes sind: F-O- endA1 hsdR17 ($r_k^- m_k^+$) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 Δ (lacZYA-argF) deoR U169 (ϕ 80d lacZ Δ M15) (Woodcock *et al.* 1989).

Zur Klonierung von PCR-Produkten mit Hilfe des TOPO TA Cloning[®] Systems und One Shot[™] - TOP10-Zellen wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli* TOP10 verwendet. Die relevanten genetischen Marker dieses Stammes sind: F- mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) f80lacZDM15 D(lacX74) deoR recA1 araD139 D(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG (Invitrogen; Groningen, Niederlande).

Zur Übertragung von DNA auf Pflanzenzellen wurde *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 pMP90 verwendet (Koncz und Schell 1986).

2.1.5 Bakterielle Nährmedien

Die Vermehrung der Bakterienstämme von *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens* bzw. die Selektion der erhaltenen Klone erfolgte auf LB-Medium (10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl). Zur Herstellung festen Mediums für Selektionsplatten wurden 15 g/l Bacto-Agar zugesetzt. Für die Plasmidselektion wurden die Antibiotika Ampicillin (100 mg/l) und Kanamycin (50 mg/l) verwendet. Bestand bei einer Klonierung die Möglichkeit der Nutzung des lacZ α -Systems zur Selektion von Rekombinaten, wurden die Selektionsplatten mit je 40 μ l X-Gal- (20 mg/ml) und IPTG-Lösung (100 mM) bestrichen. Für die Kultur von *Agrobacterium tumefaciens*

GV3101 pMP90 wurden dem Medium die Antibiotika Gentamycin (10 mg/l) und Rifampicin (100 mg/l) zugesetzt. Die Bestandteile des Kulturmediums wurden von der Firma DifcoLab (Detroit, USA) bezogen. Für die Selektion wurden die Antibiotika der Firma Duchefa (Haarlem, Niederlande) verwendet.

2.1.6 Vektoren

In Tabelle 1 sind die während der Arbeit verwendeten Plasmide mit Angabe ihrer wichtigsten Merkmale, der Verwendung und der Herkunft aufgelistet.

Tab. 1: Verwendete Vektoren.

Vektor	Merkmale	Verwendung / Referenz
pBluescript [®] II KS (+)	Amp ^r , MCS, LacZ α , M13-Primerbindungsstellen	Klonierungsvektor / Stratagene (Heidelberg)
pGEM [®] -3Zf(+)	Amp ^r , MCS, LacZ α , M13-Primerbindungsstellen	Klonierungsvektor / Promega (Madison, USA)
pCR [®] 2.1(-TOPO)	Amp ^r , Kan ^r , MCS, LacZ α , M13-Primerbindungsstellen	Klonierungsvektor für PCR-Produkte/ Invitrogen (Groningen, Niederlande)
PSR- <i>luc</i> +	Amp ^r , MCS, <i>LUC</i> +	Herkunft des optimierten Luciferasegens / Promega (Madison, USA)
pRT100	Amp ^r , MCS, CaMV-35S-Promotor, CaMV-35S-Poly-A-Signal	Herstellung von Expressionskassetten für die Pflanzentransformation / Töpfer <i>et al.</i> (1987)
pRT101	Amp ^r , MCS, CaMV-35S-Promotor, CaMV-35S-Poly-A-Signal	Herstellung von Expressionskassetten für die Pflanzentransformation / Töpfer <i>et al.</i> (1987)
pBIN m-gfp5-ER	Kan ^r , CaMV-35S-Promotor T-DNA- <i>borders</i> , <i>NPT II</i> , <i>m-gfp5-ER</i> , Poly-A-Signal	Herkunft des GFP-Reportergens / Haseloff <i>et al.</i> (1997)
pGPTV-KAN	Kan ^r , T-DNA- <i>borders</i> , <i>NPT II</i> , GUS	Binärer Vektor zur Pflanzentransformation mittels <i>Agrobacterium tumefaciens</i> / Becker <i>et al.</i> (1992)
pCB302	Kan ^r , MCS, T-DNA- <i>borders</i> , <i>BAR</i>	Binärer Vektor zur Pflanzentransformation mittels <i>Agrobacterium tumefaciens</i> / Xiang <i>et al.</i> (1999)
BAC-Klon F3G5 (AC005896.2)	pBeloBAC, Kan ^r , MCS	enthält ca. 120 kb genomische Sequenz von <i>Arabidopsis thaliana</i> Ökotyp <i>Columbia</i> / ABRC-DNA Stock Center (Columbus, USA)

