

7 Anhang

7.1 Herstellung der Expressionskassetten

Das Luciferase-Reportergen wurde über die Schnittstellen Nco I und Xba I aus dem Vektor pSP-*luc*⁺ in den ebenfalls Nco I und Xba I geschnittenen Vektor pRT100 kloniert. Dadurch entstand der Vektor pRT100-LUC mit einer Reporter-Expressionskassette, bestehend aus dem Luciferase-Reportergen unter Kontrolle des CaMV-35S-Promotors und dem CaMV-35S-Poly-A-Signal als Transkriptionsstop.

Das GUS-Reportergen wurde aus dem Vektor pGPTV-KAN über die Schnittstellen Ecl 136 II (Sst I) und Sma I in den Sma I geschnittenen Vektor pRT101 kloniert, so daß der Vektor pRT101-GUS entstand.

Das GFP-Reportergen wurde zunächst mit Hilfe der Schnittstellen Hind III und Ecl 136 II aus dem Vektor pBIN m-gfp5-ER isoliert und in Hind III und Sma I geschnittenen Vektor pRT101 ligiert. Anschließend wurde das Gen über die flankierenden Bam HI-Schnittstellen noch einmal in ebenfalls Bam HI geschnittenen Vektor pRT100 umklont. Zuletzt wurde zur Beseitigung unerwünschter Schnittstellen in diesem Vektor pRT100-GFP durch Restriktion mit Ecl 136 II und Sma I und anschließende Religation die Schnittstellen Ecl 136 II (Sst I), Kpn I und Sma I deletiert, so daß der Vektor pRT100-EX-GFP entstand.

7.2 Modifizierung des Vektors pGPTV-KAN

Zur Vorbereitung auf die Klonierung der verschiedenen Expressionskassetten wurde zunächst von der T-DNA des binären Transformationsvektors pGPTV-KAN das GUS-Reportergen und das pAnos-Transkriptionsterminationssignal durch Restriktion mit Eco RI und Sma I deletiert. Das nach der Eco RI-Restriktion überhängende Ende wurde mittels Klenow-Polymerase aufgefüllt und der Vektor als pGPTV-KAN-EX durch *blunt-end* Ligation rezirkularisiert.

Zur Klonierung der GFP-Expressionskassetten wurde dieser Vektor darüber hinaus noch durch das Einfügen einer MCS (*multicloning site*) in die Bam HI-Schnittstelle am 3'-Ende von *NPT II* modifiziert. Dadurch wurde das Ersetzen des *NPT II*-Terminators pAg7 durch den pAnos-Terminator erforderlich. Deshalb wurde zunächst das pAnos-Transkriptionsterminationssignal aus dem Vektor pGPTV-KAN durch Restriktion mit

Eco RI und Sst I isoliert und in Eco RI und Sma I geschnittenen pBluescript-Vektor ligiert. In den so entstandenen Vektor pBluescript-pAnos wurde die MCS des Vektors pGEM über die Restriktionsschnittstellen Hind III und Eco RI kloniert, so daß der Vektor pBluescript-pAnos-Multi entstand. Anschließend wurde ein Bam HI-Fragment dieses Vektors, das den pAnos-Terminator und einen Teil der MCS repräsentiert, in den ebenfalls Bam HI geschnittenen pGPTV-KAN-EX ligiert, so daß der Vektor pGPTV-KAN-EX-Multi entstand.

7.3 Herstellung der T-DNA-Konstrukte

Konstrukt LUC 1:

Die Luciferase-Expressionskassette wurde aus dem Vektor pRT100-LUC über die flankierenden Hind III-Schnittstellen in den ebenfalls Hind III geschnittenen pGPTV-KAN-EX kloniert, so daß die Vektoren pGPTV-LUC(→)-KAN und pGPTV-LUC(←)-KAN (Konstrukt LUC 1) mit der Luciferase-Expressionskassette jeweils in verschiedener Orientierungen auf der T-DNA entstanden.

