



universität
wien

Isolation und Analyse von Zearalenon induzierbaren Promotoren von *Arabidopsis thaliana*

**Diplomarbeit
zur Erlangung des akademischen Grades
„Magister der Naturwissenschaften“
an der Formal- und Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Wien**

**betreut von
Univ.-Doz. Dipl.-Chem. Dr. Markus Teige
Department für Biochemie und Zellbiologie der Universität Wien
und
Ao. Univ.-Prof. DI Dr. Marie-Theres Hauser
Zentrum für Angewandte Genetik der Universität für Bodenkultur Wien**

**durchgeführt am
Zentrum für Angewandte Genetik der Universität für Bodenkultur Wien**

**eingereicht von
Mona AYAD**

Wien, April 2010

VORWORT

Sehr herzlich möchte ich mich bei Frau Dr. Marie-Theres Hauser bedanken, dass sie mir die Möglichkeit gegeben hat, bei dem Projekt „**Exploring the role and metabolization of zearalenone and other *Fusarium* compounds in the model plant *Arabidopsis thaliana***“ (Projektteil PP7 des FWF Projektes F37 - *Fusarium* metabolites and detoxification reactions)“ dabei sein zu dürfen und diese Diplomarbeit dadurch entstanden ist. Obwohl meine Freizeit durch meine Kinder, Omar, Salma, Nada und Hala etwas eingeschränkt ist, hat Frau Dr. Hauser an mich geglaubt und mich mit ihrer Geduld und ihrem fachlichen Wissen unglaublich unterstützt.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Verena Winter, die mir bei dem informatischen Analyse-Teil sehr intensiv geholfen und die Grundlagen der Laborarbeit beigebracht hat.

Meinem Projektarbeitspartner David möchte ich dafür danken, dass er mich bei meinen Versuchen unterstützt hat und mit seinen verschiedenen Vorschlägen die erwarteten Ergebnisse oftmals erzielt werden konnten.

Besonderen Dank an meine Laborkolleginnen Cornelia und Dr. Christina Lang-Mladek, die mir mit fachlichen Diskussionen zu Lösungsansätzen verholfen haben. Vor allem das Protokoll der TOPO Klonierung von Cornelia hat meinen Horizont erweitert.

Ich bin sehr dankbar für die Inputs meiner Laborkollegen, Susanne, Hann-Wei, Neha und Julia, besonders für die Hilfe von Susanne bei der Verbesserung der Ausbeute meiner PCR und die Informationen von Hann-Wei bzgl. Internetrecherche.

Weiters gebührt ein großes Dankeschön meinen Freunden, Dr. Tibor Altenberger und Dr. Awad Ezzat, die meine Arbeit kritisch hinterfragt, mich auf Ideen aufmerksam gemacht und mir viele nützliche Inputs gegeben haben. Durch ihre fachlichen Diskussionen haben sie zu meiner ganzheitlichen Sichtweise beigetragen.

Vielen Dank für die EDV-technische Unterstützung von meiner besten Freundin Sigrid.

Mein ganz besonderer Dank gilt an dieser Stelle meinem Ehemann Mag. Mamdouh El-Attar, welcher mich nicht nur während der Laborarbeit und der Entstehung dieser Arbeit in allen Lebenslagen unterstützt hat, sondern auch während meines gesamten Studiums.

Zusammenfassung

In der gegenwärtigen, von uns durchgeführten Studie, waren das Mycotoxin Zearalenon (ZON) und seine Wirkung auf *Arabidopsis thaliana* von haupttragender Bedeutung. Im Besonderen war die Art und Weise seiner Wirkungsweise und die von ihm induzierten Signalfade von Interesse. In einer vorangegangenen, auf Microarray-Daten basierenden Studie, wurde untersucht, welche Gene in *Arabidopsis thaliana* auf die Applikation von ZON in ihrer Expressionsstärke verändert werden. 495 Gene waren zumindest zweifach hinunter- oder hinaufreguliert. In der vorliegenden Arbeit wurden 10 Gene untersucht, die mehr als 20-fach und vor allem transient, das heißt mit hoher Expression rasch nach der Induktion und Rückkehr zum Normalwert nach 24 h, verglichen mit dem Normalwert, hinaufreguliert waren. Unter diesen Genen waren 6 small heat shock Proteine (sHSPs), eine Glutathion/Glutathion-Peroxidase (GST25), eine Uridinphosphat-Glykosyltransferase (UGT73B4), ein ABC-Transporter (PDR12) und eine Aldo-/Ketoreduktase (AT1G60730). Nach dem Vergleich mit der aktuellen Literatur zu diesen Proteinen und deren putativer Funktion lassen sich bei sämtlichen ein Zusammenhang und eine Funktion in Stresssituationen nachweisen.

In unserer Studie wurde zunächst eine bioinformatische Analyse der Promotorregionen besagter Gene durchgeführt, in der mögliche Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen eruiert wurden. Zusätzlich wurde bestimmt, welche Transkriptionsfaktoren im Detail an die für die Expression der DNA relevanten Bereiche binden könnten. Auch wurden die Promotorregionen auf Gemeinsamkeiten hin analysiert. Die Promotoren der 10 ausgewählten Gene wurden daraufhin in binäre Vektoren, die eine Expression sowohl in *Escherichia coli* als auch in *Arabidopsis thaliana* zulassen, kloniert. Aufgrund eines inserierten Green Fluorescent Proteins (GFP) war es möglich, sowohl Qualität als auch Quantität der ZON-induzierten Expression festzustellen. Zunächst wurde ausschließlich ein einziges Konstrukt auf eine ZON-induzierte Expression hin überprüft. Bis dato konnte allerdings keine Induktion des darauf enthaltenen Promotors des heat shock Proteins HSP17.6B-CI (AT2G29500) - in der T2-Generation - festgestellt werden. Um die generelle Induzierbarkeit des hergestellten Vektors zu eruieren, wurde ein Hitzeschock appliziert, der in Folge eine GFP-Expression bewirkte. Außerdem wurden erste Untersuchungen des Promotor-GFP Konstruktes des PDR12 Gens (AT1g15520) durchgeführt.

Die übrigen Reporterpflanzen wurden im Rahmen dieser Arbeit in der T1-Generation etabliert und müssen in weiteren Versuchen auf ZON-Induzierbarkeit getestet werden.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	2
1.1	Das Mykotoxin Zearalenon (ZON).....	2
1.2	Wirkung von Zearalenon auf Pflanzen	3
1.3	Wirkung von Zearalenon auf die Modellpflanze <i>Arabidopsis thaliana</i>	3
1.4	Auswahl ZON induzierter Gene	7
1.5	Grundsätzlicher Aufbau von Genen und Promotoren.....	8
1.5.1	Gene.....	8
1.5.2	Promotoren	9
1.6	Reportersysteme bei Pflanzen.....	9
2	Fragestellung	11
2.1	Aufgabenstellungen:	12
3	Material und Methoden	13
3.1	Material	13
3.2	Methoden	22
3.2.1	DNA-Isolierung aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	22
3.2.2	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	22
3.2.3	Agarose-Gelelektrophorese und Quantifizierung.....	24
3.2.4	DNA-Extraktion aus dem Agarosegel (QIAEX®II-Kit).....	24
3.2.5	DNA-Extraktion aus dem Agarosegel (Freeze-Squeeze Methode).....	25
3.2.6	Plasmid-DNA Präparation (Midi Prep, Kit) aus <i>Escherichia coli</i>	26
3.2.7	Plasmid-DNA Präparation (Mini-Prep) aus <i>Escherichia coli</i>	27
3.2.8	Klonierungen in pCR4-TOPO® und pDrive™	28
3.2.9	Subklonierungen in pPZP211MCSpUC-GFP2	31
3.2.10	Blunting Reaktion (Mung Bean Nuclease).....	31
3.2.11	Transformationen der Zellen	37

3.2.12	Plasmid-DNA Minipräparation aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	38
3.2.13	Sequenzierung	39
3.2.14	Herstellung transgene Pflanzen	40
4	Ergebnisse.....	45
4.1	Bioinformatische Analyse der Promotorregionen	45
4.2	Identifikation von Promotorelementen über AthaMAP.....	49
4.3	Genexpression bei unterschiedlichen Bedingungen - eFP Browser Analyse	51
4.4	Promotordefinition.....	53
4.5	Primerdesign über Seqviewer und DNASTar	54
4.6	Sequenzenvergleich über BLAST	55
4.7	Plasmide (Beschreibung, Plasmapper, Plasmide + Insert)	55
4.8	Klonierungsstrategien (Tabellen)	59
4.9	Hergestellte Promotorkonstrukte	71
4.10	Agrotransformation.....	81
4.11	Induktionsversuch mit Einzelblättern von colwt:pm2g29500-GFP	82
4.12	ZON-Induktionsversuch mit colwt:pm2g29500-GFP Pflanzen (T2)	84
4.13	Hitzestress-Induktionsversuch in colwt:pm2g29500-GFP (T2)	84
4.14	Segregationsanalyse.....	86
4.15	ZON-Induktionsversuch mit colwt:pm1g15520-GFP Pflanzen (T2)	87
5	Diskussion	89
5.1	Funktionen der ZON-induzierten Gene	98
5.2	Spezifität der ZON induzierbaren Promotoren	98
5.3	Pflanze-Pathogen-Interaktion und Erklärungsmodelle der ausgewählten Gene als Resistenzfaktoren.....	98
5.4	<i>Arabidopsis thaliana</i> als Modell für Kulturpflanzen.....	98
5.5	Ergebnisse der ZON-induzierbaren Markerpflanzen.....	98

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Strukturformel des Mykotoxins Zearalenon	3
Abbildung 2: Abnahme der Zellelongation bei steigenden ZON-Konzentrationen.....	4
Abbildung 3: Wurzellängen bei unterschiedlichen ZON -Konzentrationen	4
Abbildung 4: Hypokotyllängen bei unterschiedlichen ZON-Konzentrationen.....	5
Abbildung 5: Postulierte Verstoffwechselung von ZON in <i>Arabidopsis thaliana</i>	6
Abbildung 6: Zehn der am höchsten und transient induzierten Gene in <i>A. thaliana</i> Col-0 (aus Werner, 2006; modifiziert)	7
Abbildung 7: Promotorregion von AT5G59720.	45
Abbildung 8: Promotorregion von AT1G53540.	46
Abbildung 9: Promotorregion von AT2G29500.	46
Abbildung 10: Promotorregion von AT5G12020.	46
Abbildung 11: Promotorregion von AT5G12030.	47
Abbildung 12: Promotorregion von AT1G52560.	47
Abbildung 13: Promotorregion von AT1G15520.	47
Abbildung 14: Promotorregion von AT1G17180.	48
Abbildung 15: Promotorregion von AT2G15490.	48
Abbildung 16: Promotorregion von AT1G60730.	48
Abbildung 17: Plasmid-Karte des Vektors pPZP211MCSpUC-GFP2.	56
Abbildung 18: Plasmid-Karte des Vektors pCR4-TOPO™.....	57
Abbildung 19: Plasmid-Karte des Vektors pDrive®.....	58
Abbildung 20: Mit EcoRI/BamHI verdauter Vektor pPZP211MCSpUC-pm2g29500-GFP.	70
Abbildung 21: Mit EcoRI/SalI verdauter Vektor pPZP211MCSpUC-pm5g12020-GFP ...	70
Abbildung 22/23: Promotor pm1g15520 in pCR4-TOPO und pPZP-GFP	72
Abbildung 24/25: Promotor pm1g17180 in pCR4-TOPO und pPZP-GFP	73

Abbildung 26/27: Promotor pm1g53540 in pCR4-TOPO und pPZP-GFP	74
Abbildung 28/29: Promotor pm2g15490 in pCR4-TOPO und pPZP-GFP	75
Abbildung 30/31: Promotor pm2g29500 in pCR4-TOPO und pPZP-GFP	76
Abbildung 32/33: Promotor pm1g52560 in pDrive und pPZP-GFP	77
Abbildung 34/35: Promotor pm5g12020 in pDrive und pPZP-GFP	78
Abbildung 36/37: Promotor pm5g12030 in pDrive und pPZP-GFP	79
Abbildung 38/39: Promotor pm5g59720 in pDrive und pPZP-GFP	80
Abbildung 40: T1-Generation <i>Agrobacterium</i> transformierter colwt:pm5g59720-GFP Pflanzen	82
Abbildung 41: T1 Generation resistenter colwt:pm1g53540-GFP/colwt:pm2g29500-GFP Pflanzen	82
Abbildung 42: ZON-Induktionsversuch in Blättern der T1-Generation des 1. Reporterkonstrukt	83
Abbildung 43: GFP-Expression in verschiedenen Pflanzenteilen	85
Abbildung 44: GFP-Expression im Vegetationskegel (Apex) der Sprossachse mit Blütenknospen	85
Abbildung 45: Fluoreszenzmikroskopie von colwt:pm1g15520-GFP Nr. 2 (A, B und D) bei ZON-Behandlung (50 μ M) nach 2 h (A, B) bzw. 4 h (D). In (C) ist Nr. 16 abgebildet, ebenfalls nach 4h ZON Behandlung.....	87

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Verwendeten Restriktionsenzyme und ihre Schnittstellen	13
Tabelle 2: Promotorbereiche und Primersequenzen zur Klonierung.....	16
Tabelle 3: Primer zum Sequenzieren der klonierten Promotoren.....	16
Tabelle 4: Verwendete Antibiotika zur Selektion der Bakterienstämme	19
Tabelle 5: Verwendete Antibiotika für die Plasmidselektion in verschiedenen Stämmen..	20
Tabelle 6: Ligationsansätze der Promotorbereiche	36
Tabelle 7: Übersichtstabelle der Promotorelemente der untersuchten Gene und deren DNA-Sequenz. Zusätzlich angegeben sind die Orientierung des jeweiligen Strangs und die Position des Start- bzw. Stopcodons.	49
Tabelle 8: Bioinformatische Vorhersage von Transkriptionsfaktorbindungsstellen (TFBS), die in allen 10 Promotorbereichen auftreten und ihre Bindungshäufigkeit.....	50
Tabelle 9: Absolutwerte der Expressionsstimulierung der untersuchten Gene durch unterschiedliche Reize.....	52
Tabelle 10: Länge von Intergenbereich + 5' UTR, UTRs, cDNA, CDS Exons/Introns	53
Tabelle 11: PCR-Primer für die Promotorklonierungen in pPZP211MCSpUC-GFP2.....	54
Tabelle 12: PCR-Primer für die Sequenzierreaktionen der klonierten Promotoren.....	55
Tabelle 13: Resultate der Promotorligationen der 10 untersuchten Gene (Vektoren: pCR4-TOPO bzw. pDrive).....	67
Tabelle 14: Resultate der Promotorligationen der 10 untersuchten Gene (in Vektor: pPZP211MCSpUC-GFP2)	69
Tabelle 15: Statistik der Transformationseffizienz durch <i>Agrobacterium</i>	81
Tabelle 16: Segregationsanalyse zur Bestimmung der T-DNA Insertionen und GFP-Induktion in pPZP-pm2g29500-GFP bei verschiedenen Stressbedingungen.....	86

1 EINLEITUNG

1.1 Das Mykotoxin Zearalenon (ZON)

Zearalenon (ZON), ein Resorcylsäure-Derivat, ist den Mykotoxinen, also sekundären Stoffwechselprodukten von Schimmelpilzen, zugehörig (Abb. 1). Es kann von mehreren Spezies der Gattung *Fusarium*, unter anderem *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*), *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. equiseti* und *F. semitectum*, produziert werden.