2.2 Angewandte Methoden

2.2.1 Isolation pflanzlicher Gesamt-DNA

Mit der Methode nach Brandstädter *et al.* (1994) wurde Gesamt-DNA aus Blattmaterial in einer für die angewandten Verfahren und enzymatischen Reaktionen hinreichenden Qualität isoliert. Zur Präparation wurden 3 - 5 Blätter in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit flüssigem Stickstoff eingefroren, mit Hilfe eines vorgekühlten Glasstabes fein zermörsert und in 1 ml Extraktionspuffer (100 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM EDTA; 500 mM NaCl; 10 mM β -Mercaptoethanol; 1,5 % SDS) aufgenommen. Nach gründlichem Suspendieren des Materials wurde für 10 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden 300 μ l essigsaurer Kaliumacetat-Lösung (3 M Kaliumacetat; 2 M Essigsäure) zugegeben und für mindestens 10 min im Eisbad inkubiert. Zur Sedimentation der Zelltrümmer wurde 15 min bei 20000 x g zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 μ l Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Mischung (25:24:1) extrahiert. Nach Trennung der Phasen durch Zentrifugation für 6 min bei 6000 x g wurde die DNA aus der wässrigen Oberphase mit 500 μ l Isopropanol ausgefällt und durch Zentrifugation für 10 min bei 20000 x g sedimentiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 μ l 10 mM Tris-HCl pH 8,0 mit 100 μ g/ml RNase A aufgenommen.

2.2.2 Isolation von Plasmid-DNA

Die auch unter der Bezeichnung *Boiling Lysis* bekannte Methode (Holmes und Quigley 1981) wurde zur Präparation von Plasmiden aus Bakteriensuspensionskulturen genutzt. Die erzielte Reinheit der isolierten Plasmid-DNA war für alle Anwendungen ausreichend. Zur Präparation wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur sedimentiert und das Pellet in 500 μ l eiskalter STET-Lösung (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM EDTA; 8 % (w/v) Saccharose; 5 % Triton X 100) und 20 μ l Lysozym-Lösung (20 mg/ml) resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension in einem Heizblock für 2 min bei 100°C aufgeköcht und erneut 5 min auf Eis stehen gelassen. Durch Zentrifugation für 15 min bei 20000 x g wurden die Zelltrümmer abgetrennt und die Plasmid-DNA in einem neuen Reaktionsgefäß aus dem Überstand mit 500 μ l Isopropanol gefällt. Nach 10 min Zentrifugation bei 20000 x g wurde das Pellet mit

70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl 10 mM Tris-HCl pH 8,0 mit 100 µg/ml RNase A aufgenommen.

2.2.3 Isolation von RNA

Zur Isolation von Gesamt-RNA aus Blattmaterial für *Northern*-Analysen und RT-PCR-Experimente wurde die Trizol[®]-Methode entsprechend den Angaben des Herstellers (GibcoBRL) angewandt. Dazu wurden jeweils 3 - 5 Blätter in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit flüssigem Stickstoff eingefroren, mit Hilfe eines Glasstabes möglichst fein zerstoßen und in 1 ml Trizol suspendiert (Vortex). Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 240 µl Chloroform zugegeben, gemischt und wieder 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Phasentrennung wurde zentrifugiert (10 min, 6000 x g). Aus der Oberphase wurde die RNA mit 1 Volumen Isopropanol ausgefällt und abzentrifugiert (10 min, 20000 x g). Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl Wasser aufgenommen.