Konstrukte LUC 2 und LUC 3:

Zunächst wurde die Luciferase-Expressionskassette aus pRT100-LUC über die Schnittstellen Pst I und Hinc II in den ebenfalls Pst I und Hinc II geschnittenen Vektor pGEM kloniert. Aus dem so entstandenen Vektor pGEM-LUC wurde die Expressionskassette über die Restriktionsschnittstellen Hind III und Kpn I in den oben beschriebenen Vektor pBluescript-pAnos kloniert, so daß der Vektor pBluescript-pAnos-LUC entstand. Anschließend wurde aus diesem Vektor ein aus der Luciferase-Expressionskassette und dem pAnos-Signal bestehendes Bam HI-Fragment in die ebenfalls Bam HI geschnittenen Vektoren pGPTV-LUC(→)-KAN und pGPTV-LUC(←)-KAN ligiert, so daß die Vektoren pGPTV-LUC(→)-KAN-LUC(←) (Konstrukt LUC 2) und pGPTV-LUC(←)-KAN-LUC(←) (Konstrukt LUC 3) entstanden.

Konstrukte LUC 4 und LUC 5:

Zur Herstellung des 2xLUC-Motivs dieser Konstrukte wurde eine Luciferase-Expressionskassette aus pRT100-LUC über die flankierenden Pst I-Schnittstellen in durch partielle Restriktion nur einer Pst I-Schnittstelle linearisierten Vektor pRT100-

LUC ligiert, so daß der Vektor pRT100-2xLUC entstand. Zur Konstruktion des Vektors pGEM-2xLUC wurde die LUC-Expressionskassette ebenfalls über die flankierenden Pst I-Schnittstellen in den mit Pst I geschnittenen Vektor pGEM-LUC kloniert. Anschließend wurde die 2xLUC-Kassette aus dem Vektor pRT100-2xLUC über die flankierenden Hind III-Schnittstellen in den ebenfalls Hind III geschnittenen pGPTV-KAN-EX kloniert, so daß die Vektoren pGPTV-2xLUC(←)-KAN und pGPTV-2xLUC(→)-KAN mit den zwei Luciferase-Expressionskassetten jeweils in entgegengesetzter Orientierungen auf der T-DNA entstanden. Weiterhin wurde die 2xLUC-Kassette des Vektors pGEM-2xLUC als ein Hind III-Kpn I-Fragment in den Vektor pBluescript-pAnos kloniert, so daß der Vektor pBluescript-pAnos-2xLUC entstand. Zuletzt wurde aus diesem Vektor ein aus der 2xLUC-Kassette und dem pAnos-Signal bestehendes Bam HI-Fragment in die ebenfalls Bam HI geschnittenen Vektoren pGPTV-2xLUC(←)-KAN und pGPTV-2xLUC(→)-KAN ligiert, so daß die Vektoren pGPTV-2xLUC(←)-KAN-2xLUC(←) (Konstrukt LUC 4) und pGPTV-2xLUC(→)-KAN-2xLUC(←) (Konstrukt LUC 5) entstanden.

Konstrukt GUS 1:

Die GUS-Expressionskassette wurde aus dem Vektor pRT101-GUS über die flankierenden Hind III-Schnittstellen in den ebenfalls Hind III geschnittenen pGPTV-KAN-EX kloniert, so daß der Vektor pGPTV-GUS-KAN (Konstrukt GUS 1) entstand.

Konstrukte GUS 2 und GUS 3:

Zur Herstellung des 2xGUS- bzw. 3xGUS-Motives dieser Konstrukte wurde die GUS-Expressionskassetten aus pRT101-GUS über die flankierenden Pst I-Schnittstellen in durch partielle Restriktion nur einer Pst I-Schnittstelle linearisierten Vektor pRT101-GUS kloniert, so daß die Vektoren pRT101-2xGUS und pRT101-3xGUS entstanden. Um die Wahrscheinlichkeit der Entstehung des 3xGUS-Motives zu erhöhen, wurde mit einem ca. zwanzigfachen Fragmentüberschuß ligiert. Anschließend wurde die 2xGUS bzw. 3xGUS-Kassette aus dem entsprechenden Vektor über die flankierenden Hind III-Schnittstellen in den ebenfalls Hind III geschnittenen pGPTV-KAN-EX kloniert, so daß die Vektoren pGPTV-2xGUS-KAN (Konstrukt GUS 2) bzw. pGPTV-3xGUS-KAN (Konstrukt GUS 3) entstanden.

