

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Bakterienstämme / Bakterienanzucht und -behandlung

#### 2.1.1 verwendete Bakterien

In der Tabelle sind alle verwendeten *E.coli*-Stämme angegeben. Diese Stämme wurden von den Firmen Stratagene und Invitrogen erworben. Für alle Pflanzentransformationen wurde der *Agrobacterium tumefaciens*- Stamm GV3101 (Koncz et al., 1986) verwendet.

Bakterien	Genotyp	Verwendung
XL1-Blue MRF'	endA1, supE44, recA, thi-1, gyrA96, Δ(mcrA)183 relA1, Δ(mcrCb-hsdSMR-mrr)lac[F'proAB, lacIqZc ΔM15, Tn10]	Wirt für αZapI und ExAssist Phage
SOLR	e14-(mcrA, Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171, sbcC, Su αR[F'proAB, lacq ZΔM15] recB, recJ, umuC:TN5 uvrC, lac, gyrA96, relA, thi-1, endA1	Infektion mit Phagemid
DH5 □	F-, endA1, hsdR17, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA lacZ Δ M15	Wirt für pBs

#### 2.1.2 Verwendete cDNA-Bibliotheken

Für die Isolierung des Gens *OsSET1* wurden die Bibliotheken der λ-Phagen gt22 und ZapII verwendet. Für die λ-Phagen gt22 Bibliothek wurde RNA aus *Oryza sativa* (Kallus) isoliert. Die Fragmente variierten zwischen 1,2 kp und 1,8 kp.

Die λ-Phagen ZapII Bibliothek wurde aus RNA junger Blätter von *Oryza IR36* isoliert. Die Fragmentgrößen variierten zwischen 1,0 kp und 3,3 kp.

#### 2.1.3 Anzucht von *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli*-Zellen erfolgte in/auf LB-Medium/Agar. Sie wurden über Nacht bei 37°C unter Zusatz von 100µg/ml Amp. oder 50µg/ml Kan. [Ampicillin (ROTH); Kanamycin (DIAGONAL)] inkubiert.

Die Flüssigkultur wurde mit 180 rpm geschüttelt. Eine Selektion auf  $\beta$ -Galactosidase erfolgte mit X-Gal (20mg/l, ROTH).

#### **2.1.4 Präparation und Transformation kompetenter Agrobakterien**

Für die Präparation kompetenter Agrobakterien wurden 100 ml LB-Medium mit 100µg/ml Rifampicin, 10µg/ml Gentamycin mit einer Übernachtskultur überimpft. Die Zellen wurden für 10 min bei 4.000x g zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 2 ml 0.5x MS-Salzlösung resuspendiert und anschließend als 200 µl Aliquots eingefroren. Die Transformation (Höfgen & Willmitzer, 1988) kompetenter *Agrobakterien* erfolgte nach Zugabe von 1 µg Plasmid-DNA zu 200 µl kompetenter *Agrobacterium*-Suspension durch Inkubation auf Eis, in flüssigem Stickstoff und bei 37°C für je 5 Minuten. Nachfolgend wurde 1 ml LB-Medium zugesetzt und die Zellen für 4 Stunden bei 30°C, 150 rpm in Dunkelheit geschüttelt. Der Transformationsansatz wurde schließlich auf LB- Agarplatten mit 100 µg/ml Kanamycin, Rifampicin und 10µg/ml Gentamycin plattiert und bei 30°C für 2 Tage in Dunkelheit inkubiert.

Die Anzucht des *Agrobacterium tumefaciens*-Stammes GV3101 pMP90 (Koncz and Schell, 1986) erfolgte in LB-Medium bzw. auf LB-Platten bei 30°C unter Zusatz von 100 µg/ml Rifampicin (DUCHEFA), 10µg/ml Gentamycin (DUCHEFA) und gegebenenfalls 50 µg/ml Kanamycin (DIAGONAL).

## **2.2 *Arabidopsis thaliana***

### **2.2.1 Material und Anzucht von *Arabidopsis thaliana***

Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurde das Modellsystem *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia verwendet. Das Genom ist vollständig durch das *Arabidopsis*-Genomprojekt sequenziert (*Arabidopsis Genom Initiative*, 2000). Die Kultivierung von *Arabidopsis thaliana* erfolgte auf einem Gemisch aus 3 Teilen Einheitserde ED 73 (Einheitserde Werkverband, Sinntal-Jossa) und 1 Teil Vermiculite (Gärtnereibedarf Kammlott, Erfurt). Des weiteren wurden die SALK-Linien *suvh1* (N003675), *suvh2* (N079574), die Linie *35S::LUC2* (Hofmann, 2004) und die *ddm1-2* (Vongs et al., 1993) verwendet.

Für die Anzucht von Arabidopsispflanzen wurden die Samen für 10 Minuten in einer Natriumhypochlorit-Lösung (ca. 5 % aktives Chlor, 0,15 % Tween® 20) inkubiert. Nach Entnahme der Lösung wurden die Samen dreimal mit bidest. sterilem Wasser gewaschen.