Infiziert werden vor allem Mais, aber auch Gerste, Hafer, Weizen, Reis, Hirse und Sojabohnen (Kuiper-Goodman et al., 1987). Sowohl während der Blütezeit der Pflanzen, als auch während ihrer Aufbewahrung nach der Ernte ist eine Kontaminierung mit Zearalenon möglich. Temperaturschwankungen und hohe Luftfeuchtigkeit begünstigen ihr Wachstum (Martins et al., 2002). Oft ist bei einer Infektion ZON gemeinsam mit anderen Mykotoxinen, wie Aflatoxin, T-2 Toxin, Deoxynivalenol (DON) und Ochratoxin, zugegen.

ZON ist nicht akut toxisch, allerdings bindet es an Östrogenrezeptoren von Mensch (Boyd and Witliff, 1978; Katzenellenbogen et al., 1979; Miksicek, 1994) und Tier (Schweine, Affen und Nagetieren) (Kuiper-Goodman et al., 1987; Etienne and Dourmad, 1994; Shier et al., 2001) und kann auf diesem Weg zu Symptomen führen, die einem Hyperöstrogenismus ähneln. Fruchtbarkeitsstörungen durch morphologische und funktionelle Veränderungen der Reproduktionsorgane, von denen (bei ZON verseuchten Pflanzen) vor allem Schweine betroffen sind, sind die Folge (Etienne and Jemmali, 1982; Green et al., 1990).

Seit Juni 2005 gibt es innerhalb der EU geltende Grenzwerte für den Konsum von Getreide durch Menschen und Tieren. Für Mais beträgt der höchstzulässige „ZON-Wert“ 200 µg/kg und für alle anderen Getreidearten 100 µg/kg. Nahrungsmittel, die aus verarbeiteten Getreidearten hergestellt wurden, dürfen nur 50 µg/kg ZON für Erwachsene und 20 µg/kg für Kinder und Babys enthalten (Commission regulation No. 856/2005).

Neben den Effekten, die ZON aufgrund seiner Bindung an Östrogenrezeptoren bewirkt, lassen sich auch hepatotoxische, hämatotoxische, immunotoxische and genotoxische Effekte ausmachen. Während Abid-Essifi et al. selbige auf nachgewiesene DNA-Schädigungen zurückführen, haben Pfohl-Leszkowicz et al. gezeigt, dass die Entstehung von DNA-Addukten durch ZON verursacht werden (Abid-Essefi et al., 2003; Pfohl-Leszkowicz et al., 1995).

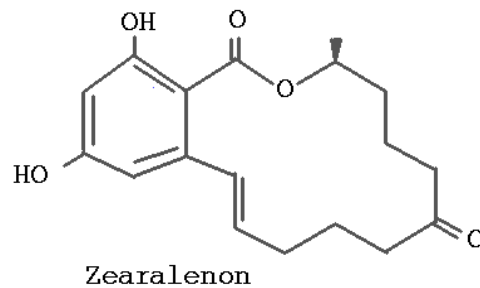


Abbildung 1: Strukturformel des Mykotoxins Zearalenon

1.2 Wirkung von Zearalenon auf Pflanzen

Der Wissensstand in Bezug auf die Wirkung von ZON auf Pflanzen selber beziehungsweise der Vorteil, der Fusarien durch ZON erwächst, ist noch relativ gering. Allerdings gibt es Studien, die beispielsweise zeigen, dass ZON die Membrandurchlässigkeit für Elektrolyte, Aminosäuren und β -Zyanine in den Wurzeln von Mais erhöht. Auch wurde gezeigt, dass ZON eine Inhibierung der oxidativen Phosphorylierung, der mitochondrialen ATPase-Aktivität und der H^+ -Extrusion bewirkt (Vianello and Macri, 1978, 1981; Macri et al., 1996). In einer anderen Studie wurden erhöhte Werte für α -Amylase und α -Glucosidase in keimendem Mais gefunden. Dieser Effekt ist, gemäß den Autoren, darauf zurückzuführen, dass im Embryo Stärke vermehrt hydrolysiert wird, da die Permeabilität der Zellmembran für Gibberellinsäure erhöht und der Transport zu den Aleuronschichten verbessert wird.

1.3 Wirkung von Zearalenon auf die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*

Bezüglich der Wirkung von ZON auf das Wurzelwachstum gibt es widersprüchliche Ergebnisse. Während McLean et al. beim Beobachten des Wachstums von auskeimenden Maiswurzeln bei einer Konzentration von 10 und 25 $\mu\text{g/kg}$ ZON eine Stimulierung des Wachstums beobachteten, wurde von U. Werner ein inhibitorischer Effekt auf das Wurzelwachstum von *Arabidopsis*-Keimlingen festgestellt (McLean et al., 1996; U. Werner, 2006) (Abb.2). Darüber hinaus wurde eine Verkürzung der Epidermiszellen der Wurzeln um bis zu 56 % - bei Applikation von 100 μM ZON - detektiert.

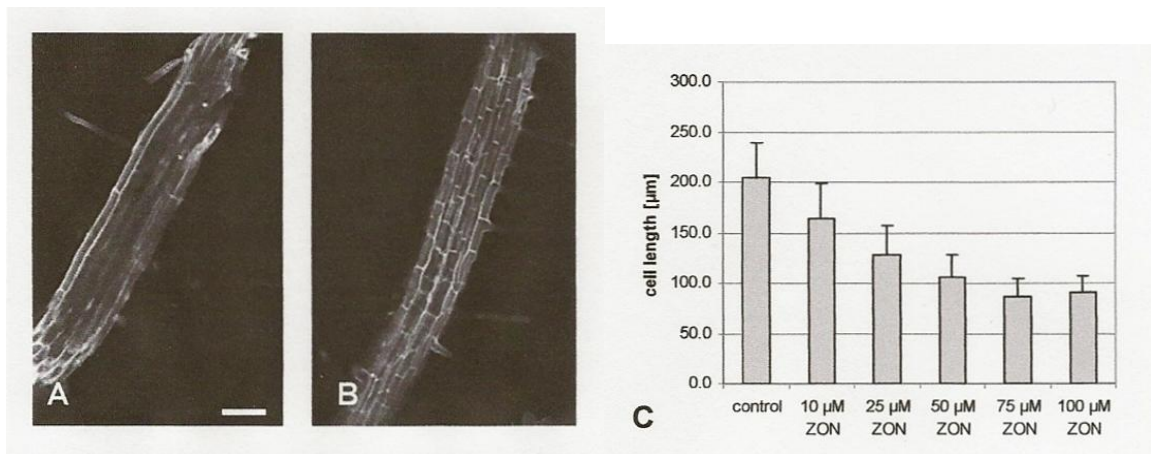


Abbildung 2: Abnahme der Zellelongation bei steigenden ZON-Konzentrationen

Die phänotypischen Auswirkungen der verkürzten Zellen bei unterschiedlich hoher ZON-Applikation waren Wurzeln, die – bei einer Konzentration von 100 µM ZON im Vergleich zur Kontrolle – um bis zu 74 % verkürzt waren (Abb.3).

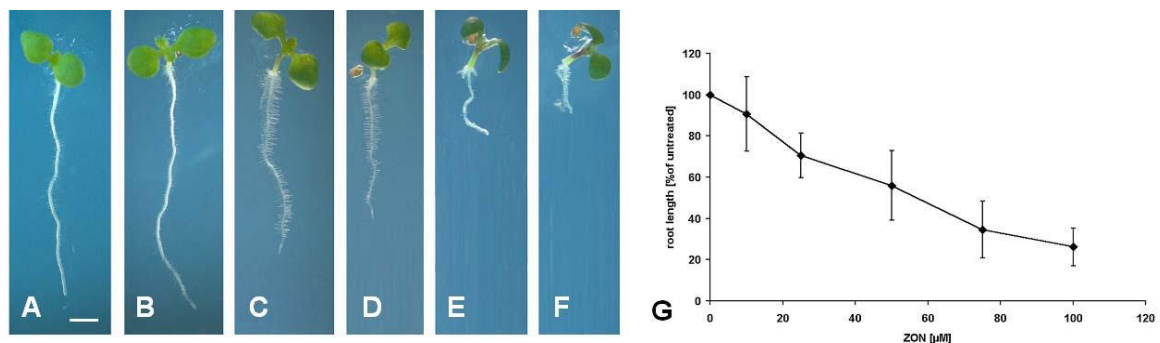


Abbildung 3: Wurzellängen bei unterschiedlichen ZON -Konzentrationen

Abbildung 2: *A. thaliana* Col-0 Pflanzen wurden auf MS 4,5 % Medium kultiviert; in (A) wurde kein ZON, in (B) wurden 25 µM ZON addiert. In (C) sind die unterschiedlichen Längen der Wurzeln dargestellt, die bei Wachstum unter verschieden starken ZON-Konzentrationen erreicht wurden. Die Standardabweichung bezieht sich auf jeweils 50 ausgezählte Zellen. Die Maßstabsleiste in (A) entspricht einer Länge von 80 µm.

Abbildung 3: Die Keimlinge wurden 7 Tage lang in MS 4.5 %, das kein (A), 10 µM (B), 25 µM (C), 50 µM (D), 75 µM (E) und 100 µM (F) ZON enthielt, gezogen. (G) zeigt die Wurzellängen der unter verschiedenen ZON-Konzentrationen kultivierten Pflänzchen 10 Tage nach der Keimung. Die Standardabweichung errechnete sich unter Einbeziehung von jeweils 40 Sämlingen. Die Maßstabsleiste in (A) entspricht einer Länge von 1 mm.

Gemäß den Ergebnissen U. Werners bewirkt ZON auch eine starke Verkürzung der Hypokotyle bei *A. thaliana* Col-0 Pflänzchen – um bis zu 32 % bei Applikation von 50 μ M ZON (Abb. 4, aus U. Werner, 2006a).

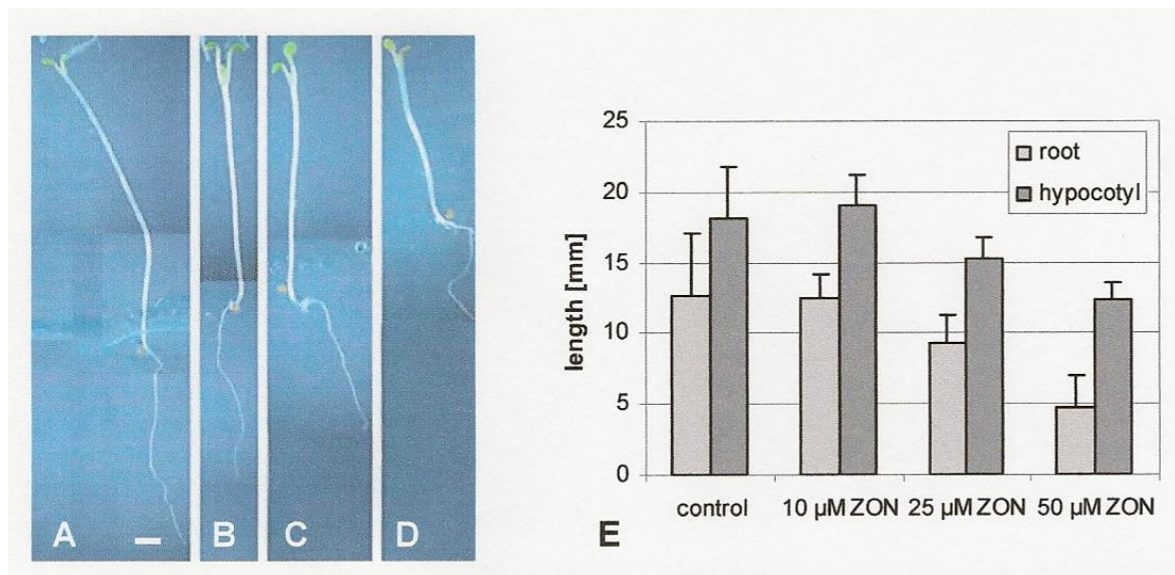


Abbildung 4: Hypokotyllängen bei unterschiedlichen ZON-Konzentrationen.

Über eine DNA-Mikroarray-Analyse wurden Ergebnisse erhalten, die exakt darüber Auskunft geben, welche Gene beziehungsweise Gengruppen in ihrer Expression durch ZON stimuliert werden. Die Expression einer relativ hohen Anzahl von Genen, die für small heat shock Proteine (sHSPs) kodieren, wurde möglicherweise deshalb durch ZON stimuliert, (6 von 13 in *A. thaliana* vorhandenen sHSPs), da ZON mit der Zellmembran interagiert und sie destabilisiert. Dadurch könnte es zu einer Aktivierung der sHSP-Expression kommen, die im Gegenzug zu einer Stabilisierung der Zellmembran führen könnte. Mitsamt einer Reihe von anderen Genen, die hochreguliert wurden, sprechen auch die 9 hochregulierten Glutathion-S-Transferase (GST)-Gene dafür, dass sowohl Stress-beziehungsweise Abwehrmechanismen, aber auch Entgiftungsprozesse durch ZON angeregt werden.

Abbildung 4: *A. thaliana* Col-0 Pflänzchen wurden sieben Tage auf MS 4,5 % kultiviert. Kein ZON wurde bei (A), 10 μ M bei (B), 25 μ M bei (C) und 50 μ M bei (D) zugesetzt. In (E) sind die Längen der Hypokotyle und der Wurzeln nach 7-tägigem Wachstum festgehalten. Die Standardabweichung wurde unter Einbeziehung von 20 Keimlingen errechnet. Die Maßstabsleiste in (A) entspricht einer Länge von 1 mm.

Signifikant ist auch die Hochregulation einer Reihe von Genen, die mit der Synthese der Zellwand in Verbindung stehen. Unklar ist allerdings, ob ZON direkt mit der Zellwand interagiert und eine Hinunterregulierung entsprechender Gene bewirkt, oder ob die Stressreaktionen eben dies verursachen.

Bezüglich der Verstoffwechselung von ZON lassen sich verschiedene Phasen unterscheiden. Nach Werner et al. und Berthiller et al. lassen sich mehrere Phasen des ZON-Abbaus unterscheiden und konkrete Abbaupfade postulieren (Abb.5, aus U. Werner 2006b; Berthiller et al., 2007).