2.2.4 Erzeugung, Klonierung und Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Zu klonierende DNA-Fragmente wurden entweder durch PCR oder durch Restriktion von Plasmiden gewonnen. Die sequenzspezifische Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsenzymen wurde unter Beachtung der vom jeweiligen Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen und optimalen Inkubationstemperaturen durchgeführt. Je µg DNA wurden 1 bis 5 U Enzym eingesetzt und für 1 bis 12 h inkubiert. Die Reinigung und Isolation restringierter DNA von Restriktionsenzymen und ungeschnittenen Vektormolekülen erfolgte nach gelelektrophoretischer Auftrennung durch Elution der Fragmente mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden). Anschließend wurden die Restriktionsfragmente mittels Ligase in entsprechend linearisierte Vektoren kloniert. Für den Ligationsansatz wurde das Fragment mit Vektor-DNA in einem molaren Verhältnis von 5:1 bis 10:1 gemischt. Die Ligation erfolgte mit 1 U T4-DNA-Ligase über Nacht bei 14°C in einem Gesamtvolumen von 20 µl.

Zu klonierende PCR-Produkte wurden zur Verringerung von PCR-Fehlern mit *Pfu*-Polymerase (*proof reading*-Funktion) amplifiziert. Im Anschluß wurde diesen PCR-

Produkten bei 72°C mit *Taq*-DNA-Polymerase ein 3'-überhängendes Adenosin-Nukleotid angehängt. Die Fragmente wurden dann über die Topoisomerasefunktion des pCR[®]2.1-TOPO-Vektors entsprechend den Angaben des Herstellers (Invitrogen) in diesen Vektor ligiert.

Die Sequenzierung der klonierten PCR-Produkte erfolgte nach der Methode des *Cycle Sequencing* mit fluoreszenzmarkierten Primern (IRD 700 bzw. 800, MWG-Biotech) auf einem LICOR 4000L oder LICOR 4200 (MWG-Biotech). Die Sequenzdaten wurden mit Hilfe der DNA*STAR-Software (Lasergene; Madison, USA) analysiert.

2.2.5 RT-PCR-Analysen

Die semiquantitativen RT-PCR-Experimente wurden mit dem *Ready-to-go RT-PCR-Kit* von Amersham Pharmacia (Freiburg) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Ausgangsmaterial wurde jeweils 1 µg RNA eingesetzt. Zur quantitativen Kontrolle wurde der RT-PCR-Ansatz vor Zugabe des Primers für die Erststrangsynthese geteilt und parallel ein ca. 600 bp-Fragment des *Arabidopsis*-Elongationsfaktors 1α in 20 Zyklen amplifiziert. Alle Primer wurden in einer Endkonzentration von 0,5 µM verwendet und die PCR-Bedingungen den Primern und der Länge des zu amplifizierenden Bereiches angepaßt.

2.2.6 Agarosegelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte in horizontalen Agarosegelen in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat pH 7,8; 2 mM EDTA) oder TBE-Puffer (100 mM Tris-Borat pH 8,3; 1 mM EDTA) bei Spannungen von 1 bis 6 V/cm und Agarosekonzentrationen zwischen 0,3 und 3 %. Die Agarosegele enthielten zum Anfärben der DNA 0,5 µg/ml Ethidiumbromid. Den Proben wurde zum Auftragen auf das Gel 0,2 Volumen Stoppuffer (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 120 mM EDTA; 50 % Glycerin; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau) zugesetzt. Als Größenmarker wurde bei der Elektrophorese eine 1 kb DNA-Leiter der Firma GibcoBRL aufgetragen.