Für die Verteilung der Samen auf Agarplatten [500ml: 1,0 x MS-Salze (DUCHEFA, 2.3g); 25g Saccharose; 6 g Agar-Select (GIBCO BRL); 50 µg/ml Kanamycin (DIAGONAL) oder Hygromycin (DUCHEFA)] wurden diese mit Hilfe von sterilem Wasser auf den Nähragar aufgebracht. Die sterilisierten Samen wurden auf Agarplatten mit 50µg/ml Kanamycin oder 50µg/ml Hygromycin gegeben. Die Keimung der Samen erfolgte für sieben bis zehn Tage unter Langtag-Bedingungen. Die Kanamycin-resistenten Samen wurden zur weiteren Anzucht auf Erde umgesetzt.

Die Kanamycin oder Hygromycin-Selektion in folgenden Generationen erfolgte nach der gleichen Methode. Hierzu wurden ca. 50 Samen einer transgenen Linie ausplattiert und unter Langtagbedingungen angezogen.

*Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia wurde als Wildtyp verwendet. Die Anzucht erfolgte in klimatisierten Phytokammern bei 24°C, 75% Luftfeuchtigkeit und 8h Licht (Kurztagbedingung) für ein vegetatives Wachstum und in Pflanzen-Anzuchtschränken (Percival) bei 24°C, 75% Luftfeuchtigkeit und 16h Licht (Langtagbedingung) für generatives Wachstum. Die Erde bestand aus einem Gemisch Einheitserde und Sand. *Arabidopsis thaliana* wurden für die Transformation und zur Gewinnung von Pflanzenmaterial in Töpfen angezogen. Alle zu untersuchenden Pflanzen wurde in Erde angezogen.

### **2.2.2 Kulturmedien für die Anzucht und Haltung der Pflanzen**

*Arabidopsis*-Samen wurden auf einem Festmedium nach Murashige und Skoog (1962) zur Keimung gebracht, dieses enthält 4,4g/l M&S Salz, 10g/l Agar sowie 30g/l Saccharose. Zur Selektion der T-DNA wurden die entsprechenden Antibiotika wie Kanamycin (50mg/l) bzw. Hygromycin (50mg/l, DUCHEFA, Harleem/ Niederlande) zu gegeben. Für die induzierbaren Konstrukte wurde in das Medium zusätzlich 0,01mM Dexamethason (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) gegeben. Reissamen wurden auf 2%-igen Select-Agar-Platten unter Wasser ausgelegt und entweder bei 30°C oder bei 37°C 8 Tage lang inkubiert. Es wurde darauf geachtet, daß die Körner ständig feucht gehalten wurden. Das Wasser wurde täglich gewechselt, um einem Schimmelbewuchs der Platten vorzubeugen.

### **2.2.3 Transformation in *Arabidopsis thaliana* mittels *Agrobacterium tumefaciens***

Die Pflanzentransformation erfolgte über Vakuuminfiltration von *Agrobacterium tumefaciens* in *Arabidopsis thaliana* (Bechthold et al., 1993). Hierfür wurden 500 ml LB-Medium (DUCHEFA) mit je 50 µg/ml Kanamycin, 100µg/ml Rifampicin und 10µg/ml Gentamycin mit 1 ml einer Vorkultur von *Agrobakterien* angeimpft und für ca. 24 h bei 28°C und 120 rpm angezogen. Die *Agrobakterien* wurden 10 Minuten bei 4.000x g pelletiert und 100ml Infiltrationsmedium (für 1 Liter: 1,0xMS-Salz einschließlich Vitaminen (4,5g, DUCHEFA); 20g Saccharose; 10µl BEP (1mg/ml im DMSO; SIGMA) resuspendiert. Für die Vakuuminfiltration wurde der Blütenstand der zu infiltrierenden Pflanzen (T0-Generation) in das *Agrobakterien* Infiltrationsmedium getaucht und nachfolgend für 15 Minuten in einem Exsikator einem Vakuum ausgesetzt. Anschließend wurden die Pflanzen mit Wasser abgewaschen und vorsichtig mit Papier abgetrocknet. Zur Regeneration wurden die Pflanzen anschließend für eine Nacht horizontal und abgedeckt an einen dunklen Ort gelagert. Nach drei bis vier Wochen unter Langtag Anzuchtbedingungen konnten die Samen der Pflanzen geerntet werden.

### **2.2.4 EMS- Mutagenese von Saatgut**

Für eine chemische Mutagenese von Arabidopsissamen wurden ca. 10.000 Samen (50 Samen ca.1 mg) über Nacht in einer 0,1%igen Kaliumchloridlösung vorgequollen und anschließend in einer Lösung von 90 mM Ethylmethansulfonat (EMS; MERCK) in 0,1 M Na-Phosphat pH 5,0 und 5 % DMSO 4 Stunden mutagenisiert.

Anschließend wurden sie 2 mal für 15 Minuten mit einer 100mM Natriumthiosulfatlösung die EMS-Lösung inaktiviert und 2 mal 15 Minuten mit Wasser gewaschen. Das mutagenisierte Saatgut (M1-Generation) wurde zunächst für eine Woche getrocknet.

Danach erfolgten die Behandlung der Samen und ihre Aussaat auf Selektionsplatten. Die Anzucht erfolgte in Töpfen auf Erde. Die Mutagenese von *Arabidopsis thaliana* mit EMS erfolgte nach Leyser und Furner (1992).

## 2.2.5 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.

Eine geöffnete Blüte des männlichen Kreuzungspartners wurde 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.