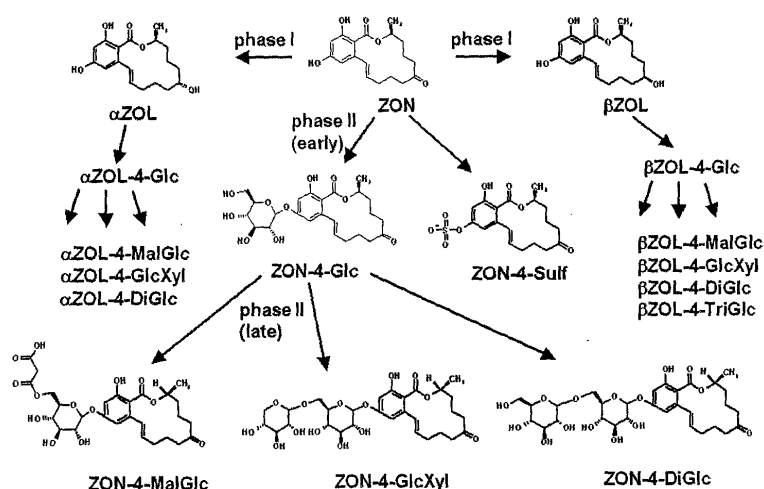


Abbildung 5: Postulierte Verstoffwechselung von ZON in *Arabidopsis thaliana*.

Insgesamt werden in den beiden erwähnten Publikationen 17 verschiedene Metabolite, die in maximal zwei Phasen generiert werden, erwähnt. In einer ersten Phase werden α - und β -Zearalenol (ZOL) erzeugt. In der frühen Phase II werden daraufhin ZON-4-Glykosid (ZON-4-Glc) und ZON-4-Sulfat (ZON-4-Sulf) produziert. Später noch geschieht ein Umbau dieser Metabolite in ZON-4-Malonylglykosid (-MalGlc), ZON-4-Glykosylxylosid (-GlcXyl) und ZON-4-Diglykosid (DiGlc). Nach mehreren Tagen ist ZON praktisch nicht mehr detektierbar - höchstwahrscheinlich aufgrund dessen Inkorporierung in den unlöslichen „bound residue“ (Berthiller et al., 2007).

1.4 Auswahl ZON induzierter Gene

Durch eine Microarray Analyse, bei der die Genexpression von mit ZON behandelten *A. thaliana* Col-0 Pflänzchen mit unbehandelten Pflanzen verglichen wurde, konnte eine Hochregulierung von 219 Genen nach zwei Stunden (bzw. 59 nach 24 Stunden) beobachtet werden. Zehn Gene, die mehr als 20-fach hochreguliert waren, wurden für die Generierung von „Reporterlinien“ ausgewählt (Abb. 6).

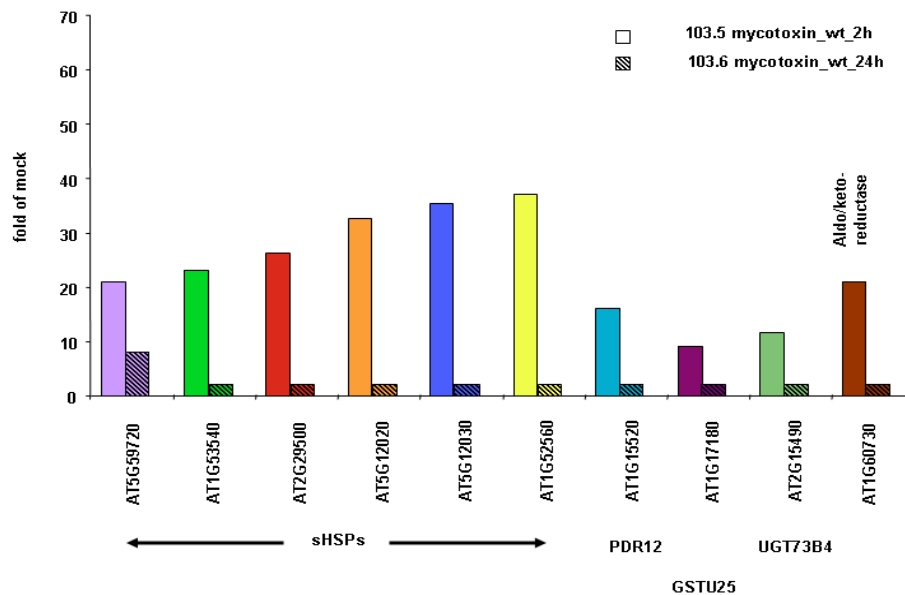


Abbildung 6: Zehn der am höchsten und transient induzierten Gene in *A. thaliana* Col-0 (aus Werner, 2006; modifiziert)

Markant war der hohe Anteil an sHSPs (small heat shock proteins), von denen 6 nach zwei Stunden ZON-Exposition zwischen 6,4 bis 47,8-fach stärker exprimiert waren als die Referenz. Auch in die Auswahl kam ein Gen, das für die Glutathione S-Transferase Tau 25 kodiert. GSTs in Pflanzen scheinen von Wichtigkeit zu sein für die Herbizid-Entgiftung in Kulturpflanzen, aber auch in Reaktionen auf biotische und abiotische Stressfaktoren (Wagner, 2002).

Ebenfalls in engen Zusammenhang mit einer Entgiftungsfunktion werden ABC-Transporter gebracht, die in den ZON-induzierten Pflanzen zum Teil signifikant stärker exprimiert waren. Das am stärksten induzierte Gen dieser Gruppe, nämlich PDR12, wurde auch in die engere Auswahl aufgenommen. PDR12 spielt nachgewiesenermaßen eine Rolle bei der Abwehr von Pilz-Pathogenen wie *Alternaria brassicicola* oder *Fusarium*

oxysporum, aber auch pathogenen Bakterien wie *Pseudomonas syringae* pv *tomato*. In die Auswahl der für die „Reporterlinien“ notwendigen Gene wurde des Weiteren auch eine Transferase aufgenommen, die in dieser Gruppe die höchste Induktion erfahren hatte. UGT73B4 scheint zusammen mit anderen pflanzlichen Glykosyltransferasen (UGTs) eine wesentliche Rolle bei der Abwehr von *Pseudomonas syringae* pv *tomato* zu spielen (Langlois-Meurinne et al., 2005). Als letztes in unsere Auswahl aufgenommen wurde ein Gen, das für eine Aldo/Keto-Reduktase kodiert (dieses war gleichzeitig die am stärksten hochregulierte Oxidoreduktase im Mikroarray).

Die beschriebene Mikroarray-Analyse sollte auch Aufschluss darüber geben, welche Signaltransduktionswege der Phytohormone durch die ZON-Applikation aktiviert werden. Hier kann keine eindeutige Antwort gegeben werden, allerdings kann postuliert werden, dass sowohl die Jasmonat und Ethylen (JA/ET)-, die Salicylsäure (SA)- als auch die Abscissinsäure (ABA)-Signalkaskaden durch die ZON-Präsenz teilweise aktiviert wurden (Werner, 2006a).

1.5 Grundsätzlicher Aufbau von Genen und Promotoren

1.5.1 Gene

Gene sind Abschnitte auf der DNA, die Erbinformation enthalten, welche im Weiteren für Abschriften, sogenannte RNAs als „Kopiervorlagen“ benutzt werden. RNA selbst dient der Herstellung von Proteinen, deren Identität von der spezifischen Abfolge ihrer enthaltenen Nukleotidbausteine abhängt.

Grundsätzlich lassen sich zwei unterschiedliche Bereiche eines Gens festmachen: zum einen sind das jene Bereiche, die die Erbinformation selbst darstellen. Zum anderen sind das Bereiche, die an der Regulation, der Weitergabe und Aktivierung dieser Information beteiligt sind. Sogenannte Promotoren und Enhancer bestimmen, ob und wie stark die RNA-Polymerase bindet und RNA-Moleküle in Folge produziert werden. Zunächst aber binden in einem regulatorischen Bereich des eukaryotischen Promotors (der wesentlich komplizierter aufgebaut ist als der prokaryotische) Transkriptionsfaktoren, die die RNA-Polymerase mehr oder weniger stark anziehen oder durch Lockerung der Chromatin-Struktur die Transkriptionsstartstelle (TSS) eines Gens für die RNA-Polymerase besser zugänglich machen. Die DNA-Sequenzen, woran Transkriptionsfaktoren binden, sind

größtenteils bekannt - darum lassen sich *in silico* Abschätzungen darüber errechnen, wie wahrscheinlich es ist, dass die RNA-Polymerase in der entsprechenden Regulationsregion bindet. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde eine derartige Transkriptionsfaktoranalyse durchgeführt.

1.5.2 Promotoren

Ein Promotor ist eine DNA-Sequenz, die eine Steuerungsfunktion bezüglich der Expression eines Gens übernimmt. In dem Prozess der Transkriptionssteuerung kommt es zur Interaktion von Enzymen (z.B. RNA-Polymerasen) und Bindungsfaktoren mit dem Promotor bzw. dessen Elementen. Der eukaryotische Promotor ist komplizierter aufgebaut als der prokaryotische. Grundsätzlich unterscheidet man Kern- und Proximalpromotor, sowie Enhancer (welche bis zu 100 Kilobasen (kb) vom Transkriptionsstart entfernt sein können). Zu den typischen Sequenzen im Kern-Bereich des eukaryotischen Promotors gehört die TATA-Box. In pflanzlichen Promotoren gibt es zusätzlich Y-Patches und die sogenannte „Regulatory element group“ (REG). Die richtungsunabhängige REG findet sich etwa bei 100 bp stromaufwärts zum Haupttranskriptionsstart. Das Y-Patch findet sich in der Nähe der transkriptionellen Startsequenz („Transcriptional start site“, TSS), ist aber transkriptionsrichtungssensitiv (Yamamoto und Obokata, 2008).

In einer bioinformatischen Analyse mit dem Online-Tool „plantpromoterdb 2.0“ wurde nach Promotorelementen und -faktoren gesucht, die in allen 10 ausgewählten Genen vorhanden sind.

1.6 Reportersysteme bei Pflanzen

Um die Stärke der Expression eines Gens und somit die Promotorstärke eruiieren zu können, bedient man sich sogenannter Marker- oder Reportergene, welche die Quantität der Transkription visuell detektierbar machen.

Zu den wichtigsten Reportergenen gehört zum Beispiel LUC, welches für die Luciferase des Leuchtkäfers kodiert. Ein anderer Reporter - GUS - kodiert hingegen für das Enzym β -Glucuronidase, welches *in vivo* β -Glucuronide spaltet, in der Biotechnologie aber, abhängig vom Substrat, unterschiedliche Farbreaktionen bewirkt. Wird beispielsweise X-Gluc gespalten, entsteht ein blauer Farbstoff. Bei Spaltung von 4-Methylumbelliferyl- β -

D-glucuronid (MUG) entsteht hingegen 4-Methylumbelliferon, welches durch seine Fluoreszenz nachweisbar ist. Die Gelbfärbung von *p*-Nitrophenolat resultiert aus der Prozessierung von *p*-Nitrophenyl- β -D-Glucuronid.

Ein anderes, sehr populäres Reportergen ist das „green fluorescent protein“, kurz GFP. GFP stammt ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria* und hat die Eigenschaft, bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht grün zu fluoreszieren (Shimomura, 2005). GFP kann mit jedem beliebigen Protein fusioniert werden und liegt mittlerweile in einer Reihe von Varianten vor, die ein unterschiedliches Farbsignal produzieren. Zu nennen sind hier beispielsweise das „cyan fluorescent protein“ (CFP), das „yellow fluorescent protein“ (YFP), das „red fluorescent protein“ (RFP) und andere (Verkhusha et al., 2004).

2 ZIELSTELLUNG

Im Folgenden soll auf die Arbeitsschritte eingegangen werden, die im Projekt zur Beantwortung der Teilfragen dienlich sein sollten. Zunächst wurden Gene gesucht, die stark überexprimiert waren – gemäß der zuvor durchgeführten Mikroarrayanalyse von ZON-behandelten *Arabidopsis thaliana* Ecotyp Col-0 Pflänzchen und einer Cellulose Synthase 3 Mutante, *ZORRO* (Werner, 2006a). Ausgewählt wurden schließlich solche Gene, die nach zwei Stunden eine starke Induktion aufwiesen – nämlich einen Expressionswert im Bereich des 5 bis 25-fachen des entsprechenden Normalwerts. Ein zweites Kriterium war die transiente Induktion, also die Rückkehr zur normalen Expression nach 24 Stunden. Um die Repräsentativität der ausgewählten Gene sicherstellen zu können, wurde der Expressionsverlauf mittels Real-Time PCR bereits bestätigt. Als nächste Teilfragefeststellung, die uns relevant erschien, war jene nach den Transkriptionsfaktorbindungsstellen (TFBs) der Promotorregionen (bis zu 2000 Basenpaare (bp) stromaufwärts des Startcodons) sämtlicher 10 selektierter Gene. Diese Regionen, welcher in späterer Folge in Reporterkonstrukte kloniert werden würden, sollten möglichst viele dieser Elemente im Intergenbereich (ab 3' Ende des vorherigen Gens) erfassen. Untersucht sollte des Weiteren werden, welche gleichartigen TFBs in allen 10 Genen zu finden sind.

Die putative Promotorsequenz sollte mittels PCR amplifiziert werden und in einen geeigneten Reportervektor kloniert werden. Die Funktionalität sollte in einem transienten- (Protoblasten-) oder stabilen System (Agrobakterium-mediert) untersucht werden. Um Artefakte zu vermeiden, war geplant, die Promotorsequenzen der fertig gestellten Konstrukte, inklusive Restriktionsstellen, zu sequenzieren. Das fertige Promotor-Konstrukt sollte über die Transformation mit *Agrobacterium tumefaciens* stabil in das Genom von *Arabidopsis thaliana* Col-0 eingebaut werden. Im Anschluss daran wollten wir die Induzierbarkeit durch ZON, durch andere Stressbedingungen oder andere Fusariummetabolite testen um eine geeignete Linie als Indikatorpflanze etablieren zu können.

Sollte danach wider erwarten eine signifikante Expressionsaktivierung auch durch andere Faktoren zustande kommen, müsste ein anderes Konstrukt auf seine Spezifität hin geprüft werden. Dabei wäre vor allem die GFP-Induktion und Detektion in Primärblättern oder der

Wurzel von Interesse, da die am Besten geeignete Linie später für das Screening eines EMS-Pools (Ethanomethylsulfonat-Mutagenese) verwendet werden sollte.

Das „Green fluorescent protein“ (GFP) war Marker der Wahl. Dessen DNA-Sequenz sollte an die entsprechenden Promotoren der 10 ausgewählten Gene gekoppelt werden. Bei Aktivierung des Promotors würde GFP-RNA produziert, die nach dessen Umsetzung zum GFP zu einem detektierbaren Fluoreszenz-Leuchtsignal *in planta* führen sollte.

Im nächsten Schritt war geplant, stabile transgene Pflanzen zu erzeugen. Die Promotor-GFP Konstrukte sollten mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* stabil ins Genom integriert werden.