Die elektrophoretische Auftrennung von RNA erfolgte in 1%igen horizontalen Agarosegelen in MOPS-Puffer (40 mM MOPS-NaOH pH 8,0; 50 mM Natriumacetat; 10 mM EDTA) bei einer Spannung von 3 V/cm. Die Agarosegele enthielten 50 %

Formamid und 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zum Anfärben der RNA. Den Proben wurde zum Auftragen auf das Gel 0,1 Volumen Ladepuffer (40 mM MOPS-NaOH pH 8,0; 1 mM EDTA; 50 % Glycerin; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau) zugesetzt.

Zur Dokumentation von im Agarosegel aufgetrennter RNA bzw. DNA-Fragmente wurde das Geldokumentationssystem Cybertech CS1 (Cybertech, Berlin) in Verbindung mit einem Transilluminator verwendet.

2.2.7 *Nuclear Run-On* Transkription

Die Methode wurde nach Dehio und Schell (1994) durchgeführt. Zur Präparation der Zellkerne wurden 5 g der in Flüssigkultur angezogenen Pflanzen in flüssigem Stickstoff eingefroren und in einem Mörser zu einem feinen Pulver zerstoßen. Alle weiteren Schritte der Kernpräparation wurden im Eisbad bzw. bei 4°C durchgeführt. Das Material wurde in 40 ml Puffer A [250 mM Saccharose; 10 mM NaCl; 10 mM MES pH 6,6; 5 mM EDTA; 0,15 mM Spermin-HCl, 0,5 mM Spermidinphosphat; 0,2 mM Pefabloc[®] (Promega); 20 mM Merkaptoethanol] mit 0,6 % Triton X-100 und 2 % Dextran T40 suspendiert und mit Hilfe eines Ultraturrax homogenisiert. Nach Filtration durch ein 50 µm-Nylonsieb wurde 5 min bei 1500 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml desselben Puffers resuspendiert, auf einen Stufengradienten (jeweils 3,5 ml 2 M Saccharose, 80 % Percoll, 60 % Percoll und 40 % Percoll in Puffer A) geladen und 15 min bei 1000 x g zentrifugiert. Die Zellkerne wurden aus der Interphase zwischen Saccharose und 80 % Percoll abgenommen und mit 10 Volumen Puffer B (50 mM Tris-HCl pH 7,8; 5 mM MgCl₂; 10 mM Merkaptoethanol; 20 % Glycerin) gewaschen und danach 5 min bei 3000 x g zentrifugiert. Nach der Wiederholung des Waschschrittes wurde das Pellet erneut in Puffer B resuspendiert. Ein Aliquot der Suspension wurde mit DAPI angefärbt und mit Hilfe einer Zählkammer unter einem Fluoreszenzmikroskop die Anzahl der Zellkerne bestimmt. Anschließend wurde die Kernsuspension mit Puffer B auf eine Dichte von 10⁴ Zellkerne pro µl eingestellt und als 300 µl Aliquots bei -70°C gelagert. Zur *in-vitro*-Transkription wurde mit einem 300 µl Aliquot der Zellkernsuspension in einem Endvolumen von 400 µl eine Endkonzentration von 40 mM Mg(NH₄)₂SO₄; 0,5 mM MnCl₂; je 0,5 mM ATP, CTP, GTP und α-[³²P]-UTP eingestellt und 30 min bei 29°C inkubiert. Durch Zugabe von 32 µl Hefe-rRNA (5 mg/ml), 40 µl Puffer C (200 mM HEPES pH 7,6; 5 mM MgCl₂; 5 mM CaCl₂) und 150 Units RNase-freie DNase I wurde die Reaktion beendet. Nach

einer Inkubation für 30 min bei 37°C wurden 50 µl Puffer D (100 mM Tris-HCl pH 7,5; 50 mM EDTA, 10 % SDS) und 4 µl Proteinase K (10 mg/ml) zugegeben und 25 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde der Ansatz mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) extrahiert und aus dem Überstand die nicht eingebauten Nukleotide mit *ProbeQuant*[®] *G-50 Micro Columns* (Amersham Pharmacia) abgetrennt. Jeder der erzeugten Ansätze wurde zum Hybridisieren identischer Filter mit jeweils 200 ng *LUC*-, *NPT II*-, *EF1 α*- und 25S-(Kartoffel)-rRNA-Fragment eingesetzt.