## 2.3 Plasmide und Konstrukte

### 2.3.1 Verwendete Expressionsvektoren

Bezeichnung	Quelle	Verwendungszweck
pKExtr	Van Den Ackerveken,G. et al., 1996 35*S Promotor Mindrinos,M. et al., 1994	transient Expression in Zwiebel-epidermiszellen
pKExtr-GFP	Van Den Ackerveken,G. et al., 1996 35*S Promotor Mindrinos,M. et al., 1994	smRS-GFP(327) über BamHI/SacI in pKExtr cloniert für transient Assay
pKExtr-GUS	Van Den Ackerveken,G. et al., 1996 35*S Promotor Mindrinos,M. et al., 1994	GUS aus pBI221(Clontech) über BamHI/SacI in pKExtr cloniert für transient Assay
pBI1.4tr	pBI121(Clontech)1.4 kb XbaI-HindIII -fragment vom Vektor pKEx4tr einschließlich MCS	Herstellung transgener Pflanzen
pBI1.4tr-myc/His	pBI121(Clontech)1.4 kb XbaI-SacI -fragment vom Vektor pKEx4tr einschließlich MCS, Klonierung 120Bp Fragment (myc/His- Tag von T.Jenuwein über SalI/EcoRI	Herstellung transgener Pflanzen

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Transformationsvektoren basieren auf der Verwendung der aufgeführten Plasmide. Der Promotor 35S\* wird konstitutiv expremiert und zeigt eine 40fach geringere Aktivität als der Ausgangspromotor. GVG ist ein Chimärenprotein, das durch Dexamethason aktiviert wird.

Für die Herstellung der Konstrukte wurden Endonukleasen der Firma MBI verwendet. Ihre Klonierung in dem entsprechenden Vektor erfolgte über eine T4- Ligase der Firmen PROMEGA bzw. MBI. Die Vektoren wurden mit folgender Methode in die *E.coli* gebracht. 2 µl Ligationsansatz (ca. 10 ng Vektor-DNA) werden zu ca. 50 µl kompetenten Zellen gegeben. Der Ansatz wird 30 min auf Eis inkubiert. Nach 20 s Hitzeschockbehandlung bei 37°C werden die Bakterien 2 min auf Eis inkubiert.

Nach der Transformation werden 0,6 ml LB- Medium zugegeben und der Transformationsansatz für mindestens 1 h bei 37°C geschüttelt. Die Zellen werden kurz zentrifugiert und auf entsprechenden Antibiotika- haltigen LB-Agarplatten ausplattiert.

### 2.3.2 verwendete Konstrukte

Die verwendeten Konstrukte für Transformation in *Arabidopsis thaliana* und den transienten Expressionsassay in Zwiebelepidermiszellen.

<b>kloniertes Gen (Länge in Bp)</b>	<b>verwendeter Vektor</b>	<b>verwendete Primer, Restriktionsenzyme</b>	<b>Bemerkung, Verwendung</b>
SUVH1 (1-2010)	pKEX4tr-GUS/GFP	SUVH1-start, Sall SUVH1-stop, Sall	gesamtes Gen (ORF) als GUS/GFP-Fusion für transienten Assay
SUVH1 (1-2010)	pBI 1.4tr-myc	SUVH1-start, Sall SUVH1-stop/stop, Sall	Herstellung transgener Linien <i>Arabidopsis thaliana</i>
SUVH1 (1-2010)	pTA7002-EGFP	SUVH1-start, Sall SUVH1-stop, Sall	EGFP-Fusion zur Herstellung von transgenen <i>Arabidopsis thaliana</i> mit induzierbarer Expression
SUVH2 (1-1953)	pKEX4tr-GUS/GFP	SUVH2-start, BamHI SUVH2-stop, BamHI	GUS/GFP-Fusion für transienten Assay
SUVH2 (1-1953)	pBI 1.4tr-myc	SUVH2-start, BamHI SUVH2-stop/stop, BamHI	myc-Fusion zur Herstellung transgener <i>Arabidopsis thaliana</i>
SUVH2 (1-1953)	pTA7002-EGFP	SUVH2-start Xho, XhoI SUVH2-stop Xho, XhoI	Herstellung von transgenen <i>Arabidopsis thaliana</i> mit induzierbarer Expression des Transgens
Clf (1-2709)	pKEX4tr-GUS/GFP	clf-A-Not, NotI clf-B-Not, NotI	gesamtes Gen (ORF) als GUS/GFP-Fusion für transienten Assay
SUVH3	pKEX4tr-GUS/GFP		gesamtes Gen (ORF) als GUS/GFP-Fusion für transienten Assay

### **2.3.3 Konstruktion des binären Vektors pBI 1.4tr**

Für die konstitutive Expression in Arabidopsis wurde ein geeigneter Vektor konstruiert, in welchen die untersuchten Proteine als myc-Fusionsproteine unter Kontrolle des CaMV 35S\*-Promotors exprimiert wurden. Der *CaMV 35S\**- Promotor (Mindrinos *et al.*, 1994) weist eine 40fach geringere Aktivität im Vergleich zum Ausgangspromotor auf. Ausgangspunkt der Konstruktion des pBI1,4t-myc Vektors war der binäre pBI121 Vektor (Clontech). In diesen wurde ein 1.4 Kb *HindIII/XbaI*- Fragment aus den pKEx4tr-Vektor eingebracht. Dieses beinhaltet eine MCS, den *CaMV-35S\**-Promotor und eine Terminatorsequenz der Nopalinsynthetase. Ein Konstrukt, welches eine 3-faches Repeat des *myc*- Gens (erhalten von T.Jenuwein) enthält, wurde über die *EcoRI/SalI*- Schnittstellen in den Vektor ligiert. In den resultierenden binären Vektor wurden die zu analysierenden Gene kloniert.