2.1 Aufgabenstellungen:

- Promotoranalyse der Kandidatengene und bioinformatische Expressionsanalyse bei verschiedenen Wachstums- und Stressbedingungen
- PCR-Amplifikation der putativen Promotorregionen und Klonierung in einen Klonierungsvektor
- Sequenzierung der klonierten DNA Fragmente
- Subklonierung in einen GFP-Reporter-Vektor ohne eigenen Promotor
- Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* und Herstellung transgener *Arabidopsis thaliana* Pflanzen
- Selektion von Transformanten auf Selektivmedium und weitere Untersuchungen (Kopienzahl und homozygote Pflanzen) in den Folgegenerationen T2 und T3.
- Untersuchung der Induzierbarkeit der Reporter-Pflanzen mit Zearalenon und anderen Stressbedingungen

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

Restriktionsenzyme (Tab.1)

BamHI (10u/μl, Fermentas, #ER0051)

EcoRI (10u/μL, Fermentas, #ER0271)

NcoI (10u/μL, Fermentas, #ER0571)

PstI (10u/μL, Fermentas, #ER0611)

SmaI GQ (10u/μl, Promega, #R612K, Ablaufdatum: 1997)

SacI (1 FDU/μl, FastDigest® Restriktionsenzym, Fermentas, #FD1134)

SmaI (1 FDU/μl, FastDigest® Restriktionsenzym, Fermentas, #FD0663)

EcoRI (1 FDU/μl, FastDigest® Restriktionsenzym, Fermentas, #FD0274)

Tabelle 1: Verwendeten Restriktionsenzyme und ihre Schnittstellen

Enzym	5'→3' Sequenz	3'→5' Sequenz	Temp.	Puffer	Inaktivierung
BamHI	5'...G [^] GATCC...3'	3'...CCTAG [^] G...5'	37°C	1x Tango™, unique	80°C, 20min
EcoRI	5'...G [^] AATTC...3'	3'...CTTAA [^] G...5'	37°C	1x Buffer O	65°C, 20min
NcoI	5'...C [^] CATGG...3'	3'...GGTAC [^] C...5'	37°C	1x Tango™	65°C, 20min
PstI	5'...CTGCA [^] G...3'	3'...G [^] ACGTC...5'	37°C	1x Buffer O	nein
SmaI	5'...CCC [^] GGG...3'	3'...GGG [^] CCC...5'	25°C	1x MULTI-CORE™ Buffer	65°C, 20min
SacI, FD	5'...GAGCT [^] C...3'	3'...C [^] TCGAG...5'	37°C	1x Fast Digest® Buffer	65°C, 5min
SmaI, FD	5'...CCC [^] GGG...3'	3'...GGG [^] CCC...5'	37°C	1x Fast Digest® Buffer	65°C, 5min
EcoRI, FD	5'...G [^] AATTC...3'	3'...CTTAA [^] G...5'	37°C	1x Fast Digest® Buffer	80°C, 5min

1x Buffer O: 50 mM Tris-HCl (pH 7,5 bei 37°C), 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl und 0,1 mg/ml bovines Serumalbumin (BSA)

1x Tango™: 33 mM Tris-Acetat (pH 7,5 bei 37°C), 10 mM Mg-Acetat, 66 mM K-Acetat und 0,1mg/ml BSA

1x Buffer BamHI: 10 mM Tris-HCl (pH 8.0 bei 37°C), 5 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0,02% Triton X-100, 1 mM 2-Mercaptoethanol und 0,1 mg/ml BSA

1x MULTI-CORE™ Buffer: 25 mM Tris-Acetat (pH 7,5 bei 37°C), 100 mM K-Acetat, 10 mM Mg-Acetat und 1 mM DTT.

DNA/RNA-modifizierende Enzyme

RNase A (10mg/ml, Roth, #7156.1)

T₄ DNA Ligase (5 Weiss u/μl, Fermentas, #EL0331)

TAQ DNA Polymerase (home-made)

DreamTAQ™ DNA Polymerase (5u/μl, Fermentas, #EP0701)

Quick T₄ DNA Ligase (New England Biolabs, #M2200S)

Kits

DNA Extraction Kit (QIAEX® II, Qiagen, #20051)

QIAEX II Suspension	1,5 ml (Qiagen, #20902)
---------------------	-------------------------

GX1 Buffer (Bindungspuffer)	500 ml
-----------------------------	--------

PE Buffer (Waschpuffer)	500 ml
-------------------------	--------

QIAGEN® PCR Cloning Kit (Qiagen, #231122)

Ligation Master Mix	2x (50 μl)
---------------------	------------

pDrive Cloning Vector	0,5 μg (10 μl)
-----------------------	----------------

Destilliertes H ₂ O	1,7 ml
--------------------------------	--------

DYEnamic™ ET Dye Terminator Kit (MegaBACE™), (GE Healthcare, #US81090)

Terminator Reaction Mix	4 μl/Sequenzierung
-------------------------	--------------------

NucleoBond® Xtra Midi (Macherey-Nagel, #740410.10)

NucleoBond Xtra Midi Columns with inserted NucleoBond Xtra Column Filters

Diverse Buffer (RES, LYS, NEU, EQU, WASH, ELU)

RNase A (Sigma)

Phusion® Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Finnzymes, #F-548S)

TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing (Invitrogen, #45-0071)

Salzlösung (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl₂)

pCR®4-TOPO® Vector (10 u/μl)

One Shot® TOP10 Chemically Competent *Escherichia coli* cells (#K4575-40)

S.O.C. Medium

Primer für PCR-Reaktionen:**Tabelle 2: Promotorbereiche und Primersequenzen zur Klonierung**

Gen	Pro-motor-länge	amplifiziertes Fragment	Primerbezeichnung	Primersequenz
At2g29500	708 bp	799 bp	pm2g29500_F_EcoRI	AGA ATT CGA GTT GTT GAA GCG AGT GTG
			pm2g29500_R_BamHI	ATG GAT CCG AAG AAA CTT GGA ATC ATC G
At1g60730	915 bp	1002 bp	pm1g60730_F_ecoRI	AGA ATT CGG AAT GAA GTA AAC CAT TCA T
			pm1g60730_R_BamHI	TAG GAT CCT AGC TTA ATC CTT CTC AC
At1g15520	1634 bp	1692 bp	pm1g15520_F_ecoRI	AGA ATT CGA AAG CCT ATT CAG ATG
			pm1g15520_R_BamHI	TAG GAT CCC TCC ATT TTG TAT CCA AG
At1g17180	1304 bp	1407 bp	pm1g17180_F_EcoRI	AGA ATT CAA TGG AGA ATT GTT GGT AC
			pm1g17180_R_BamHI	TAG GAT CCG AAA TCA AGA AGA ATC ACC TCG
At2g15490	1001 bp	1178 bp	pm2g15490_F_EcoRI	TGA ATT CTT GTG ATC TTA CTA TGT GA
			pm2g15490_R_NcoI	TAC CAT GGC CAT GTC TAA GAG TGG A
At5g12020	1168 bp	1281 bp	pm5g12020_F_EcoRI_2	TGA ATT CTT TGT GTT CAA TCT TCA AAT CA
			pm5g12020_R_NcoI	TAC CAT GGC TTC GAG GAT TGA GAT TAT TGG
At1g53540	441 bp	530 bp	pm1g53540_F_EcoRI	AGA ATT CAG CTG GTG CGT TAT GGG ATG
			pm1g53540_R_BamHI	TAG GAT CCC CCG AAG ATG CTT GGA AT
At5g12020	1168 bp	1285 bp	pm5g12020_F_EcoRI_2	TGA ATT CTT TGT GTT CAA TCT TCA AAT CA
			pm5g12020_R_SmaI	TAC CCG GGA TGT CTT CGA GGA TTG AGA TT
At2g15490	1001 bp	1134 bp	pm2g15490_F_EcoRI	TGA ATT CTT GTG ATC TTA CTA TGT GA
			pm2g15490_F_SacI	TGA GCT CTT GTG ATC TTA CTA TGT GAT
At5g59720	658 bp	742 bp	pm5g59720_F_EcoRI	GAG AAT TCT GGT TCA AGC ATG ACA TGA A
			pm5g59720_R_BamHI	CAG GAT CCA TGC TTG GAA TGA GAG ACA TTG T
At5g12030	330 bp	413 bp	pm5g12030_F_EcoRI	GAG AAT TCA ACC GTA TTG ACG CGG TCC
			pm5g12030_R_BamHI	CAG GAT CCA AAC TCC AAA TCC ATT CT
At1g52560	4022 bp	908 bp	pm1g52560_F_EcoRI	GAG AAT TCT AGC GAC ACA ACC CAC ATA
			pm1g52560_R_BamHI	CAG GAT CCG TTT CTC AAA GCC AGA CGA G

Tabelle 3: Primer zum Sequenzieren der klonierten Promotoren

Primernamen	Richtung	Primersequenz
m13-F	Forward	GTA AAA CGA CGG CCA GT
m13-R	Reverse	CAG GAA ACA GCT ATG AC
pGreen-GFP(2x)	Reverse	GTTCACGTCGCCGTCCAGC
pm1g15520_EcoRI_F2	Forward	AGA ATT CGG TCA ACT GTA CTG TAT ATG

Puffer und Lösungen

- Buffer O 10x (orange), Fermentas, #BO5)
Tris-HCl (50 mM) (pH 7,5 bei 37°C), MgCl₂ (10 mM), NaCl (100 mM),
BSA (0,1 g/ml)
- Buffer Tango 10x (yellow), Fermentas, #BY5)
Tris-Acetat (330 mM) (pH 7,9 bei 37°C), Magnesiumacetat (100 mM),
Kaliumacetat (660 mM), BSA (1 mg/ml)

GTE-Puffer

(+)-Glukose wasserfrei, 50 mM (Fluka, #49140)
EDTA, 10 mM (Roth, #X986.2),
Tris-HCl pH 8,0; 25 mM, (Roth, #5429.2 und #4625.2) in H₂O

KCM Puffer 5x

KCl (0,5M) (Roth, #6781.1)
CaCl₂ (0,15M) (Roth, #5239.1)
MgCl₂ (0,15M) (Fluka, #63065)
2x Quick Ligase Buffer (Biolabs # B2200s)

10x Fast Digestion Buffer (Fermentas)

PCR Puffer 10x (home-made)

Tris-HCl (100 mM) (Roth, #5429.2 and #4625.2),
KCl (500 mM) (Roth #6781.1)
MgCl₂ (20-40 mM, Standard 25 mM (Fluka, #63065)
1.5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, X100)

10x DreamTaq Buffer (Fermentas)

50x TAE Puffer

242 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Base (Roth, #5429.2)

750 ml diH₂O

57,1 ml Eisessig (CH₃COOH, 99,9%), (Roth, #3738.5)

100 ml of EDTA pH 8,0 (0,5M), (Roth, #X986.2)

Aufgefüllt mit diH₂O auf 1 Liter Endvolumen

1x TAE aus 50x TAE-Stammlösung durch Verdünnen von 20 ml in 1980 ml diH₂O hergestellt

TE buffer pH 8.0 1x

Tris-HCl (10 mM) (Roth, #5429.2), EDTA (1 mM) (Roth, #X986.2)

Medien

MS 2,5 und 4,5 Platten (Standard 4,5 Platten)

4,3 g/l Murashige and Skoog Basal Salt Mixture (Duchefa, M0221.0050),

25 bzw. 45 g/l Saccharose (Agrana),

10 g/l Agar-Agar (Plant Agar, Duchefa, P1001.1000),

pH auf 5,6-5,8 mit wenigen Tropfen 1M KOH (Merck) eingestellt

Nach dem Autoklavieren Zugabe von sterilfiltrierten Antibiotika

YT-Agarmedium für *Escherichia coli* Medienplatten

10 g/l Hefeextrakt (Roth, #2363.2)

10 g/l Casein-Hydrolysat (Roth, #AE41.1)

15 g/l Agar-Agar (Fluka, #05039),

5 g/l NaCl (Roth, #3957.2) und H₂O bis zu Endvolumen

YT-Flüssigmedium: Zusammensetzung wie oben, aber ohne Agar-Agar.

Antibiotische Selektion für YT Platten und YT Flüssigmedium (Tab. 4)

Rifampicin, Stammlösung mit 50 mg/ml (Sigma, #R3501)

Gentamycin, Stammlösung mit 50 mg/ml (Roth, #0233.2)

Kanamycin, Stammlösung mit 100 mg/ml (Roth, #T832.4)

Spectinomycin, Stammlösung mit 100 mg/ml (Sigma, #S.9007)

Tabelle 4: Verwendete Antibiotika zur Selektion der Bakterienstämme

Bakterienstamm	Selektion, Endkonzentration
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101 (pMP90)	Rifampicin, 100 mg/l Gentamycin, 50 mg/l Spectinomycin, 100 mg/l
<i>Escherichia coli</i> DH5α	-

Tabelle 5: Verwendete Antibiotika für die Plasmidselektion in verschiedenen Stämmen

Plasmid	Bakterienstamm	Verwendung	Endkonzentration
pCR4-TOPO®	<i>Escherichia coli</i> Top10 Zellen	Miniprep	Kanamycin, 50 mg/l
pDrive™	<i>Escherichia coli</i> DH5α	Miniprep	Kanamycin, 50 mg/l
pPZP211MCSpUC-GFP2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101 pMP90	Miniprep, Transformation	Rifampicin, 100 mg/l Gentamycin, 50 mg/l Spectinomycin, 100 mg/l

Chemikalien

Agarosegel

Agarose (Eurogentec, #EP-0010-05) in TAE Puffer 1x

0.7%-Gel: 0,7 g Agarose in 100 ml TAE Puffer 1x

1.5%-Gel: 1,5 g Agarose in 100 ml TAE Puffer 1x

CHCl₃, Chloroform (Roth, #T901.1)

dATP (2mM) (Solis Biodyne)

100 mM in TE Puffer (100 mM Tris pH 7,8; 1 mM EDTA)

DMSO, Dimethylsulfoxid, Minimum 99.5% (Sigma, #D4540-500ML)

dNTP Mix (2 mM), alle Solis Biodyne, (#R0241)

dATP (0,5 mM), dCTP (0,5 mM), dGTP (0,5 mM), dTTP (0,5 mM),

70% Ethanol (Hergestellt aus Ethanol 99% (AustriaAlco) and H₂O)

95% Ethanol (Hergestellt aus Ethanol 99% (AustriaAlco) and H₂O)

86% Glycerol (Roth, #4043.3)

Isopropanol (2-Propanol) (Roth, #6752.5)

3 M/5 M Ac/KOAc pH 4,8

3 M Kaliumacetat (Sigma, #P-5708), pH 4,8 mit Eisessig (Roth, #3738.5)

Flüssiger N₂

1% low melting Agarose

1 g low melting Agarose (Biozym, #850080) in 100ml diH₂O

MgCl₂ (25 mM)

NaOH (0,2 M)/1% SDS

NaOH (0,4 M) (Roth, #9356.2), 2% Natriumdodecylsulfat (SDS) (Roth, #4360.2)

in einem 1:1 Verhältnis

Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (24:24:1)

Phenol-gesättigte Lösung (Amresco, #0945-400ML),

Chloroform, CHCl₃ (Roth, #T901.1),

Isoamylalkohol (Roth, #T870.1)

Silwet L-77

NaAc pH 5,2 (3 M) (Roth, #6773.2)

Lösung zur Oberflächensterilisierung

5% Natriumhypochlorit (Roth, #9062.1),

Tween-20 (1 Tropfen/5 ml) (Sigma, P-7949)

5% Saccharose (Agrana)

Plasmide und Konstrukte

- pCR4-TOPO® Vektor (Invitrogen)
- pDrive™ Vektor (QIAGEN)
- pPZP211MCSpUC-GFP2 (basiert auf pPZP211)

Pflanzenlinien

- *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia (Col-0, uU auch als colwt bezeichnet)

3.2 Methoden

3.2.1 DNA-Isolierung aus *Arabidopsis thaliana*

Zunächst wurde flüssiger Stickstoff bereitgestellt und das geerntete Pflanzenmaterial (Blätter oder Blüten) in ein 1,5 ml Eppendorf gegeben und fest verschlossen. Nun wurde das Pflanzenmaterial in flüssigen Stickstoff schockgefroren.