Konstrukt GFP 1:

Die GFP-Expressionskassette wurde aus dem Vektor pRT100-EX-GFP über die flankierenden Hind III-Schnittstellen in den ebenfalls Hind III geschnittenen Vektor pGPTV-KAN-EX-Multi kloniert, so daß der Vektor pGPTV-GFP-KAN-Multi (Konstrukt GFP 1) entstand.

Konstrukt GFP 2:

Zunächst wurde die GFP-Kassette aus pRT100-EX-GFP über die flankierenden Hind III-Schnittstellen isoliert und die nach der Restriktion überhängenden Enden des Fragments mit Klenow-Polymerase aufgefüllt. Anschließend wurde dieses Fragment in Sma I geschnittenen Vektor pGPTV GFP-KAN-Multi kloniert, so daß der Vektor pGPTV-GFP-KAN-GFP-Multi (Konstrukt GFP 2) entstand.

Konstrukte GFP 3 und GFP 4:

Zur Herstellung des 2xGFP- bzw. 3xGFP-Motives dieser Konstrukte wurde die GFP-Expressionskassetten aus pRT100-EX-GFP über die flankierenden Pst I-Schnittstellen in durch partielle Restriktion nur einer Pst I-Schnittstelle linearisierten Vektor pRT100-EX-GFP kloniert, so daß die Vektoren pRT100-EX-2xGFP und pRT100-EX-3xGFP entstanden. Um die Wahrscheinlichkeit der Entstehung des 3xGFP-Motives zu erhöhen, wurde mit einem ca. zwanzigfachen Fragmentüberschuß ligiert. Anschließend wurde die 2xGFP bzw. 3xGFP-Kassette aus dem entsprechenden Vektor über die flankierenden Hind III-Schnittstellen in den ebenfalls Hind III geschnittenen pGPTV-KAN-EX kloniert, so daß die Vektoren pGPTV-2xGFP-KAN (Konstrukt GFP 3) bzw. pGPTV-3xGFP-KAN (Konstrukt GFP 4) entstanden.

Konstrukt zur transgenen Expression von *TTG2*

Zur transgenen Expression von *TTG2* (Locus F3G5.5) wurde ein genomischer Klon des Wildtypallels (s. Kap. 3.5) mit Hilfe der auf den Primern WRKY2 F und WRKY2 R vorgesehenen Restriktionsschnittstellen für die Endonukleasen Xho I und BamH I aus dem Klonierungsvektor pCR2.1 ausgeschnitten und in den Expressionsvektor pRT100 ligiert. Die entstandene Expressionskassette aus CaMV-35S-Promotor, *TTG2*-Gen und CaMV-Poly-A-Signal wurde über die beiden flankierenden Pst I-Schnittstellen in die T-DNA des binären Vektors pCB302 kloniert. Anschließend wurde unter Verwendung der Primer WRKY-Promo und WRKY2 R ein 2640 bp genomisches Fragment amplifiziert, welches neben dem *TTG 2*-Gen ca. 1 kb der Promotorregion dieses Gens repräsentiert.

Da diese PCR mit *Pfu*-Polymerase an genomischer DNA keine hinreichenden Produktmengen lieferte, wurde 0,5 µl einer Plasmidpräparation des BAC-Klons F3G5, der den entsprechenden Bereich des *Arabidopsis*-Genoms beinhaltet, als Template verwendet. Durch Nutzung der endogen in diesem Fragment vorhandenen Restriktionsschnittstellen für EcoR I (1001 bp *upstream* des vorhergesagten Translationsstarts) und Hind III (93 bp *downstream* des vorhergesagten Translationsstarts) wurde ein 1094 bp-Fragment erzeugt, das die Promotorregion von *TTG2* repräsentiert. Anschließend wurde der binäre Vektor pCB302 mit der CaMV-35S-*TTG2*-Expressionkassette ebenfalls mit EcoR I und partiell Hind III geschnitten und der CaMV-35S-Promotor durch das endogene Promotorfragment ersetzt.