## **2.4 Molekularbiologische Arbeiten mit DNA**

### **2.4.1 Isolation von Plasmid- DNA nach alkalischer Methode (Birnboim und Doly, 1979)**

Eine Kolonie der transformierten *E.coli* wurde von einer Transformationsplatte entnommen und zu 1,8ml LB- Medium (100mg/l Ampicillin) gegeben. Die Kultur wurde für mindestens 6h bei 37°C geschüttelt und danach für 2min in einer Mikrozentrifuge sedimentiert, das Pellet in 0,3ml P1 (50mM Tris-HCl, pH8,0; 10mM EDTA; 100 g/ml RNase A) gelöst und nach Zugabe von 0,3ml P2 (200mM NaOH; 1% SDS) für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 0,3ml P3 (3M Kaliumazetat pH 5,5) wurde der Ansatz für 20min zentrifugiert. Zum Überstand wurde 1/10Vol 3M NaCl und 0,7Vol Isopropanol gegeben und die Suspension für 15min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit Ethanol (70%) gewaschen. Nach dem Trocknen erfolgte die Aufnahme in 30µl bidest. Wasser.

### 2.4.2 Präparative Plasmidisolierung

Zur Plasmid-DNA Isolation wurde der *rapid plasmid purification systems*- Kit der Firma Marligen verwendet. Die zu präparierenden Bakterienklone wurden in einer 2-5 ml LB-Schüttelkultur bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Nach dem Abzentrifugieren (10 Minuten, 5000 rpm) wurden die Kulturen nach den Angaben des Herstellers Marligen aufgearbeitet.

Die Aufreinigung der Plasmid- DNA erfolgt bei dieser Methode durch die Bindung der DNA an eine Anionenaustauscher-Säule, basierend auf SiO<sub>2</sub>. Nach dem Entfernen von Verunreinigungen durch Waschschriffe wird die DNA mit einem Hochsalzpuffer von der Säule eluiert, mit Isopropanol präzipitiert und mit 70% Ethanol entsalzt. Das getrocknete Pellet wird in 50µl Wasser resuspendiert.

### 2.4.3 Ligation

Für die Gelelution wurde der Kit QIAquick Spin der Firma QIAGEN verwandt. Das Prinzip der Gel Extraktion bzw. PCR Produkt Aufreinigung beruht auf der DNA-Bindung eines mindestens 300bp-Fragmentes an eine Silica-Membran in Gegenwart von Hochsalzpuffern. Die Verunreinigungen werden aus der Säule ausgewaschen.

Bei der Gelelution wird die zu isolierende DNA-Bande aus einem 0,8-1,5%igen Agarosegel ausgeschnitten und nach dem Protokoll des Herstellers Qiagen über eine Säule gereinigt. Anschließend wird die gereinigte DNA mit TE oder H<sub>2</sub>O von der Säule eluiert. Die Aufreinigung des PCR- Produktes erfolgte nach dem gleichen Prinzip.

Zunächst erfolgte eine Restriktion von Insert und Plasmid für mindestens 2h bei 37°C. Für die Restriktion wurden ca. 500ng Insert-DNA oder 100ng Plasmid , 1x Endonukleasepuffer und ca. 1U Endonuklease eingesetzt. Das Gesamtvolumen betrug 10µl und wurde mit sterilen bidest. Wasser aufgefüllt. Die Restriktionsansätze wurden in einen 1% Agarosegel getrennt und eluiert (QUIAGEN).

Die Restriktion der genomischen DNA erfolgte über Nacht und wurde in einem Gesamtvolumen von 100µl durchgeführt. Für den Ligationsansatz wurden 200ng Insert, 20ng Plasmid, 1,5µl Ligationspuffer, 1,0µl Ligase T4 (5U) verwendet. Der Ligationsansatz wurde mindestens für 4h bei 16°C inkubiert.

Die zu etablierenden Überexpressionskonstrukte wurden zuerst in den pGEM-T Vektor eingebracht und sequenziert, anschließend erfolgte die Klonierung in den binären Transformationsvektor pBI1.4tr- myc.



Die Klonierung der Sequenz myc (erhalten von T. Jenuwein) in den pBII.4tr erfolgte über die Restriktionsenzyme *Sall* und *EcoRI*.

Über die mit Hilfe der Primer etablierten Restriktionsschnittstellen konnten die Gene *OsSET1*, *CLF*, *SUVH1*, *SUVH2* und *SUVH3* aus den pGEM-T Vektor ausgeschnitten und in den pEKx4tr-GUS bzw. pEKx4tr-GFP im 5'-Bereich der Reportergene kloniert werden.

In diesem Schritt wurden die zu untersuchenden Gene *OsSET1*, *CLF*, *SUVH1*, *SUVH2* und *SUVH3* mit dem Reporter GUS bzw. GFP fusioniert.