2.2.8 Hybridisierungsexperimente

Für DNA-Hybridisierungsexperimente (*Southern*) wurden die Agarosegele nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA für 30 min in Denaturierungslösung (1 M NaOH; 1,5 M NaCl) inkubiert und anschließend zweimal 30 min in Neutralisierungslösung (1 M Tris-HCl pH 7,4; 1,5 M NaCl) gewaschen. Die so vorbereitete DNA wurde durch Kapillarblottechnik mit 20xSSC (0,3 M Natriumcitrat-Puffer pH 7,4; 3 M NaCl) aus dem Gel auf ungeladene Nylon-Membranen (Amersham Pharmacia) transferiert und im Stratalinker (Stratagene, La Jolla, USA) durch UV-Bestrahlung kovalent an die Membran gekoppelt.

Die als Sonden zur Hybridisierung verwendeten DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des *Megaprime DNA-labelling Kits* (Amersham Pharmacia) mit 50 µCi α-[³²P]-dATP nach den Angaben des Herstellers radioaktiv markiert. Nicht eingebaute Nukleotide wurden durch eine anschließende Gelfiltrationschromatographie mit *ProbeQuant*[®] *G-50 Micro Columns* (Amersham Pharmacia) abgetrennt. Die Menge der in die DNA-Fragmente eingebauten Radioaktivität wurde in dem Mikroquantifizierer QC4000 XER (Bioscan) quantifiziert. Die Hybridisierung der membrangebundenen DNA mit den radioaktiv markierten DNA-Fragmenten erfolgte unter Verwendung des ExpressHyb[®]-Puffers (Clontech) nach dem Protokoll des Herstellers. RNA-Hybridisierungsexperimente (*Northern*) wurden unter Auslassung der Denaturierungs- und Neutralisierungsschritte in gleicher Weise durchgeführt. Die Analyse der Autoradiographien erfolgte mit Hilfe des PhosphoImagers Storm II der Firma Molecular Dynamics (Krefeld).

2.2.9 Transformation von *Escherichia coli*

Die auf Mandel und Higa (1970) zurückgehende Methode zur Übertragung isolierter DNA auf CaCl₂-behandelte Zellen führte zu ausreichenden Transformationsraten. Zur Herstellung kompetenter Zellen wurde eine 50 ml LB-Flüssigkultur mit 1 ml einer Übernachtskultur von *Escherichia coli* DH5 α beimpft und bis zu einer OD₅₅₀=0,3 kultiviert. Nach dem Abkühlen der Kultur im Eisbad wurden die Zellen für 5 min bei 3000 x g sedimentiert. Anschließend wurde das Pellet in 25 ml 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und für 30 min im Eisbad inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 2,5 ml 50 mM CaCl₂-Lösung aufgenommen und sofort transformiert oder nach Zugabe von 15 % Glycerin bei -70°C als 200 μ l-Aliquotes aufbewahrt. Zur Transformation wurde ein 200 μ l Aliquot kompetenter Zellen im Eisbad aufgetaut und maximal 20 μ l einer Lösung des zu transformierenden Plasmids zugegeben. Nach Inkubation für 1 h im Eisbad erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 2 min. Anschließend wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und die Zellen für 1 h bei 37°C und 160 Upm im Schüttelinkubator kultiviert. Zur Selektion auf transformierte Zellen wurden 100 μ l des Ansatzes auf eine Selektionsplatte ausplattiert und für ca. 24 h bei 37°C bebrütet.