Die Proben wurden mit Hilfe einer fixierten Bohrmaschine und sterilen Plastikstößeln homogenisiert. Für jede neue Probe wurden noch ungebrauchte, sterile Stößel verwendet. Danach wurden die Proben bis zum nächsten Arbeitsschritt erneut im flüssigen Stickstoff belassen.

Nachdem die Proben vom Stickstoff entnommen wurden, konnte sofort 200 µl 2x CTAB Puffer hinzugefügt werden. Nach dem Vortex wurde die Mischung bei 65°C und 15 Minuten auf einem Heizblock gestellt.

Die gleiche Menge Chloroform – 200 µl – wurde nun im Abzug hinzugefügt, gevortext und für 1-2 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert 13.000 rpm. Im nächsten Schritt wurde der Überstand in ein unbenutztes Eppendorfgefäß übertragen. Besonders beachtet wurde hierbei, dass die Zwischenschicht nicht übertragen wurde. Im Folgenden wurden 500 µl 99% EtOH (absolut) addiert und die Reagiergefäße bei minus 20°C für 20 Minuten auf Eis gestellt. Nun wurden die Proben noch für 20 Minuten bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert. Nach der Entnahme des Ethanol wurde das Pellet noch mit 700 µl 70% EtOH gewaschen (gemixt). Danach wurden die Proben für 10 Minuten bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert.

Um eine komplette Entfernung des Ethanol zu erreichen, wurde das Pellet für 5 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Zuletzt wurde das Pellet noch in 50 µl sterilem TE Puffer (1x, pH 8) gelöst. Pro PCR-Reaktion wurde 1 µl der DNA-Präparation verwendet (20 µl Endvolumen).

3.2.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Chain Reaction (PCR) kann zur Erzeugung einzelsträngiger (ss)DNA verwendet werden (Myerson, 1991). Es handelt sich um eine zweistufige Methode, welche einzelsträngige Proben in einem zwanzigfachen Überschuss produzieren kann. Diese Methode erlaubt auch nichtradioaktives Markieren der Proben.

Die erste Amplifikation ist eine Standard-PCR um ein Ausgangsprodukt für die zweite Amplifikation herzustellen. Es werden zunächst zwei verschiedenartige („vorwärts“ und „rückwärts“) Primer verwendet. Zur Amplifikation wird ein Plasmid mit dem gewünschten Insert, ein Produkt einer vorhergehenden PCR oder eine DNA-Präparation, verwendet. Ein Picogramm oder weniger reicht theoretisch aus, um 1 µg Produkt zu erhalten.

Die zweite Amplifikation verwendet direkt 10 - 50 ng dieses amplifizierten Fragments für die Reaktion. Um eine einsträngige Probe zu erzeugen wird nur ein „Primer“ verwendet. Als Nukleotide verwendet man die dNTPs.

PCR-Ansatz

Steriles Wasser	~
10 x PCR-Puffer	2 µl
dNTPs (je 2 mM)	2 µl
F-Primer (20 µM = 20 pmol/µl)	0,25 µl
R-Primer (20 µM = 20 pmol/µl)	0,25 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
Template (~ 20 ng genomische DNA)	~ 10-20 ng
Ansatz	Σ 20 µl

Primerverdünnung

Von 100 µM auf 20 µM (1:5) (zu ~ 50 µl aliquotieren)
(10 µl Primer + 40 µl H₂O)

Nukleotidverdünnung

dATP	10 µl
dTTP	10 µl
dCTP	10 µl
dGTP	10 µl
Wasser	460 µl
Ansatz	Σ 500 µl

Nukleotid-Mix (zu je 100 µl aliquotieren)

3.2.3 Agarose-Gelelektrophorese und Quantifizierung

Das Agarosegel wurde in verschiedenen Konzentrationsabstufungen, je nach zu erwartenden Fragmentlängen, hergestellt.

Auftrennung:

- 0,8%-iges Agarosegel wird für die Proben, welche größer als 1.000 bp sind, hergestellt.
- 1,5%-iges Agarosegel wird für die Proben, welche kleiner als 1.000 bp sind, hergestellt.

20 ml des 10x TAE-Puffers werden mit 980 ml diH₂O verdünnt.

Agarosegel (z.B. 0,8%iges Gel)

- 0,8 g Agarose
- 100 ml 1x TAE-Puffer

Die Agarose wurde in 100 ml verdünntem TAE-Puffer in der Mikrowelle durch Erhitzen gelöst. Nachdem das Gel auf etwa 50°C abgekühlt war, wurde Ethidiumbromid hinzugegeben. Mit Kämmen wurden Schlitze bzw. Taschen vorbereitet, um anschließend die Agarosegele hineingießen zu können. Luftbläschen wurden aus dem Agarosegel entfernt.

3.2.4 DNA-Extraktion aus dem Agarosegel (QIAEX®II-Kit)

Die Banden wurden mit Hilfe eines scharfen, sauberen Skalpells aus dem Agarose - Gel ausgeschnitten. Nach dem Abwiegen eines leeren 1,5 ml Eppendorf-Gefäß wurden die erhaltenen Gelstückchen mit selbigem abgewogen. Die Differenz der beiden Gewichtsmessungen ergab das Gewicht des jeweiligen Gelstücks.

Für die Fragmente, die unter 100 bp waren, wurde Puffer QX1 - des dreifachen Volumens des gewogenen Gelstücks - hinzu pipettiert. Nach einem 30 sekundigen Vortex-Schritt wurden 10 µl (< 2 µg DNA) QIAEX II hinzugefügt.

Nun wurde das Eppendorf-Reaktionsgefäß im Heizblock bei 50°C für 10 Minuten inkubiert und alle 2 Minuten gemixt. Die Farbe verblieb gelb (sollte gemäß dem Protokoll

auch gelb bleiben). Anschließend wurde das Eppendorf-Tube für 30 sec und Raumtemperatur bei 13.000 rpm zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 500 µl Puffer QX1 gewaschen und wieder für 30 Sekunden zentrifugiert. Der gesamte Überstand wurde mit Hilfe einer Pipette abgenommen. Insgesamt wurde das Pellet 2x mit jeweils 500µl PE Puffer gewaschen.

Nun wurde das Pellet noch für 10 Minuten luftgetrocknet. 20 µl destilliertes Wasser wurden addiert, die Suspension gevortext und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In weiterer Folge wurde das Eppendorf-Gefäß 30 sec lang bei 13.000 rpm zentrifugiert. Vorsichtig und mit Hilfe einer Pipette wurde der Überstand in ein neues, beschriftetes Tube transformiert (1. Elution).

In der 2. Elution wurde das Pellet in 15 µl diH₂O gelöst und in ein neues Eppendorf überführt. Die Quantifizierung nach beiden Elutionsschritten erfolgte auf einem 0,8 % Agarosegel.

3.2.5 DNA-Extraktion aus dem Agarosegel (Freeze-Squeeze Methode)

Die erwünschte DNA-Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß bei -80°C O/N tiefgefroren. Nach der Entnahme von -80°C wurde das Eppendorf-Gefäß für 30 min bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Tube überführt und dessen Volumen bestimmt.

Ethanolfällung

Zur Probe wurden 3 M NaOAc (pH 5,2) (0,1x Volumen der Probe) und 96%-iger Ethanol (3x Volumen der Probe) addiert. Dann wurde das Eppendorf-Gefäß gevortext und für 10 Minuten bei -20°C inkubiert. Danach wurde noch für 20 min und 14.000 rpm (4°C) zentrifugiert. Im Weiteren wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 500 µl EtOH (70%) gewaschen. Dabei wurden die Proben für 10 Minuten bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet getrocknet (für 4 min in der Speed Vacc). Zuletzt wurde das getrocknete Pellet noch in 20 µl TE Puffer (pH 8) gelöst. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte bei -4°C. Zur Quantifizierung wurden 1 oder 2 µl des gelösten Pellets auf ein 0,8 % Agarosegel aufgetragen.

3.2.6 Plasmid-DNA Präparation (Midi Prep, Kit) aus *Escherichia coli*

Zunächst wurden 50 ml des LB-Mediums (mit 50 µg/ml Kanamycin) mit den Kryostock-Kulturen beimpft und bei 37°C und 180 rpm für 12 bis 16 Stunden inkubiert. Nach der Wachstumsphase wurden die Zellen in 50 ml-Röhrchen gegeben und für 15 min bei 4°C und 5.600 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde im Weiteren in 8 ml Puffer RES und Rnase A resuspendiert und durch „Auf- und Abpipettieren“ homogenisiert. Die Lyse der Zelle erfolgte mit 8 ml des LYS-Puffers (Das Eppendorf-Gefäß wird dabei ca. 5x invertiert). Nun wurden die Proben noch 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Daraufhin wurden die Säule und der Filter vorbereitet und mit einem mitgelieferten Ring fixiert. Mit Hilfe des Puffers EQU (12 ml) wurde die Säule äquilibriert. Die Neutralisation erfolgte mit 8 ml NEU-Puffer (danach wurde sofort 5-10x invertiert). Bevor das Lysat auf den Filter aufgetragen wurde, wurden die Proben noch 3x geschwenkt.

Nach dem kompletten Abfiltern wurde der Filter nochmals mit 5 ml Puffer EQU gewaschen bzw. in kreisförmigen Bewegungen nachgespült. Die Filtersäule wurde entfernt und mit 8 ml Puffer WASH gereinigt (danach abtropfen gelassen) und die Säule auf ein frisches Zentrifugenröhrchen gestellt. Nach Zugabe des Elutions-Puffers (5 ml) ELU wurde gewartet bis die gesamte Probe möglichst durchgesickert war. Nun wurden die Proben mit jeweils 3,5 ml Isopropanol versetzt, gut gevortext und für 2 Minuten inkubiert. Abzentrifugiert wurde dann bei 4°C und 15.000 rpm für 30 Minuten. Der Überstand wurde vorsichtig abgehoben, verworfen und mit jeweils 2 ml 70%igem Ethanol gewaschen. Das Eppendorf-Gefäß wurde dabei leicht geschwenkt. Im folgenden Schritt wurden die Proben bei Raumtemperatur und für 5 Minuten bei 15.000 rpm zentrifugiert. Abermals wurde der Überstand vorsichtig abgehoben, verworfen und trocknen gelassen. Die präzipitierte Plasmid-DNA wurde in 200 µl AD (PCR) aufgenommen und das Eppendorf-Tube 30 Minuten lang geschwenkt.

Die Ermittlung der Ausbeute erfolgte in unbenutzten, beschrifteten Eppendorf-Reaktionsgefäßen. Dann wurde 1:10 verdünnt, quantifiziert und die gelöste DNA bei 4°C gelagert. Die erwartete Ausbeute sollte ungefähr 0,5 µg/µl DNA (ca. 100 µg DNA) betragen.

3.2.7 Plasmid-DNA Präparation (Mini-Prep) aus *Escherichia coli*

Vor der Isolation wurde die Farbe des normalen Mediums (ohne Kolonie) mit dem beimpften Medium verglichen um das Bakterienwachstum zu bestimmen (ob es schwach, gut oder sehr gut ist). Positive Proben sind beige bis hellbraun, negative sind dunkelgelb.

2 ml der O/N-Kultur wurden in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt, falls das Wachstum der Bakterien sehr gut war. Bei schlechtem Wachstum wurden 2x 2 ml geerntet.

Nun wurde bei Raumtemperatur das Medium bei 13.000 rpm für 4 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurden 200 µl GTE-Puffer hinzugefügt, das Tube gemixt und 5 min auf Eis inkubiert. 400 µl frisch hergestellte 1%-SDS/0,2 M NaOH-Lösung wurden nun hinzugefügt. Die Mixtur wurde vorsichtig geschwenkt und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. 300 µl NaOAc (pH = 4,8) wurden nun addiert, alles 3x stark geschüttelt und abermals auf Eis inkubiert (10 min). Im nächsten Schritt wurde die Mixtur für 10 Minuten und 4°C bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand (etwa 800 µl) wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß (1,5 ml) überführt. Danach wurde bei 13.000 rpm und 4°C für 20 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgehoben und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Nun wurden 600 µl Isopropanol zugefügt und das Reaktionsgemisch gevortext. Der nach der 30-minütigen Zentrifugation bei 13.000 rpm (4°C) erhaltene Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit 500 µl 70%-EtOH gewaschen. Nach dem Waschschrift wurde kurz gevortext und erneut zentrifugiert (10 min, 4°C, 13.000 rpm). Im nächsten Schritt wurde der Überstand abgehoben und verworfen, das Pellet hingegen in 40 µl TE (2 µl RNase waren bereits hinzugefügt) gelöst. Schließlich wurden die Proben noch 20 min bei RT am Schüttler inkubiert, bevor sie dann bei +4°C gelagert wurden.

Für die Kryostocks wurden 800 µl Bakteriensuspension + 400 µl >87% Glycerol vermischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert (dienten als Backup).

3.2.8 Klonierungen in pCR4-TOPO® und pDrive™

Anfügen eines A-Überhangs an das 3' Ende:

Ansatz:

10x PCR Puffer (30 mM MgCl ₂)	1,0 µl
2 mM dATP	1,0 µl
PCR Produkt (konzentrationsabhängig)	~
Taq-Polymerase (homemade)	0,3 µl
diH ₂ O	~
Gesamt	Σ 10,0 µl

Die Probe wurde zunächst für 10 min bei 72°C (Eppendorf Mastercycler, auf Inkubationsfunktion stellen) inkubiert. Unmittelbar danach wurde die Probe für 2 min auf Eis gestellt und danach für die TOPO Reaktion verwendet.