#### **2.4.4 DNA Isolation *Arabidopsis***

Die Extraktion von genomischer DNA aus *Arabidopsis* wurde nach Brandstädter *et al.* (1994) durchgeführt. Drei bis fünf Blätter (100mg Blattmaterial) wurde in einem Porzellanmörser unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff mit einem Pistill zerkleinert. Das Pulver wurde in 1 ml Extraktionspuffer (100mM TRIS-HCl (pH8), 50mM EDTA, 500mM NaCl, 10mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 1,5% SDS) überführt und gemischt. Das Gemisch wurde 10 Minuten bei 65 °C inkubiert, vermischt und es erfolgte die Zugabe von 300 $\mu$ l Kaliumazetat (5M=3M Kaliumazetat und 2M Essigsäure). Diese Suspension wurde gemischt und für 10 Minuten bis 1 Stunde in Wassereis gekühlt. Anschließend wurden die Proben für 15min bei 12.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Lösung wurde in einem neuen Eppendorfgefäß mit einem Volumen Chloroform:Isoamylalkohol:Phenol im Verhältnis von 24:1:25 (v/v) gemischt, 5min bei RT inkubiert und 15 Minuten mit 10.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Der wässrigen Phase wurde das 0,7fache Volumen an Isopropanol zugesetzt, der Ansatz für mindestens 20 Minuten bei –20°C inkubiert und 10 Minuten mit 8000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500 $\mu$ l 70% Ethanol gewaschen und für mindestens 1h bei 37°C getrocknet.. Das getrocknete Pellet wurde in 100  $\mu$ l TE-Puffer (pH 8,0) gelöst, mit 10  $\mu$ g DNase-freier RNase A versetzt und der Ansatz 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Resuspension des Pellets erfolgte über Nacht bei 4- 8°C.

#### **2.4.5 Southern-Analyse**

Die genomische Reis DNA wurde mit den Restriktionsenzymen *BstI*, *XbaI* und *SstI* geschnitten, in einem Agarosegel getrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Als radioaktiv markierte Sonde war ein 200bp-Fragment der SET-Domäne verwendet worden.

Für die Analyse wurde genomische DNA aus *Arabidopsis* isoliert und mit Endonukleasen geschnitten. Die Trennung der geschnittenen DNA erfolgte in einem Agarose Gel einschließlich eines Transfers auf einer Nylonmembran. Diese wurde mit einer Sonde für *SUVH1* bzw. *SUVH2* hybridisiert.

Die Anzahl der T-DNA's wurde auch mittels einer Southern Analyse bestimmt, wobei die Restriktion der genomischen DNA über Nacht mit der Endonuklease *HindIII* erfolgte.

Diese geschnittene DNA wurde in einem 1%igen Agarosegel getrennt und anschließend über Vakuum auf die Nylonmembran übertragen. Diese Membran wurde mit den radioaktiv markierten Gen *NPTII* hybridisiert. Die Neomycinphosphotransferase (Kanamycin) ist der Selektionsmarker. Sie ist spezifisch für die T-DNA 35S\*::mycSUVH2. Durch die Anzahl der Hybridisierungsbanden in den einzelnen Linien kann man die Anzahl der Insertionen bestimmen.

#### **2.4.6 Transienter Expressionsassay**

Für den transienten Assay erfolgte eine PCR der Gene *OsSET1*, *AtCLF*, *AtSUVH1*, *AtSUVH2* und *AtSUVH3* aus genomischer DNA, mit folgenden spezifischen Primern *OsStartSalI*/*OsStopSalI*, *CLF-EcoI*/*CLF-BamI*, *Su-1StartSalI*/*Su-1StopSalI*, *Su-2StartBamI*/*Su-2StopBamI* und *Su-3StartXhoI*/*Su-3StopXhoI* amplifiziert. Diese Gene wurden in den Vektor pKExtr kloniert. Die transiente Expression der Fusionsproteine erfolgte durch den 35S-Promotor aus dem Cauliflower Mosaik Virus, wobei die Konstrukte mittels Goldpartikel (Bio-Rad) unter einem Druck von 700kPa in Zwiebelepidermiszellen eingebracht wurden. Diese Arbeiten erfolgten gemeinsam mit Ingo Schulz. Die Lokalisierung der Fusionsproteine konnte durch die Reportergene GUS bzw. GFP sichtbar gemacht werden. Für den transienten Assay wurden MS-Platten, bestehend aus 30g/l Saccharose, 20g/l Select Agar und 4,4g/l M&S Salz, als Unterlage verwendet. Für die Kultivierung der beschossenen Zwiebelhäute wurde flüssiges MS-Nährmedium mit 30g/l Saccharose und 4,4g/l M&S Salz verwendet.

Nach dem Beschuss wurden die Platten mit Parafilm abgedichtet. Die GUS-Konstrukte wurden in X-GLUCA-Lösung [50mM NaPO<sub>4</sub> (ROTH), pH7,0; 0,5 mM Ferro/Ferri-zyanide (SIGMA); 0,05% Triton-X100 (SERVA) und 3mg/ml X-GLUC (DUCHEFA)] über Nacht bei 37°C inkubiert.

## 2.4.7 DNA-Sequenzierung

Die enzymatische Sequenzierreaktion nach Sanger et al. (1977) beruht auf einem nukleotid-spezifischem Kettenabbruch durch den Einbau eines fluoreszenz-markierten Didesoxy-nukleotids. Die als Template eingesetzte DNA wurde durch den QIAGEN Plasmid-Kit bzw. mit dem NucleoSpin-Plasmid-Kit der Firma Macherey & Nagel aufgereinigt.