2.2.10 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Mit der auf Höfgen und Willmitzer (1988) zurückgehende Methode zur Übertragung isolierter DNA auf Agrobakterien wurden ausreichende Transformationsraten erzielt. Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden 2 - 4 ml einer Übernachtskultur von *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 in 100 ml LB-Flüssigmedium mit 10 mg/l Gentamycin und 100 mg/l Rifampicin gegeben und für 6 - 10 h im Schüttelinkubator bei 28°C und 160 Upm kultiviert. Nach dem Abkühlen der Kultur im Eisbad wurden die Zellen für 10 min bei 3000 x g sedimentiert. Anschließend wurden die kompetenten Zellen in 1 ml LB-Medium resuspendiert, zu jeweils 200 μ l aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C aufbewahrt. Zur Transformation wurde ein 200 μ l Aliquot kompetenter Zellen im Eisbad aufgetaut, 1 - 5 μ g Plasmid-DNA zugegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz in flüssigem Stickstoff für 5 min eingefroren. Als Hitzeschock wurden die Zellen für 5 min in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurden die Zellen für 2 - 4 h bei 28°C und 160 Upm im Schüttelinkubator kultiviert. Zur Selektion auf

transformierte Zellen wurden 100 µl des Ansatzes auf eine Selektionsplatte ausplattiert und ca. 48 h bei 28°C bebrütet.

2.2.11 Anzucht des Pflanzenmaterials

Die Anzucht von *Arabidopsis thaliana* auf Erde erfolgte in einer Phytokammer der Firma Heraeus (Hanau) bzw. in Klimaschränken von Percival Scientific Inc. (Perry, USA) unter Kurztagbedingungen mit 8 Stunden Licht bei 23°C und 16 Stunden Dunkelheit bei 20°C sowie einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60 %. Zur Induktion der Blütenbildung wurden die Pflanzen in Kulturschränke mit Langtagbedingungen (16 Stunden Licht und 8 Stunden Dunkelheit) oder in Gewächshauskammern mit Tageslicht und Zusatzbeleuchtung umgeräumt.

Die axenischen Ganzpflanzenkulturen von *Arabidopsis thaliana* wurden durch Aussaat oberflächensterilisierter Samen auf MS-Medium erzeugt. Zum Sterilisieren wurden die Samen ca. 20 Minuten mit Natriumhypochlorid-Lösung (6 % freies Chlor) inkubiert und anschließend dreimal mit sterilem Wasser gewaschen. Die Kultur erfolgte in Petrischalen auf MS-Medium mit 0,8 % Bacto-Agar bei 26 - 28°C und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 16 h : 8 h.

Die Anzucht der Pflanzen für die Untersuchung zum Einfluß der Hemmstoffe 5-Azacytidin und Trichostatin A erfolgte unter sterilen Bedingungen in 24-Loch-Platten mit je 1 ml MS-Flüssigmedium, dem unterschiedliche Mengen Hemmstoff zugesetzt wurden.

2.2.12 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 öffnet. Dadurch stehen die Staubgefäße frei nach außen, so daß damit der Stempel des weiblichen Kreuzungspartners bestäubt werden kann. Die Bestäubung der präparierten Stempel wurde zweimal im Abstand von ca. 24 h wiederholt.

2.2.13 Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die Agrobakterien-vermittelte Transformation von *Arabidopsis thaliana* erfolgte nach der Vacuuminfiltrationsmethode (Bechtold *et al.* 1993) bzw. der Blütentauchmethode (*floral dip*) (Clough und Bent 1998). Für beide Methoden wurden zunächst 500 ml LB-Medium mit 50 mg/l Kanamycin, 100 mg/l Rifampicin und 10 mg/l Gentamycin mit einer 50 ml Agrobakterien-Übernachtskultur angeimpft und erneut über Nacht bei 28°C kultiviert. Anschließend wurden die Agrobakterien abzentrifugiert (20 min, 4000 x g).