7.4 Verwendete molekulare Marker

Tab. 7: Verzeichnis der verwendeten molekularen Marker.

| Name | Marker-Typ | Assoziierter Locus | Referenz | Primer-Sequenzen |
|-------------|----------------|--------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| NGA63 | SSLP | At1g09910 | Bell und Ecker (1994) | ACCCAAGTGATCGCCACC AACCAAGGCACAGAAGCG |
| NGA248 | SSLP | At1g28280 | Bell und Ecker (1994) | TCTGTATCTCGGTGAATTCTCC TACCGAACCAAAACACAAAGG |
| T27K12-SP6 | SSLP | At1g42460 | Bell und Ecker (1994) | GGAGGCTATACGAATCTTGACA GGACAACGTCTCAAACGGTT |
| NGA280 | SSLP | At1g55840 | Bell und Ecker (1994) | GGCTCCATAAAAAGTGCACC CTGATCTCACGGACAATAGTGC |
| F5I14-49495 | SSLP | At1g65550 | Joseph Ecker (TAIR Accession: Person 4624) | CTGCCTGAAATTGTGCGAAAC GGCATCACAGTTCTGATTCC |
| NGA111 | SSLP | At1g72650 | Bell und Ecker (1994) | TGTTTTTTAGGACAAAATGGCG CTCCAGTTGGAAGCTAAAGGG |
| NGA1145 | SSLP | At2g02540 | Bell und Ecker (1994) | GCACATACCCACAACCAGAA CCTTCACATCCAAAACCCAC |
| CIW3 | SSLP | At2g14890 | Stewart Gillmor (TAIR Accession: Person 6556) | GAAACTCAATGAAATCCACTT TGAACCTGTTGTGAGCTTTGA |
| PLS2 | SSLP | At2g29290 | Eva Huala (TAIR Accession: Person 4602) | TACGCGAATTATTTTTAGGAGA AATTTATTTTGAGTCGGATGC |
| PLS7 | SSLP | At2g23030 | Eva Huala (TAIR Accession: Person 4602) | GATGAATCTTCTCGTCCAAAAT GACAACTAAACAACATCCTTCTT |
| NGA1126 | SSLP | At2g27330 | Bell und Ecker (1994) | GCACAGTCCAAGTCACAACC CGCTACGCTTTTCGGTAAAG |
| NGA361 | SSLP | At2g31070 | Bell und Ecker (1994) | ACATATCAATATATATAAGTAGC AAAGAGATGAGAATTTGGAC |
| M323 | CAPS (Mbol) | At2g35580 | Punita Nagpal (TAIR Accession: Person 5761) | GCTTTGCTTGGCTTGAACAG CGTTGAAGAAGCCTGAAGT |
| VE017 | CAPS (PstI) | At2g36830 | Oliver Vugrek (TAIR Accession: Person 1333) | GAGCAATCCAGTAGAGGATA CTTGAAGCTTAAATCTCAGC |