Die Sequenzreaktionen wurden nach Angaben des Herstellers mit dem ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer) durchgeführt. Das DNA-Pellet wurde nach der Resuspendierung und Denaturierung im ABI Cycle Sequencer 377 aufgetrennt.

Für die Sequenzierung der my*SUVH2*-Mutanten wurden verschiedene transgenspezifische Primer verwendet. Die PCR-Produkte der Taq-Polymerase wurden aus den Agarosegel eluiert und über blunt- end in den pGEM-T Vektor kloniert. Die Plasmide wurden in E.coli transformiert und vermehrt. Ihre Isolierung erfolgte über die alkalische Plasmidpräparation.

Die Anwesenheit des Fragmentes wurde mittels einer Restriktion kontrolliert, die positiven Plasmide mit dem transgenen myc*SUVH2* wurden sequenziert. Die Sequenzierung des transgenen *SUVH2* erfolgte mit verschiedenen genspezifischen Primern. Die verwendeten Primer mycSall, 2RNAi5-BamH1F, Su2f527, 2RNAi5XB, 2RNAi3 BamH1, Su2StopSall, Su2-1290F, Su2-1631B und 2RNAi3BamH1 erlaubten es, den gesamten ORF zu analysieren. Für die Sequenzierung der Taq-Produkte wurden Fragmente aus verschiedenen PCR's verwendet. Die Produkte der Pfu-PCR wurden direkt sequenziert. Ihre Sequenzierung erfolgte mit dem gleichen Primern, welche für die Taq-Produkte genutzt wurden.

## 2.5 PCR und DNA-Analysemethoden

### 2.5.1 DNA Amplifikation mittels PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine einfache, aber effiziente Methode zur Amplifikation eines bestimmten DNA-Segments *in vitro* aus einem Gemisch unterschiedlichster DNA-Sequenzen (z.B. Plasmide, genomische DNA, cDNA-Präparationen).

Ein typisches Temperaturprofil sieht wie folgt aus:

- (a) *Denaturation* 95°C (30- 45sec)
- (b) *Annealing* 45-65°C (30-45sec)
- (c) *Extension* 72-74°C (1 min pro kb)

In den meisten Fällen wird die Taq- Polymerase von *Thermophilus aquaticus* verwendet. Um für die Konstrukte Ablesefehler in der Sequenz zu vermeiden, wurde für diese PCR eine Polymerase mit *proof reading* Aktivität eingesetzt. Dieses Enzym besitzt sowohl eine 5'-3' Polymerase- als auch eine 3'-5' *proof reading* Exonuklease-Aktivität, was zu einen verringerten Basenpaaraustausch führt.

Es kommt zu einem exponentiellen Anstieg der Produktkonzentration. Ein typischer Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µl besteht aus den Komponenten 2µl 10x PCR-Puffer, 200 µM dNTP-Mix, 0,1-0,3µM Primer1, 0,1-0,3µM Primer2 und 1 U Taq-Polymerase.

Für PCR-, RT-PCR- und Sequenzanalysen wurden Primer verwendet, welche im Anhang 5.1 aufgeführt werden.

Die PCR-Reaktionen erfolgte in PCR-Maschinen der Firmen BIOMETRA (T-GRADIENT, 3Cycler) und EPPENDORF.

## 2.5.2 TAIL- PCR

Die *Thermal asymmetric interlaced PCR* (TAIL) bietet die Möglichkeit die unbekannte flankierende Sequenz neben der T-DNA zu identifizieren. In diesen PCR Reaktionen werden eine Anzahl von nested Sequenz-spezifischen Primern für die T-DNA zusammen mit kurzen degenerierten Primern, welche eine niedrige Schmelztemperatur besitzen und unspezifisch die genomische DNA binden, verwendet. Die Annealingtemperatur wird durch die unterschiedlichen Schmelztemperaturen der spezifischen Primer bestimmt. Die PCR ist in folgender Tabelle beschrieben.

Reaktion	Zyklenzahl	Programm
Primär	1	95°C 2min
	5	94°C 1min, 62°C 1min, 72°C 2min30sec
	1	94°C 1min, 25°C 3min, 72°C 2min30sec
	15	94°C 30sec, 62°C 1min, 72°C 2min30sec
	1	92°C 30sec, 44°C 1min, 72°C 2min30sec
	1	72°C 5min
Sekundär	20	94°C 30sec, 64°C 1min, 72°C 2min30sec
	1	94°C 30sec, 44°C 1min, 72°C 2min30sec
	1	72°C 5min
Tertiär	20	94°C 30sec, 44°C 1min, 72°C 2min30sec
	1	72°C 5min

### **2.5.3 Inverse PCR**

Je 1µg genomischer DNA wurde mit den Endonukleasen *RsaI*, *MspI*, *TaqI* oder *MboI* über Nacht in 100µl Gesamtvolumen geschnitten. Im Anschluss erfolgte eine Fällungsreaktion mit 10µl 3M Natriumazetat und 330µl 96% Ethanol. Das Pellet wurde in 20µl dest. Wasser gelöst.

Für die Selbstligation wurden 10µl DNA in einen Gesamtvolumen von mindestens 200µl eingesetzt. Die Ligation erfolgt über Nacht bei 4°C. Anschließend wurde die Ligation für 20min bei 85°C inaktiviert.