Für die Vakuuminfiltrationsmethode wurde das Bakterienpellet in 200 ml Infiltrationsmedium (0,5 x MS-Medium, 3 % Saccharose, 0,044 µM BAP) aufgenommen. Die Blütenstände von gerade mit dem Blühen beginnenden Pflanzen wurden in diese Suspension getaucht und einem Vakuum ausgesetzt, bis an Stamm und Blüten starke Bläschenbildung zu beobachten war. Nach der Infiltration wurden die Blütenstände mit Wasser gewaschen und vorsichtig abgetupft.

Für die Blütentauchmethode wurde das Bakterienpellet in 100 ml einer 5 %igen Saccharose-Lösung mit 0,05 % Silwet L-77 aufgenommen. In diese Suspension wurden die Blütenstände und Blattrosetten von gerade mit dem Blühen beginnenden Pflanzen für einige Sekunden getaucht.

Die infiltrierten bzw. getauchten Pflanzen wurden für 24 Stunden dunkel gestellt und dann bis zum Reifen der Samen unter Langtagbedingungen kultiviert.

In Abhängigkeit von dem verwendeten Selektionsmarker wurden zwei verschiedene Methoden für die Selektion transgener Pflanzen angewandt. Transgene Pflanzen mit Kanamycin- bzw. Hygromycinresistenz als Selektionsmarker wurden durch Aussaat oberflächensterilisierter Samen auf zuckerfreiem MS-Medium mit 50 mg/l des entsprechenden Antibiotikums von nicht transgenen Pflanzen getrennt. Die Kultur erfolgte bei 26 - 28°C unter Langtagbedingungen. Nach 10 - 14 Tagen wurden die überlebenden Pflanzen auf Erde umgesetzt.

Für die Selektion transgener Pflanzen mit dem *BAR*-Gen als Resistenzmarker wurden die Pflanzen auf Erde kultiviert und im Keimblattstadium mit einer 1:5000-Verdünnung des Herbizids Basta® (Hoechst Schering AgrEvo GmbH) besprüht. Falls erforderlich wurde die Behandlung im Abstand von 3 - 5 Tagen wiederholt, bis eine ausreichende Selektion der transgenen Pflanzen erkennbar war. Die Kultur erfolgte bei 23°C unter Kurztagbedingungen.

2.2.14 Mutagenese von *Arabidopsis thaliana*

Die Mutagenese von *Arabidopsis thaliana* mit EMS erfolgte nach Leyser und Furner (1992). Zunächst wurden die zu mutagenisierenden Samen über Nacht in 13,4 mM KCl-Lösung vorgequollen. Im Anschluß wurden die Samen 4 Stunden in einer Lösung von 100 mM Natrium-Phosphat-Puffer pH 5,0 mit 5 % DMSO und 90 mM EMS inkubiert. Durch zweimaliges Waschen für 15 Minuten mit 100 mM Natriumthiosulfatlösung wurde das EMS zerstört. Danach wurde zweimal 15 Minuten mit Wasser gewaschen. Die mutagenisierten Samen wurden anschließend mit Hilfe einer Pipette und etwas Wasser gleichmäßig auf Erde ausgesät.

2.2.15 Kartierung der Mutationsorte

Die Kartierung der Mutationsorte erfolgte durch die Analyse der Segregation von bekannten Sequenzpolymorphismen (mittels CAPS-Markern für *cleaved amplified polymorphic sequence*) oder Sequenzlängenpolymorphismen (mittels SSLP-Markern für *simple sequence length polymorphism*) zwischen 2 verschiedenen Ökotypen von *Arabidopsis thaliana*. Dazu wurden aus der F₂-Generation von Kreuzungen zwischen dem *Arabidopsis*-Ökotyp *Landsberg* und der jeweiligen Mutante mit dem genetischen Hintergrund des *Arabidopsis*-Ökotyps *Columbia* wieder homozygote Mutanten selektiert. In dieser Kartierungspopulation wurden die zu untersuchenden Sequenzbereiche mit Hilfe der PCR unter Verwendung von spezifischen Primerpaaren (s. Anhang) amplifiziert und bei SSLP-Markern direkt bzw. bei CAPS-Markern nach einem Restriktionsschritt hinsichtlich der Polymorphismen analysiert. Dazu wurden die PCR- bzw. Restriktionsprodukte in 3 %igen Gelen aus gleichen Teilen Agarose und *Low Melting*-Agarose (Biozym, Hessisch Oldendorf) in TBE-Puffer (s. Kap. 2.2.6) entsprechend ihrer Größe getrennt. Ist keine Kopplung zwischen dem untersuchten Marker und dem Mutationsort vorhanden, sind die Sequenzbereiche der beiden Ökotypen i.a. statistisch gleich verteilt. Tritt bei der Analyse der Polymorphismen in der Kartierungspopulation eine eindeutige Anreicherung des *Columbia*-Sequenzbereichs auf, so ist dieser Marker mit der Mutation gekoppelt. Je stärker die Kopplung, desto näher ist der Mutationsort bei dem untersuchten Marker.