Fortsetzung Tab. 7

| | | | | |
|---------------|-------------------|-----------|------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| SNP T1J8 | SSLP | At2g36920 | abgeleitet von CER459104 | GCGGATGATGAATTTAGGCTCCG GTATGAGGGACTAATGAGACCGC |
| SNP T2N18 | SSLP | At2g37050 | abgeleitet von CER460216 | CTCATGATACAGAAAAGGTG GCGGAAGCTGAAGATACAAGAC |
| SNP F3G5 | SSLP | At2g37410 | abgeleitet von CER451984 | TTGCCCAAAGTAAAGAAAAG AAGACGGGTAAACAGACAACAACA |
| SNP F13M22 | CAPS (BclI) | At2g37585 | abgeleitet von CER449020 | GCTCATGGTTAGGCTTCTT ACGCAAACATTCTCCACAC |
| T8P21 E | CAPS (SspI) | At2g37720 | abgeleitet von CER425265 | GTTGAAGTTCAAGATCCG CTATATCAAGAGGTGGGC |
| NGA168 | SSLP | At2g39010 | Bell und Ecker (1994) | GAGGACATGTATAGGAGCCTCG TCGTCTACTGCACTGCCG |
| T7D17 | CAPS (BglII) | At2g40800 | Julie Nardone (TAIR Accession: Person 5079) | GCCATAAGGAACTTTTTGTG GAGGACATCTTTATCAAACC |
| BIO2 | SSLP | At2g43360 | Bell und Ecker (1994) | TTAACAGAAACCCAAAGCTTTC TGACCTCCTCTTCCATGGAG |
| NGA172 | SSLP | At3g03340 | Bell und Ecker (1994) | CATCCGAATGCCATTGTTC AGCTGCTTCCTTATAGCGTCC |
| NGA126 | SSLP | At3g10050 | Bell und Ecker (1994) | CAAGAGCAATATCAAGAGCAGC GAAAAACGCTACTTTCGTGG |
| NGA162 | SSLP | At3g13960 | Bell und Ecker (1994) | CTCTGTCACTCTTTTCCTCTGG CATGCAATTTGCATCTGAGG |
| SNP K14A17 | SSLP | At3g17150 | abgeleitet von CER454965 | AAATTTTAATCGGTGAAGTTGTTGTT CTTAGAGACGGAGATGAGATAGTTTA |
| SNP MKP6 | SSLP | At3g17580 | abgeleitet von CER456162 | TTAAAATCAACATCAAAACAACAAA TGATCTATTAAGTACACAAAAGTCTC |
| SNP MEB5 | SSLP | At3g17880 | abgeleitet von CER455528 | AAAAGTAAAATGGGAAAAGATAAAAACA ATACCTCGCCCTACTCGCAACATA |
| SNP MRC8 | SSLP | At3g18210 | abgeleitet von CER456919 | ACTGTGCCTTTGAGCCTGTAGC CTGGTTAGATGATGGTTGGTAGAAGATA |
| SNP MYF24 | SSLP | At3g18530 | abgeleitet von CER457760 | AAAAACCCACTAAAAACCAATAATA CCAGAGGCCTCAAAACATAAT |
| SNP MVE11 | SSLP | At3g18770 | abgeleitet von CER457440 | CAAGTAAATTAGTGAGCCGAGGACGAC GGAGGAAACAAAACAGATTAAGAGAA |
| SNP MCB22 | SSLP | At3g18850 | abgeleitet von CER477120 | GCGAGCCACGAGCCAAAGA CCTGCAGGTGAAGTATGTTGTGTT |
| SNP MLD14 | SSLP | At3g19460 | abgeleitet von CER456185 | GCTACAGTTCTCAACCGTAAATCTCTGC ACCTTGAAACGAAACTGTTGGGCTCAGT |
| ATDMC1 | SSLP | At3g22880 | Eva Huala (TAIR Accession: Person 4602) | GCAACTGAATTTGTTTTCGTTTG TTGATTAGTGATCCGCAAACAA |
| SNP F5N5 | SSLP | At3g22890 | abgeleitet von CER473922 | TAGCCAAGTACAAAACGAT TCCCATACATATAGAAAAGCCAAAGT |
| G4711 | CAPS (HindIII) | At3g24620 | Eva Huala (TAIR Accession: Person 4602) | CCTGTGAAAACGACGTGCAGTTTC ACCAAATCTTCGTGGGCTCAGCAG |
| GAPAB | SSLP | At3g26650 | Bell und Ecker (1994) | TCCTGAGAATTCAGTGAACCC CACCATGGCTTCGGTACTT |
| NGA6 | SSLP | At3g62220 | Bell und Ecker (1994) | ATGGAGAAGCTTACACTGATC TGGATTTCTTCTCTCTTCAC |
| NGA8 | SSLP | At4g08830 | Bell und Ecker (1994) | TGGCTTTCGTTTATAAACATCC GAGGGCAAATCTTTATTTCCG |