Für die Bestimmung des Insertionsortes der T-DNA wurden nested-PCR-Reaktionen durchgeführt. Hierfür wurden degenerierte Primer (Anhang 6.1) und T-DNA spezifische Primer (LR 33, LR110 und LR 133) verwendet.

## **2.6 Molekulargenetische Arbeiten mit RNA**

### **2.6.1 Isolation von Gesamt- RNA**

Alle Lösungen, die mit RNA in Berührung kamen, wurden mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem bidestilliertem Wasser hergestellt oder, wenn möglich, wurde DEPC direkt zur Lösung gegeben. Diethylpyrocarbonat wurde in einer Endkonzentration von 0.1 % (v/v) zugesetzt und diente der Inaktivierung von RNasen. Das mit DEPC versetzte H<sub>2</sub>O sowie die Lösungen wurden 12 h bei 37 °C inkubiert und danach autoklaviert. Dieses Wasser wird im folgenden mit DEPC-H<sub>2</sub>O bezeichnet. Alle Arbeiten wurden mit Einweghandschuhen durchgeführt, da die an Händen anhaftenden RNasen die Hauptkontaminationsquelle darstellen. 100mg Blattmaterial wurden unter Stickstoff zerkleinert und in 1ml Trizol (Invitrogen) gelöst. Die Suspension wurde für 5min bei RT inkubiert und danach wurden 200µl Chloroform zugegeben, gemischt und erneut für 5min bei RT inkubiert. Zur Phasentrennung wurden die Proben für 8min bei 12.000rpm zentrifugiert und die obere, wässrige Phase wurde vorsichtig in ein neues Eppendorfgefäß gegeben. Die Fällung der RNA erfolgte durch Zugabe von 500µl Isopropanol. Die Lösung wurde gemischt und im Anschluß für 5min bei 13.000rpm und 4°C zentrifugiert.

Das Pellet wurde mit 500µl 70% Ethanol gewaschen und bei RT getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 50µl DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert. Diese RNA wurde für unterschiedliche Experimente eingesetzt.

Die isolierte RNA wurde in DEPC-H<sub>2</sub>O 1:30 verdünnt und am Spektrometer (Biometra) vermessen. Die Konzentration der Nukleinsäuren lag zwischen 0.5-3.5 µg/µl. Die Reinheit konnte als Quotient aus Nukleinsäuren/Protein (260/280 nm) bestimmt werden. Als Standard wurde DEPC-H<sub>2</sub>O verwendet.

### **2.6.2 RT-PCR**

Für die semiquantitativen RT-PCR-Experimente wurden jeweils 2µg total RNA eingesetzt. Die RNA wurde für 2 Stunden bei 37°C mit folgenden Zusätzen 10 mM dNTP, 100 pmol Random Hexamers (PROMEGA) and 200U M-MLV reverse transcriptase (M-MLV RT) (PROMEGA) inkubiert. Das Gesamtvolumen betrug 20 µl bzw. 50 µl. 1- 2 µl des RT-Ansatzes wurden als Template für die nachfolgende PCR verwendet. Die PCR-Bedingungen wurden den Primern und der Länge des zu amplifizierenden Bereiches angepaßt. Zur quantitativen und qualitativen Kontrolle wurde die 18S rDNA und Actin verwendet. Diese Gene sollten in gleicher Menge in den Proben vorhanden sein.

### **2.6.3 Quantitative *Real Time* PCR**

Die Reverse Transkription von RNA, gefolgt von einer *Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR), ist eine extrem sensitive Methode, um spezifische mRNAs zu detektieren und zu quantifizieren. Aus Blättern isolierte RNA wird im ersten Schritt als *Template* für die Reverse Transkription in komplementäre DNA (cDNA) eingesetzt. Die cDNA wird wiederum als Template für die folgende PCR verwendet, die mit spezifischen Primern arbeitet, um eine bestimmte cDNA zu amplifizieren. Um bessere quantitative Aussagen über eingesetzte mRNA Mengen machen zu können, kommen *Real-Time*-PCR-Maschinen wie der *LightCycler* von BIO-RAD zum Einsatz. Über eine Fluorimeter-Komponente erfasst der *LightCycler* die Bindung von Fluorophoren wie *SYBR Green* an doppelsträngige DNA. Die Fluoreszenz von *SYBR Green* wird verstärkt, wenn das Molekül an die kleine Furche der DNA bindet. Diese Bindung erfolgt sequenzunabhängig.

Bei dem *LightCycler* RNA Amplifikationssystem QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit von QUIAGEN handelt es sich um ein 1-Schritt System mit Reverser Transkriptase und Taq-Polymerase als Enzymgemisch.

Ein typischer Ansatz einer „one step“ PCR enthält 3,5 µl H<sub>2</sub>O (Rnase frei), 12,5 µl SYBR Green RT-PCR Master Mix, 0,25 µl QuantiTect RT-Mix, 2 µl Primer Mix (0.5 mM), 2 µl Gesamt-RNA (100 ng- 200 ng). Nach einem 20 minütigen RT-Schritt bei 55 °C wird eine PCR nach herkömmlichem Schema durchgeführt, d.h. pro Zyklus 5 sec Denaturierung bei 95°C, 10 sec bei Annealingtemperatur (52-66°C) und 30s-2 min Synthese bei 72°C.