2.2.16 Nachweis von Luciferase, β -Glucuronidase und GFP

Die Bestimmung der Luciferaseaktivität in transgenen Pflanzen erfolgte ausschließlich *in vivo* mit einem Kamerasystem der Firma Hamamatsu Photonic Deutschland GmbH (Herrsching) unter Verwendung der Argus 50-Software des Kameraherstellers. Das für die Enzymreaktion erforderliche Substrat Luciferin wurde als Natriumsalz eingesetzt und von der Firma Molecular Probes (Oregon, USA) bezogen. Die Pflanzen wurden mindestens 10 Minuten vor Beginn der Messung mit Luciferinlösung (1,3 mM) besprüht. Axenische Flüssigkulturen wurden so mit Luciferin versetzt, daß eine Endkonzentration von 50 μ M vorlag. Bei der Messung wurden die emittierten Photonen mit einer CCD-Kamera erfasst und die Photonendichte in Form eines Falschfarbenbildes dargestellt, wobei weiß hohe und dunkelblau niedrige Photonendichte symbolisiert. Die Sensitivität der Kamera wurde auf einer Skala von 0 bis 10 bei allen Messungen auf den Wert 7 eingestellt. Für die Aufspreizung der Farbskala (*BitRange*) wurde für alle Darstellungen die empfindlichste Einstellung (0-3) gewählt.

Zum Nachweis der β -Glucuronidaseaktivität (GUS) wurden von den zu untersuchenden Pflanzen jeweils 2 Blätter abgeschnitten und für ca. 24 h bei 37°C in 2 ml Reaktionspuffer (50 mM Natriumphosphat pH 7,0, 10 mM EDTA, 0,1 % Triton, 0,1 % N-Lauryl-Sarkosin, 0,1 % β -Mercaptoethanol, 1 mg/ml X-Gluc) inkubiert. Anschließend wurden die Blätter zum Entfärben dreimal für jeweils ca. 24 h bei 4°C mit 70 %igem Ethanol gewaschen.

Der Nachweis des für die Expression in *Arabidopsis* genetisch optimierten GFP (grün fluoreszierendes Protein) (m-gfp5-ER) wurde entsprechend den Angaben der Hersteller (Haseloff *et al.* 1997) durchgeführt. Das verwendete GFP hat zwei Anregungsmaxima bei 395 nm und 473 nm und ein Fluoreszenzmaxima bei 510 nm. Zur Nutzung des Anregungsmaxima von 473 nm (z. B. Argon-Laser) stand kein geeignetes Gerät zur Verfügung. Für die Anregung des zweiten Maxima bei 395 nm wird vom Hersteller die Verwendung einer UV-Handlampe als geeignetes Gerät empfohlen. Entsprechend erfolgten die Untersuchungen zur GFP-Expression in einer Dunkelkammer mit Hilfe einer UV-Handlampe bzw. unter Verwendung des Gerätes Fluotest[®] (Heraeus, Hanau), einer Kammer zur Betrachtung von Dünnschichtchromatogrammen.