TOPO Klonierungsreaktion auf Eis

Ansatz:

PCR Produkt + 3'-A	4,5 µl
Salzlösung (Invitrogen)	1,0 µl
pCR4-TOPO Vektor (10 ng/µl) (Invitrogen)	0,5 µl
Gesamt	Σ 6,0 µl

Nach dem Zusammenfügen der Reaktionskomponenten wurde das Eppendorf-Gefäß mit den Fingern angetippt und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Unmittelbar danach wurde das Reaktionsgefäß auf Eis gestellt.

Transformation in chemisch kompetente One Shot TOP10 Zellen

Vorbereitung:

- 6 Platten YT + Kan (50 µg/ml) wurden bei 37°C für 30 Minuten getrocknet
- Vor dem Ausplattieren:

S.O.C Medium

Wasserbad wurde auf 42°C adjustiert

Zunächst wurden 50 µl der TOP10 Zellen (Invitrogen) vom -80°C Tiefkühlschrank auf Eis übertragen. Nun erfolgte deren Aufteilung auf zwei Eppendorf-Gefäße (Inhalt pro Tube: 25 µl). Eines der beiden wurde mit „Positivkontrolle“, das andere mit dem entsprechenden Namen des Inserts beschriftet.

2 µl des TOPO Reaktionsgemisches wurden zu 25 µl der Zellsuspension (kompetente Zellen) pipettiert, mit den Fingern leicht angetippt und auf das Eis zurückgestellt. Auch die Positiv-Kontrolle wurde mit dem positiven TOPO vermengt, mit den Fingern angetippt und auch auf Eis gestellt. Beide Proben wurden 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden beide Proben im Wasserbad bei 42°C für 30 Sekunden hitzegeschockt. Unmittelbar danach wurden die Eppendorf-Gefäße abermals auf Eis gestellt. Im nächsten Schritt wurde zu den Proben 250 µl SOC-Medium (Invitrogen) addiert und für 1 h bei 37°C (180 rpm) inkubiert. Schließlich wurden die Proben (unter sterilen Bedingungen) auf YT + Kanamycin (50 µg/ml) Platten ausplattiert (je Probe 3 Platten: 100 µl + 100 µl + Rest). Die Inkubation erfolgte bei 37°C und O/N.

Am darauffolgenden Tag wurde die Anzahl der Kolonien auf den Platten ausgezählt und die Transformationseffizienz berechnet.

Quick DNA Ligation

50 ng des Vektors wurden mit dem 3-fachen molaren Überschuss des Inserts versetzt. Selbige Mixtur wurde auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt. Nun wurden 0,5 µl der Quick T4 DNA Ligase addiert und gevortext. Nach der Hinzugabe von 5 µl des 2x Quick Ligation Buffer sollte ein Gesamtvolumen von 10 µl im Tube sein. Nun wurde noch kurz zentrifugiert und für 5 min auf 25 °C inkubiert. Der 1-2 minütigen Kühlung auf Eis folgte die Transformation.

Klonierungen in pDrive

Ligationsansatz

PCR-Produkt + 3'-A	1-4 µl
pDrive-Vektor (Fermentas)	1,0 µl
MM (2x) (Fermentas)	5,0 µl
diH ₂ O (vom Volumen des PCR-Produkts abhängig)	0-3 µl
Gesamt	Σ 10,0 µl

Der Ansatz wurde mit den Fingern angetippt und dann für 30 min bei 4°C inkubiert. In späterer Folge wurde der Ansatz (Vektor, Mastermix, Insert und Volumen) halbiert, wobei auch hier eine gute Ligationsrate erreicht wurde.

Transformation in kompetente *E. coli* DH5α Zellen

Ansatz:

Ligationsatz	2-10 µl
KCM (5 %)	20 µl
diH ₂ O (vom Volumen des PCR-Produkts abhängig)	70-78 µl
Gesamt	Σ 100 µl

Der Transformationsansatz wurde nun zu den kompetenten DH5α Zellen gegeben. Nachdem die Suspension mit den Fingern kurz angetippt wurde, folgte eine Inkubationszeit von 30 min auf Eis. Nun folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 90 sec. Nach einer 2-minütigen Inkubation auf Eis wurden 800 µl YT Medium addiert. Schließlich wurden, nach Kultivierung für die Dauer einer Stunde auf 37°C, die transformierten Bakterien auf YT + KAN Platten ausplattiert und bei 37°C Ü/N inkubiert.

3.2.9 Subklonierungen in pPZP211MCSpUC-GFP2

Beide Vektoren, also pPZP und pCR4-TOPO + Promotor, mussten zunächst verdaut werden um in Folge die erwünschten Inserts mit pPZP211MUSpUC-GFP2 zusammenfügen zu können. Der Vektor pPZP211MCSpUC-GFP2 wurde - abhängig von dem zu einfügenden Insert – mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen verdaut. Von diesem Vektor (durch Midi-Isolation erhalten) wurden 5 µg ~ 17 µl (für alle weiteren Arbeitsschritte) verwendet. Zunächst wurden der Vektor und das Insert mit dem passenden Restriktionsenzym verdaut.

Erster Vektorverdauansatz (alle Promotoren außer pm2g15490 und pm5g12020)

TangoBuffer 2x (Fermentas)	8 µl
EcoRI 10 U/µl (Fermentas)	0,5 µl
BamHI 10 U/µl (Fermentas)	1 µl
pPZP211MCSpuc-GFP2	17 µl ~ 5 µg
diH ₂ O	13,5 µl
Gesamt	Σ 40 µl

Die Probe wurde über Nacht, bei 37°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde der Verdau auf ein 0,7 % preparatives Agarosegel aufgetragen (90 min bei 90 V). Nach Auftrennung der Fragmente wurde die relevante Bande (Rückgrat des Vektors) ausgeschnitten, mit dem QiAEX II Kit gereinigt und quantifiziert. Die Quantifizierung ergab in unserem Fall 11,3 ng/µl. Zum Ligieren wurden 50 ng des Vektors benötigt (entsprach ~ 4,4 µl). Der verbleibende Teil des Plasmids nach dem Verdau hatte eine Länge von 9727 bp (ursprüngliche Länge waren 9777 bp).

3.2.10 Blunting Reaktion (Mung Bean Nuclease)

Zweiter Vektorverdauansatz für pm2g15490

BamHI Buffer	6 µl
pPZP (Midi-Prep, 375 ng/µl)	13, 3 µl
BamHI (10u/µl)	1 µl
diH ₂ O	19,7 µl
Gesamt	Σ 40 µl

Die Probe wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert und danach gebluntet.

pPZP/ BamHI Verdau	40 µl
Mung Bean Nuclease	2 µl
10x Mung Bean Nuclease Buffer	5 µl
diH ₂ O	3 µl
Gesamt	Σ 50 µl

Der Verdau wurde bei 30°C und 1 h inkubiert. Danach wurde der gebluntete Vektor auf ein 0,7 % Agarosegel aufgetragen (für 90 min, bei 90 V). Die relevante Bande (Rückgrat des Plasmids) wurde ausgeschnitten, mit dem QVAEX II Kit gereinigt und quantifiziert (erhaltener Wert: 77 ng/1 µl). Im nächsten Schritt musste ein weiterer Verdau, nun aber mit SacI, stattfinden.

pPZP/ BamHI /geblunted mit Mung Bean Nuclease	10 µl
SacI Enzym	1,5 µl
10x Fast Digestion Buffer	3 µl
diH ₂ O	5,5 µl
Gesamt	Σ 20 µl

Inkubiert wurde für 15 min bei 37°C. Die darauf folgende Hitzeinaktivierung dauerte 20 min (bei 65°C). Nun war der Vektor bereit für die Ligation mit dem Insert. Nach der Quantifizierung (77 ng/µl) wurde folgender Ansatz ermittelt.

Vektor	0,6 µl (=50 ng)
Quick T4 DNA Ligase	0,5 µl
2x Quick Ligase Buffer	5 µl
diH ₂ O	3,9 µl
Gesamt	Σ 10 µl

Zunächst wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, danach die Ligation auf Eis gestellt. Nachdem die DH5α-Zellen auf Eis aufgetaut wurden (waren auf -80°C gelagert) wurden diese mit 3 verschiedenen Ansätzen transformiert.

Erste Ligase Trafo Nr. 1 50 ng	Trafo 2 pPZP geschnitten ohne Ligase 50 ng	pPZP ungeschnitten (Midi 375 ng/μl (1: 100 verdünnt) 5 ng/1.3 μl
KCM 5% → 20 μl	KCM 5% → 20 μl	KCM 5% → 20 μl
LG 1 → 10 μl	Vektor → 0,6 μl	Plasmid → 1,3 μl
diH ₂ O → 70 μl	diH ₂ O → 79,4 μl	diH ₂ O → 78,7 μl
Σ 100 μl	Σ 100 μl	Σ 100 μl

Jeder der Ansätze wurde mit je 100 μl DH5α versetzt, kurz angetippt und 30 min auf Eis inkubiert. Daraufhin erfolgte ein 90-sekündiger Hitzeschock im Wasserbad. 800 μl YT-Medium wurden nun noch (im Abzug) hinzupipettiert, woraufhin 1 Stunde bei 37 °C und 180 rpm inkubiert wurde. Die Ausplattierung der transformierten Bakterien (50 und 250 μl) erfolgte auf YT (+ Spectinomycin)-Platten. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 37 °C und über Nacht.

Ergebnisse der Ligationen

1. Transformation (pPZP / BamHI / Mung Bean Nuclease / SacI):
bei Addition von 50 μl: Transformationseffizienz = 4×10^2
bei Addition von 250 μl: Transformationseffizienz = 3×10^2
Mittelwert = $3,5 \times 10^2$
2. Transformation ohne Ligase
bei Addition von 50 μl: Transformationseffizienz = $6,6 \times 10^4$
bei Addition von 250 μl: Transformationseffizienz = 2×10^4
Mittelwert = $4,3 \times 10^4$
3. Transformation mit dem unverdauten Vektor
bei Addition von 50 μl: Transformationseffizienz = $3,5 \times 10^5$
bei Addition von 250 μl: Transformationseffizienz = $1,5 \times 10^5$
Mittelwert = $2,5 \times 10^5$

Dritter Vektorverdauansatz (für pm5g12020)

pPZP (Midi-Prep)	10 μl
BamHI Buffer	5 μl
BamHI Enzym	2,5 μl
diH ₂ O	32,5 μl
Gesamt	Σ 50 μl

Der Verdau wurde O/N bei 37 °C inkubiert und am darauffolgendem Tag umgefällt. Dafür wurden zunächst 5 µl 3 M NaOAc addiert (0,1 Volumen des Ansatzes). Im nächsten Schritt wurden 150 µl 98% Ethanol hinzugefügt (3 Volumen des Ansatzes). Nach dem Vortexen wurde 30 min bei -20°C inkubiert. Nun wurde 15 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde daraufhin mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen (10 min bei 4°C und 13000 rpm). Nach Verwerfen des Überstands wurde das Pellet für 3 min in der Speed Vac getrocknet. Schließlich wurde die getrocknete DNA noch in 40 µl diH₂O gelöst.

Blunting mit Mung Bean Nuclease (MBN)

pPZP (Midi-Prep)	40 µl
10x Mung Bean Nuclease Buffer	5 µl
Mung Bean Nuclease (10U/µl)	2 µl
diH ₂ O	3 µl
Gesamt	Σ 50 µl

Nun wurde bei 30 °C für 30 Minuten inkubiert. Nach dem Blunting wurde der Vektor auf ein 0,7 % preparatives Agarosegel aufgetragen (für 90 min bei 90 V). Die relevante Bande wurde dann ausgeschnitten und anhand des QIAEXII Kits quantifiziert.

Ansatz des Vektorverdaus:

pPZP (BamHI/ MungBeanExonuclease)	12,5 µl (77,5 ng/µl)
EcoRI (Fermentas)	1,5 µl
10 x Fastdigestion Buffer	3 µl
diH ₂ O	3 µl
Gesamt	Σ 20 µl

Der Verdau wurde bei 37 °C für 15 min inkubiert. Die Hitzeinaktivierung erfolgte dann für 5 min bei 80 °C. Nun war der Vektor bereit für die Ligation mit dem Insert (pm5g12020).

Verdau der Inserts

Alle verwendeten Klone waren die zuvor sequenzierten TOPO-Vektor-Klone. Zum Verdau wurden stets 3 - 3,5 µg ~ 10 µl verwendet.

Tango Buffer	6 µl
EcoR1	0,5 µl
BamH1	1 µl
TOPO Plasmid (Insert)	10 µl (3 µg)
diH ₂ O	12,5 µl
Gesamt	Σ 30 µl

Der Verdau wurde bei 37°C über Nacht inkubiert und am darauffolgenden Tag auf ein 0,7% präparatives Agarosegel aufgetragen (für 90 min bei 90 V). Die relevante Bande wurde ausgeschnitten und mit dem QIAEXII Kit gereinigt und quantifiziert.

Transformation in DH5α Zellen

KCM, 5x	20 µl
LG Ansatz	10 µl (Vektor, Insert, Quickligase DNA, Quickligase Buffer, diH ₂ O)
diH ₂ O	<u>70 µl</u>
Gesamt	Σ 100 µl

Subklonierungstabelle

Tabelle 6: Ligationsansätze der Promotorbereiche

Promotorbezeichnung	FG Fragment- größe	RF Reaktions- faktor	Äquivalente Molekülanzahl	n-facher molarer Überschuss	Insert (in µl)	Vektor (in µl) 50 ng	Restriktionsenzyme	Plasmidgröße nach Ligation mit pPZP211MCSpUC-GFP2
pm1g15520	1687bp	5,76	8,6 ng	26 ng (3x)	2,3 µl	4,4 µl	EcoRI/ BamHI	11414 bp
pm1g53540	527bp	18,45	2,7 ng	8,1 ng (3x)	1,3 µl	4,4 µl	EcoRI/ BamHI	10254 bp
pm1g17180	1417bp	6,86	7,2 ng	22 ng (3x)	1,5 µl	4,4 µl	EcoRI/ BamHI	11144 bp
pm1g12030	413bp	23,5	2,1 ng	6,3 ng (3x)	0,4 µl	2 µl	EcoRI/ BamHI	10140 bp
pm1g52560	902bp	11	4,5 ng	22,5 ng (5x)	2 µl	1,3 µl	EcoRI/ BamHI	10629bp
pm2g29500	800bp	12,1	4,1 ng	12,3 ng (3x)	1 µl	1,3 µl	EcoRI/ BamHI	10527 bp
pm5g59720	742 bp	13,1	3,8 ng	11,4 ng (3x)	1,1 µl	2 µl	EcoRI/ BamHI	10469 bp
pm2g15490	1139 bp	8,6	5,8 ng	35 ng (6x)	1,3 µl	0,6 µl	SacI/SmaI	10901 bp (BamH1/Sac1)
pm5g12020	1300 bp	7,4	6,7 ng	33 ng (5x)	5 µl	1,3 µl	EcoRI/SmaI	11027 bp (BamH1/EcoRI)

3.2.11 Transformationen der Zellen

Chemisch kompetente TOP10-Bakterien

Waren im Kit enthalten. Details zu den TOP10-Bakterien sind der Produktbeschreibung des Herstellers zu entnehmen.