Fortsetzung Tab. 7

| | | | | |
|---------------|------|-----------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| NGA1139 | SSLP | At4g34390 | Bell und Ecker (1994) | TTTTTCCTTGTGTTGCATTCC TAGCCGGATGAGTTGGTACC |
| NGA151 | SSLP | At5g14480 | Bell und Ecker (1994) | CAGTCTAAAAGCGAGAGTATGATG GTTTTGGGAAGTTTTGCTGG |
| SO262 | SSLP | At5g27670 | Bell und Ecker (1994) | ATCATCTGCCCATGGTTTTT TTGCTTTTTGGTTATATTCGGA |
| NGA76 | SSLP | At5g28470 | Bell und Ecker (1994) | AGGCATGGGAGACATTTACG GGAGAAAATGTCACCTCCACC |
| SNP T2L5 | SSLP | At5g34890 | abgeleitet von CER460190 | ATGCCGTCGGAAATAGTGAG CGAAGCTGAAGCAAATGTCA |
| SO191 | SSLP | At5g37780 | Bell und Ecker (1994) | CTCCACCAATCATGCAAATG TGATGTTGATGGAGATGGTCA |
| CIW9 | SSLP | At5g42600 | Stewart Gillmor (TAIR Accession: Person 6556) | CAGACGTATCAAATGACAAATG GACTACTGCTCAAATATTCGG |
| CER 454907 | SSLP | At5g49960 | abgeleitet von CER454907 | AATCATTTTTACCGCCACAA GACAGTCATCGCATAAAATAAAGAAT |
| CER 455613 | SSLP | At5g50780 | abgeleitet von CER455613 | TTGGGGAAGTTGTAAGCAGT CATGATCAAAGCCACCTAAAACCACAAT |
| CER 455938 | SSLP | At5g51790 | abgeleitet von CER455938 | AGCTTTCGAATATTTATGGTGGTG CAATGATAAAATGAGTGAAGGAACAA |
| CER 457042 | SSLP | At5g52070 | abgeleitet von CER457042 | ACGTGAGTAGGAGGAAGC TGGACATGGATAAAAGCACAA |
| CER 457578 | SSLP | At5g52880 | abgeleitet von CER457578 | AACAGTGTAGCAGAAAAGGATTA GAAAGTGGGGTAGGTTAGTTG |
| CER 454368 | SSLP | At5g53360 | abgeleitet von CER454368 | TATGTTCAACCTGTAAATCAAGA CAGCACACTCCGAGCCAGCATA |
| CER 456100 | SSLP | At5g54095 | abgeleitet von CER456100 | TCCTCTTGTTTTGGTGGCTCAGTC AGTTGTCACAGAAAAGAAGGAAGA |
| CIW10 | SSLP | At5g60960 | Stewart Gillmor (TAIR Accession: Person 6556) | CCACATTTTCCTTCTTTCATA CAACATTTAGCAAATCAACTT |
| MBK-5 | SSLP | At5g63640 | Bell und Ecker (1994) | GAGCATTTACAGAGACG ATCACTGTTGTTTACCATTA |
| SNP K1F13 | SSLP | At5g66430 | abgeleitet von CER454435 | GACTCCAGACACGAAGCACA GATGGCTGAGATCGTGAACA |
| SNP MUD21 | SSLP | At5g66850 | abgeleitet von CER457294 | CCCCTTCAAACCTCACTCCAA GTACTGGATGGCACCAGAGG |
| SNP K3G17 | SSLP | At5g67260 | abgeleitet von CER454685 | TCCTTTGTTGTTTTGTTCAATCTT TCGAACCTGTCTCGCTTCTT |

7.5 Primer für Klonierung und Sequenzierung

Tab. 8: Verzeichnis der zur Klonierung und Sequenzierung verwendeten Primer.

| Name | Sequenz |
|-------------|----------------------------------|
| WRKY F3G5 F | CGTGCTTCATCATCAATCTCTCA |
| WRKY F3G5 R | CATTGCCTCCTACCACTTTTTGTC |
| WRKY-Promo | GACGAATCACAAAGGCAAGGAAGAAGTAG |
| WRKY2 F | CTCGAGGCTGAAGTAAAAGGTATTGGAAATGG |
| WRKY2 R | GCATGAATGGATCCTCAAATCAAATTGTTTGC |