Die Produktbildung wird nach jedem Replikationszyklus über den Fluoreszenzanstieg bestimmt.

Nach im Durchschnitt 40 Replikationszyklen werden die Schmelzkurven der gebildeten Produkte erfasst, um so die Spezifität der PCR-Reaktion überprüfen. Aufgrund des Schmelzverhaltens von DNA nimmt die Fluoreszenz mit steigender Temperatur ab. Die maximale Fluoreszenzänderung pro Temperaturerhöhung ergibt ein Maximum in der Schmelzkurve, welches charakteristisch für jedes PCR-Produkt ist.

In der “two step” quantitative PCR wurde RNA mit Hilfe von reverse Transkriptase und random Primer in cDNA umgeschrieben. Die cDNA-*Templates* werden im Verhältnis 1:20 verdünnt und es erfolgte eine Amplifikation mit spezifischen Primern. Dieses Produkt wird weiter 1: 100 verdünnt. Für die folgende PCR werden verschiedene Konzentrationen eingesetzt (1: 10, 20, 50 und 100). Der Ansatz enthielt 10µl, 5µl, 2µl oder 1µl cDNA; 0,15 µl Primer A und Primer B; 2,5µl 1x SybrGREEN; 2,5 µl Fluorescin; 1,25 µl MgCl<sub>2</sub> und 0,1µl Taq-Polymerase

## **2.7. Affymetrix cDNA Expressionschip**

Für die cDNA-Expressionsanalyse wurde der kommerziell angebotene Expressionschip der Firma Affymetrix ATH1 (Inc., Santa Clara, CA) verwendet, dieser enthält mehr als 22.500 Proben. Einige Proben werden von zwei oder mehr Genen (Targets) erkannt, dass betrifft vor allen Gene mit einer starken Ähnlichkeit. Die Proben des Assays sind 25 Bp Oligonukleotide, die auf der Matrix immobilisiert wurden. Die DNA-Array-Technik basiert auf dem Prinzip, dass zwei komplementäre Nukleinsäure- Einzelstränge sich zusammen lagern, wobei die Target-DNA in der RT-PCR mit Biotin Fluoreszenz markiert wird.

Für die Hybridisierung wurde zunächst gesamt RNA mittels Trizol isoliert. Diese Probe wurden nach dem Protokoll des *RNeasy Mini Kits* der Firma QUIAGEN aufgereinigt. Die gesamt RNA Proben wurden nach einer Konzentrationsbestimmung an Dr. U.E. Hattenhorst (Forschungszentrum für krebskranke Kinder, Universitätskliniken für Kinder- und Jugendmedizin) übergeben. Es erfolgte jeweils eine Doppelisolation der Target-DNA. Die RT-PCR und die Hybridisierung der Chips [*Arabidopsis genome GeneChips array* (ATH1)] wurde von U.E. Hattenhorst, Forschungszentrum für krebskranke Kinder im Biozentrum, durchgeführt.

Für die Messung des emittierten Lichtes wurden die GeneChip-Fluidics-Station und der Hewlett Packard-GeneArray-Scanner mit Analyse-Software verwendet. Die Fluoreszenz Signale wurden in einem zusammenfassenden Bericht (Report File) gespeichert.

Dieser wurde unter Verwendung aller Daten der 8 Chips in einer Excel-Tabelle zusammengefasst. Für jede Linie wurden zwei separate Datenspalten erstellt und es erfolgte die Ermittlung eines Mittelwertes für jedes Gen.

Für die Hybridisierung wurde die gesamtRNA aus dem Wildtyp, der Überexpressionslinie 5, der Antisenselinie 21, der Linien *svh1* und *svh2* (SALK-Mutanten) isoliert. Dieser Mittelwert wird durch den entsprechenden Mittelwert des Wildtyps dividiert und der resultierende Quotient gibt Auskunft, in welchem Verhältnis die Expression des Genes im Vergleich zum Wildtyp steht.

Alle verwendeten Linien (*35S\*::mycSUVH2#5*, *35S\*::SUVH2as#21*, *svh1* und *svh2*) wurden nach dem gleichen Prozedere gerechnet, wobei der Mittelwert des Wildtypes stets 100% oder 1 gesetzt wurde. Ist der erhaltene Faktor größer eins oder 100%, so ist das Gen höher expremiert als im Wildtyp. Ein kleinerer Faktor als eins oder 100% bedeutet, dass das Gen geringer expremiert wird. Als Grenzwert einer Überexpression bzw. einer Repression wurde der Faktor 2,0 festgelegt.

## **2.8 Bioinformatik**

Für die Datenbanksuche von DNA und Proteinen wurde BLASTN und BLASTP ([www.tigrblast.org](http://www.tigrblast.org), [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)) verwendet.

Die Ableitung der Primer erfolgte mit Hilfe der Datenbank [http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi).



Für die Analyse von Arabidopsis Genen wurden folgende Datenbanken verwendet [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org); <http://ukcrop.net/> und <http://www.affymetrix.com>.

Für die Erstellung von Bilddateien wurden die Programme Photoshop (ADOBE SYSTEMS), POWER POINT (MICROSOFT) verwendet. Für Tabellenkalkulationen und Textverarbeitung wurde das Microsoft Office Paket (MICROSOFT) mit dem Programmen WORD und EXCEL genutzt.