Chemisch kompetente *E.coli* DH5 α

Zunächst wurden kompetente *E. coli* DH5 α Zellen in 5 ml YT Medium (ohne Antibiotikum) inokuliert und über Nacht bei 180 rpm und 37°C inkubiert. Von dieser Kultur wurden am folgenden Tag 100 μ l entnommen und in 50 ml YT Medium transferiert. Die Bakterienkultur wurde nun solange bei 37°C und 180 rpm kultiviert, bis ein OD600 von 0,41 erreicht war (Sollwert: zwischen 0,3-0,6). Die Zellsuspension wurde daraufhin in ein Falcon-Tube übertragen und bei 2500 rpm und 4°C 10 min zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, konnte das Pellet behutsam in 5 ml 4°C kaltem TSB-Puffer gelöst und 10 min auf Eis inkubiert werden. Nun wurden 100 μ l Aliquote in vorgekühlte Eppendorf-Gefäße hergestellt. Diese wurden in weiterer Folge in flüssigem Stickstoff schockgefroren und auf -80°C gelagert. Vor Gebrauch der kompetenten *E. coli* DH5 α Zellen wurden diese auf Eis aufgetaut.

Herstellung kompetenter *Agrobacterium* GV3101 pMP90 Zellen

Zunächst wurden 6 ml YT Flüssigmedium (mit dem entsprechenden Antibiotikum) mit einer Einzelkolonie inokuliert und über Nacht bei 180 rpm und 28°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden 500 ml des YT Flüssigmediums mit 5 ml der Übernachtskultur versetzt und bis zu einem OD von 0,6-0,8 kultiviert. Ab diesem Schritt wurde ausschliesslich auf Eis und mit vorgekühlten Lösungen gearbeitet. Die Zellen wurden nun in 50 ml Falcon Tubes transferiert, 15 min auf Eis gekühlt und bei 4000 g (15 min, 4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin verworfen und das Pellet in 250 ml H₂O resuspendiert. Dieser (Zentrifugations-) Schritt wurde 3x wiederholt, bevor die Zellen vorsichtig in 25 ml sterilem H₂O, in 2 ml H₂O und zuletzt in Glycerol (10%) resuspendiert wurden. Schließlich wurden Aliquots von jeweils 100 μ l in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

GV3101 pMP90 – Agrotransformationen

Zunächst wurden Küvetten vorbereitet (1x pro Plasmid und 2 für die Kontrollen). Im nächsten Schritt wurden die Küvetten mitsamt Deckel vertikal in den Cross Linker gestellt. Dieser wurde auf 6000 kJ adjustiert und gestartet. Unmittelbar danach wurden die Behältnisse auf Eis übertragen. Nun wurden kompetente *A.tumefaciens* GV3101 pMP90 aus der -80°C-Lagerung entnommen und auf Eis aufgetaut. 100 µl Aliquote wurden auf 2 aufgeteilt und somit für 2 Transformationen verwendet. In Folge wurden 1-2 µl des Plasmids zu den kompetenten Zellen pipettiert und 1-2 mal angetippt (um eine Durchmischung zu begünstigen). Auf Eis vorgekühlte Pipetten wurden nun mit dem Gemisch versehen (Spitzen der Pipetten wurden zuvor abgeschnitten). Die Elektroporation erfolgte im Anschluss mit dem Programm Bacteria/AGR. Dabei wurde die Küvette zunächst mit einem Tuch sorgfältig abgetrocknet, dann wurde auf „Pulse“ gedrückt und das Behältnis wieder auf Eis gestellt.

Nun wurden 700 µl YT-Medium addiert und sämtlicher Inhalt in ein neues Eppendorfgefäß transferiert. Die Bakterien wurden daraufhin 1 h bei 30°C am Schüttler inkubiert. Der Inhalt des Tubes wurde auf Nährstoffplatten ausplattiert (mit Antibiotikum im Nährmedium). Zuletzt wurde noch 2-3 Tage bei 30 °C inkubiert.

Waschen der Küvetten

Anfangs wurden 200 ml Triton X-100 – unter gutem Mischen mit dem Rührstab – hergestellt. Nun wurden die Küvetten mitsamt Deckel für mind. 30 min oder Ü/N in die Waschlösung gegeben. Anschliessend erfolgte eine Spülung mit diH₂O, dann mit 0,25 M HCl. Eine Inkubation bei 30 °C erfolgte wieder - gefolgt von einer erneuten Spülung mit diH₂O. Zuletzt wurde das Reaktionsgemisch mit 100 % Ethanol versetzt. Nach Trocknung an der Luft wurden die Küvetten zurück in die Verpackung gegeben.

3.2.12 Plasmid-DNA Minipräparation aus *Agrobacterium tumefaciens*

Anfangs wurden 2 ml der Agrobakterium-Flüssigkultur bei 5000 rpm für 5 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und 200 µl GTE-Buffer hinzugefügt. Die Suspension des Pellets erfolgte durch ein gezieltes „Reiben der Tubes an einem Eppendorfständer“. Nach einer 5-minütigen Inkubationszeit bei RT wurden 400 µl von

einer kurz vorher vorbereiteter 0,2 M NaOH/1% SDS-Lösung hinzugefügt (1 ml NaOH, 1 M; 250 µl 20% SDS; 3,75 ml diH₂O, steril). Die Tubes wurden nun mehrere Male geschwenkt um sie daraufhin 15 min auf Eis zu inkubieren. Nach der Zugabe von 300 µl 3 M K⁻/ 5 M Acetat-Lösung (pH 4,8) (3 M Kaliumacetat und 2 M Essigsäure, mit weiterer Essigsäure auf pH 4,8 eingestellt) wurden die Eppendorf-Gefäße 2-3x heftig per Hand geschüttelt. Im nächsten Schritt wurde auf Eis für 30 min inkubiert. Nun folgte ein Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm und 4 °C für 15 min mit einer darauf folgenden vorsichtigen Abnahme und Überführung des Überstands in ein neues Tube. Danach fügte man 500 µl einer Phenol:Chlorophorm:Isoamylalkohol (24:24:1)-Mischung (2,4 ml:2,4 ml:100 µl; die untere Phase des Phenols aus der Vorratsflasche, Abzug!) hinzu. Im Abzug wurden die Tubes in Folge 1 min lang geschwenkt. Nach einer 5 minütigen Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4°C wurde der Überstand in 2 ml - Eppendorfgefäße überführt, in die bereits zuvor 1200 µl Isopropanol vorgelegt wurde. Nach dem Vortexen der Suspension erfolgte ein 30-minütiger Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde verworfen und 500 µl Ethanol addiert und gevortext. Daraufhin wurde 10 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Flüssigkeitsreste wurden verworfen bzw. mit der Pipette „abgesaugt“. Nun erfolgte eine Lufttrocknung des Pellets bis es ein glasiges Aussehen erlangt hatte. Selbiges wurde noch in 40 µl TE-Puffer mit 2 µl RNase (200 µg/ml) gelöst. Dafür wurde 10 min am Schüttler bei RT, danach bei 37 °C inkubiert. Nun wurde ein Restriktionsverdau mit 10 µl der Miniprep (RNase-Verdau gleichzeitig mit Restriktionsverdau möglich) durchgeführt. Zuletzt wurden noch Kryostocks mit der restlichen Übernackkultur hergestellt, indem 500 µl der Kultur mit 500 µl 87% Glycerol versetzt wurden (wobei auf Sterilität geachtet wurde!).

3.2.13 Sequenzierung

Folgender Ansatz wurde hergestellt:

Terminator Ready Reaction Mix	4 µl in ein 200 µl-Tube
Primer, 4 µM	0,8 µl (= 3,2 pmol)
Template	max. 1,0 µl (200-300 ng Plasmid)
dH ₂ O	14,2 µl
Gesamt	20 µl

Einstellungen des PCR-Cyclers:

Name des Programms: Bigdye

Denaturation: 96°C 30 s

Annealing: 50°C 15 s

Elongation: 60°C 4 min

Zyklen: 25

Ethanol NaOAc Präzipitierung:

- 50 µl einer 95% EtOH/2 µl 3M NaOAc-Lösung (pH 4,8 - 5,2) wurden in ein 1.5 ml - Eppendorfggefäß vorgelegt. Nach dem Hinzufügen der PCR-Mixtur folgte ein 15-minütiger Inkubationsschritt. Nun wurde bei 13.000 rpm und 4 °C für 25 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen, indem bei 13.000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert wurde. Der Ethanol-Überstand wurde abermals verworfen und das Pellet in der Speed Vac für 5 min getrocknet. Zuletzt wurde noch auf eine eindeutige Beschriftung der Tubes, die Nummer, Name, Datum und Arbeitsgruppe inkludierte, geachtet.

Folgende DNA-Mengen wurden verwendet:

Plasmid-DNA (ddDNA) 200-500 ng

3.2.14 Herstellung transgene Pflanzen**Pflanzen auf Erde, Wachstumsbedingungen,****Vorbereitung von *Agrobacterium tumaciens***

Arabidopsis thaliana Col-0 (colwt) Samen wurden zuerst oberflächensterilisiert und auf agarhaltigem (1%) Murashige & Skoog Medium mit 4,5 % (w/v) Saccharose ausplattiert (siehe 2x – Ausplattieren von Samen). Dazu wurden je 20 Samen in 6 Reihen platziert. Die mit Parafilm verschlossenen Platten wurden zunächst 2 Tage bei 4°C im Dunkeln stratifiziert, danach 14-21 Tage unter kontinuierlicher Beleuchtung bei 22°C (Rumed Lichtthermostat, Rubarth Apparate GmbH, Deutschland) aufrecht stehend inkubiert.

Einen Tag vor dem Aussetzen auf Erde wurden rechteckige Plastikblumentöpfe mit einem 50:50 Gemisch aus Pflanzenerde und Perlit befüllt, in eine Plastikwanne gestellt und gut gewässert.

Pflanzenkeimlinge wurden am darauffolgenden Tag mit einer Pinzette vorsichtig von der Medienplatte losgelöst und in Erde verpflanzt (Wurzel in eine kleine Vertiefung adjustiert). Die Töpfe wurden rasch mit Frischhaltefolie zugedeckt und samt Plastikwanne in den Wachstumsraum gestellt (kontinuierliches Licht, 20°C). Nach fünf bis sieben Tagen wurde die Plastikfolie entfernt und das Wachstum der Pflanzen über die nächsten Wochen verfolgt.

Für die *Agrobacterium tumefaciens* mediierte Transformation wurden Pflanzen dann herangezogen, wenn relativ junge Blütenstände mit möglichst vielen ungeöffneten Blüten vorhanden waren. Hatten die Pflanzen einen gewissen Entwicklungsstand überschritten, wurden die Sprossachsen mit fertig ausgebildeten Siliques abgeschnitten (neue Langtriebe treiben schon nach kurzer Zeit aus, wobei bereits nach rund zwei Wochen die Pflanzentransformation stattfinden kann).

Einen Tag vor der eigentlichen Transformation wurden die Pflanzen nicht mehr gegossen. Vor der Agrobakterium-mediierten Transformation wurden bereits entwickelte Siliques abgeschnitten und das Infiltrieren vorbereitet. Die Durchführung desselbigen erfolgte wie in Kapitel 2 (Agrobakterium - Transformation) beschrieben. Infiltrierte Pflanzen wurden waagrecht liegend im Dunkeln 24 h inkubiert (Platz sollte wenn möglich kühl sein), danach wieder aufrecht hingestellt, in die Wachstumskammer platziert und gegossen.

Transformation von Col-0 mit Agrobakteriumstämmen (pPZP + Promotor) – Dippen

Agrobakterien, die die korrekten Inserts enthielten, wurden in 5 ml YT Flüssigmedium inokuliert und über 2 Nächte und 2 Tage hinweg bei 30°C kultiviert (entsprechende Antibiotika waren im Medium enthalten). 1 ml dieser Kultur wurde in 4 ml YT Flüssigmedium (abermals mit entsprechenden Antibiotika) inokuliert. Nach weiteren 2 Nächten und 2 Tagen der Kultivierung bei 30°C wurden 2 ml dieser Kultur in 300 ml YT Flüssigmedium (mitsamt entsprechenden Antibiotika) inokuliert und für 3 Tage bei 30°C in einem 1l Flask und einem Shaker bei 180 rpm inkubiert (im Normalfall genügt es, wenn die erste Ü/N-Kultur in 300 ml YT Flüssigmedium inokuliert wird). Die Dichte und somit Wachstumsphase der letzten Ü/N Agrobakterien-Kultur wurde bestimmt, indem die OD bei 600 nm bestimmt wurde (das Optimum für Transformationen von Pflanzen liegt zwischen 1 und 2). In unserem Fall war die OD₆₀₀ genau 2. In weiterer Folge

wurden die Agrobakterien bei 6000 rpm für 20 min und 22°C zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, konnte das Pellet in 100 ml 5 % Saccharose gelöst werden. Die Suspension wurde sodann in ein 1000 ml Becherplastikgefäß übertragen und mit 5 % (750 ml) Saccharose auf eine OD600 von 0.8 verdünnt.

Vor der eigentlichen Transformation wurden noch die Schoten der etwa 5 Wochen alten, blühenden Arabidopsis Pflänzchen entfernt. Um die Transformationseffizienz zu steigern, wurde Silwet L-77 (225 µL pro 750 mL Saccharose) zur Agrobakterien-Suspension addiert. Jeweils 3 Pflänzchen (für jedes Konstrukt) wurden für 2 min in die Suspension getaucht. Die „gedippten“ Pflänzchen wurden für 24 Stunden im Dunkeln und unter einer Plastikhülle kultiviert. Danach wurden sie in die Wachstumskammer transferiert.

Samenernte und auf Aussaat auf Selektivmedium

Nach frühestens 4-6 Wochen, wenn die ersten Siliques und Deckblätter braun zu werden begannen, wurden die Pflanzen nicht mehr gegossen und im Wachstumsraum oder im Laborbereich fertig trocken gelassen.

Rund ein bis eineinhalb Wochen nach komplettem Trocknen der Pflanzen wurden die Samen geerntet (pro Blumentopf ein eigenes Reaktionsgefäß) und offen stehend weitere drei Tage getrocknet. Die so erhaltenen T1 Samen wurden in weiterer Folge auf Selektivplatten ausplattiert (MS 2,5 mit 100 µg/ml Kanamycin), um auf Integration des verwendeten pPZP211-Vektors zu testen. Keimlinge ohne ein (funktionsfähiges) NPRII Gen, das die Kanamycin-Resistenz vermittelt, stellen ihr Wachstum nach 5-6 Tagen ein, da Kanamycin die ribosomale Proteinbiosynthese stört. Resistente Pflanzen werden nach rund 5-7 Tagen deutlich unterscheidbar durch normale Grünfärbung der Cotyledonen, wohingegen die nicht-resistenten kein Chlorophyll bilden und daher klein und blass erscheinen. Je nach Infektionsgrad der Platten (Agrobakterium und Schimmel) wurden die resistenten Pflanzen bereits nach einer Woche oder aber auch erst nach zwei Wochen auf Erde gesetzt. Hierfür wurden rund 20-30 Pflanzen in Einzelpflanzenbehälter gesetzt. Die jungen Pflanzen wurden ständig mit reichlich Leitungswasser gewässert, bei Bildung der Sprossachse wurden sogenannte Aracons installiert, die später die Samenernte erleichtern sollten.

Die Pflanzen wurden schließlich nach rund 2,5-monatiger Wachstumsphase bei Bräunung der Siliques ins Labor gestellt und über zwei Wochen fertig trocken gelassen, und die

Samen mit der T2-Tochtergeneration mittels Nylonsieb geerntet. Die Samen wurden wieder für drei Tage getrocknet.

Um nun zu testen, ob eine, zwei oder mehr Kopien des Konstruktes in das Genom der Col-0 Linie eingebaut sind, wurden die einzelnen Linien auf MS 2,5 - Agarplatten mit 100 µg/ml Kanamycin ausplattiert (je 40 Samen), um die Anzahl der sensitiven Pflanzen zu ermitteln und so auf die Kopienzahl schließen zu können. Im Falle einer einzigen Kopie wird das Konstrukt auf $\frac{3}{4}$ der Nachkommen einer segregierenden Linie vererbt. Es wurde erwartet, dass $\frac{1}{4}$ der Pflanzen (rund 10 Keimlinge von 40) sensitiv auf Kanamycin reagieren (nur kleine gelbliche Keimblätter, kurze Wurzel). Bei zwei Kopien ist theoretisch nur mehr bei $\frac{1}{16}$ der Pflanzen Kanamycin-Sensitivität zu erwarten.

Nach der Bestimmung der Kopienzahl wurden von den Kanamycin-Platten einige Linien zu je fünf Pflanzen auf Erde gesetzt, $\frac{1}{4}$ ist theoretisch homozygot für das transformierte Konstrukt.

GFP-Messung transgener Pflanzen

Die ersten transformierten Pflanzen, colwt:pm2g29500-GFP, wurden bereits vor dem Ermitteln der Kopienzahl bzw. der Segregationsanalyse zum Finden homozygoter Linien, auf ihre Induzierbarkeit mit Zearalenon getestet.

Für diesen Versuch wurden relativ junge Primärblätter abgeschnitten und in Leitungswasser mit 50 µM ZON und ohne das Mykotoxin (Kontrolle) inkubiert („detached leaves“). Der Versuch wurde sowohl in einer 24-well Platte als auch in Schüttelkolbenkultur durchgeführt.

a) 24-well Platte:

Von jeder T1-Pflanze wurden zwei Blätter abgeschnitten und in die Wells zweier Platten gegeben. Anschließend wurde jeweils 100 µl 50 µM ZON (in Leitungswasser) bzw. 0,05% DMSO in Leitungswasser (Mock-Kontrolle) hinzupipettiert, im Labor am Schüttler bei ~ 60 rpm inkubiert und anschließend die Fluoreszenz-Aktivität nach 30, 60, 120, 240 und 360 Minuten unter dem UV-dissecting Mikroskop untersucht. Als Filter wurde GFP2 und GFP3 verwendet, wobei der GFP3-Filter die Emissionswellenlänge des Chlorophylls und so die starke Autofluoreszenz der Chloroplasten in den Primärblättern herausfiltert.

Zusätzlich wurde auch die Fluoreszenz nach dem Austrocknen des Mediums in den Wells gemessen, wobei Fotos der DMSO-Mockkontrolle und der ZON-induzierten Blätter aller Linien aufgenommen wurden.

b) Schüttelkultur

Sterile 50 ml Erlenmeyerkolben wurden zuerst mit 5-20 ml 10 μ M (Versuch 1) und 50 μ M ZON (Versuch 2) in Leitungswasser bzw. nur Leitungswasser als Kontrolle befüllt und abgeschnittene Primärblätter zusammen in einem Kolben pro Linie und Medium inkubiert. Um eine bessere Aufnahme des Zearalenons in die ‚detached leaves‘ zu erreichen, wurden sie kurz infiltriert - durch Anlegen eines Vacuums und raschem Entspannen. Anschließend erfolgte eine Inkubation im Klimaschrank bei 22°C und ~ 40-50 rpm.

Alternativ wurden die ‚detached leaves‘ vor der Induktion bereits einen Tag früher in Leitungswasser bei 22°C, kontinuierlichem Licht und 50 rpm inkubiert, um die Blätter an die Flüssigkulturbedingen zu akklimatisieren. Die Fluoreszenz - Messungen wurden nach 0, 30, 60, 120 und 240 Minuten durchgeführt.

Einstellungen am Mikroskop: Filter GFP2 und GFP3, Blende ganz offen, UV-Lampe 30 Minuten vor Verwendung eingeschaltet und auf zweithöchste Stufe aufgedreht. Fotos wurden mit der IMC50 Leica Imaging Software aufgenommen und die Einstellungen aus dem Programm mth-GFP übernommen.

4 ERGEBNISSE

Mehrere Online-Tools wurden in unserer bioinformatischen Analyse verwendet. Sie werden allesamt unter **Punkt 4**, gemeinsam mit der konkreten Anwendung, vorgestellt.

4.1 Bioinformatische Analyse der Promotorregionen

Für die Bestimmung möglicher Transkriptionsstartstellen und Regionen, die dem Promotor zugehörig sind (Y-Patches, TATA-Boxen und REGs), war das Programm „plantpromoterdb 2.0“ hilfreich. Bei diesem Programm bedient man sich einer Kombination von Elementen - ähnlich zu neuronalen Netzwerken und genetischen Algorithmen - um Sequenzmuster, wie sie eben auch Promotoren darstellen, zu identifizieren (Knudsen, 1999). Diejenigen Elemente, die in unseren 10 ausgewählten Genen gefunden wurden, sollen im Folgenden kurz beschrieben werden.

Zunächst zu den Promotorelementen: eine TATA-Box wurde in 3 Promotoren gefunden (AT5G59720, AT1G52560 und AT2G15490). Ein Y-Patch wurde in 2 Promotoren detektiert (AT1G53540 und AT2G15490). REG-Sequenzen wurden in 6 -, in 4 Promotoren hingegen nicht gefunden (AT1G52560, AT1G15520, AT1G17180 und AT1G60730). Die grafisch dargestellten, über plantpromterdb 2.0 erhaltenen Ergebnisse sind in den Abbildungen 7-16 zu finden. Sie zeigen die putative Promotorregion der ausgewählten Gene (zwischen 3'-Ende des stromaufwärts liegenden Nachbargens und 5'-Ende/5'-UTR des Zielgens, kodierende Bereiche (CDSs), transkribierte, aber nicht-translatierte Bereiche (UTRs) und die Intron/Exon-Struktur der angrenzenden Gene. In Tabelle 7 sind die dazu ermittelten DNA-Sequenzen angegeben.

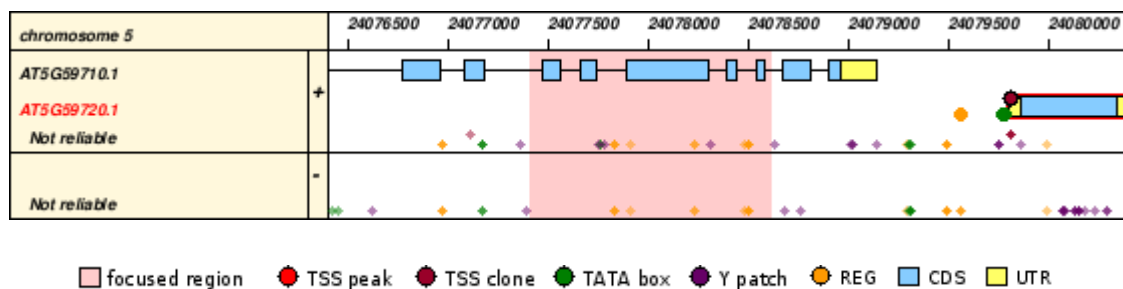


Abbildung 7: Promotorregion von AT5G59720.

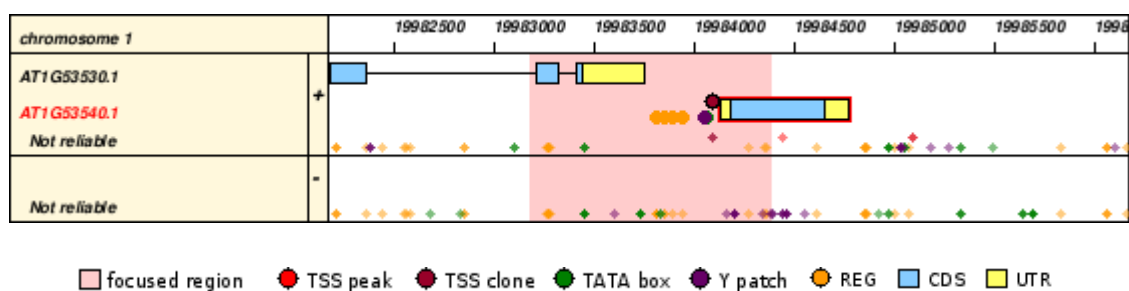


Abbildung 8: Promotorregion von AT1G53540.

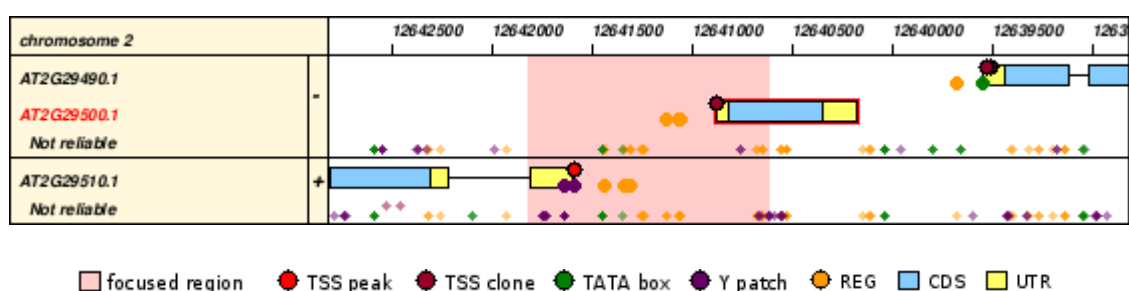


Abbildung 9: Promotorregion von AT2G29500.

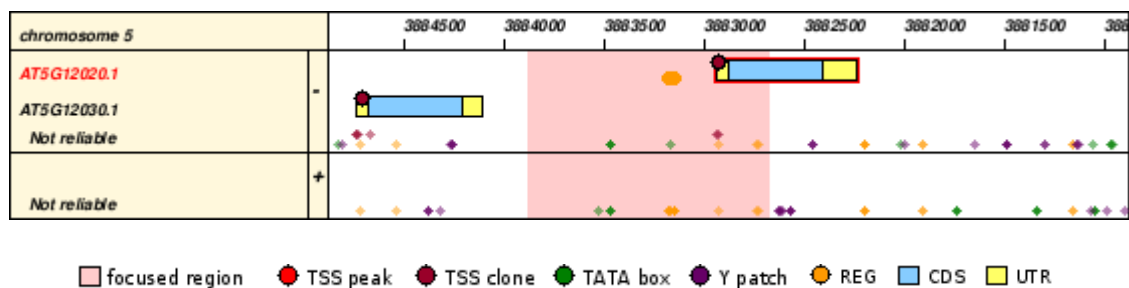


Abbildung 10: Promotorregion von AT5G12020.

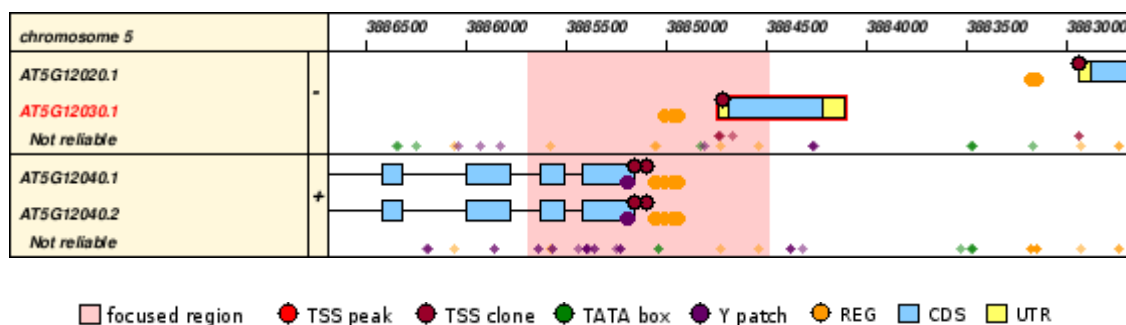


Abbildung 11: Promotorregion von AT5G12030.

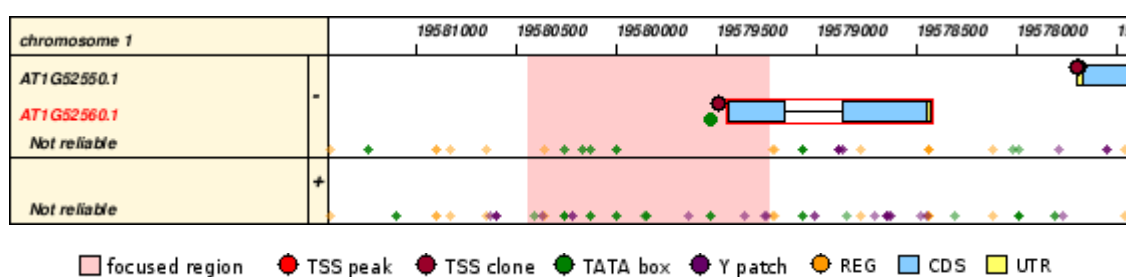


Abbildung 12: Promotorregion von AT1G52560.

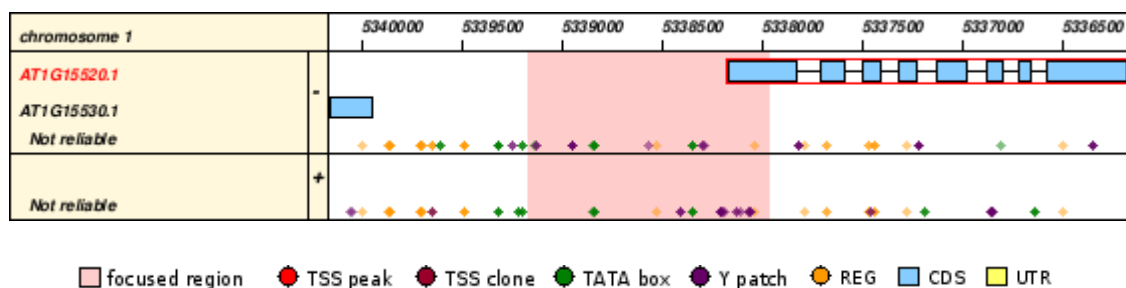


Abbildung 13: Promotorregion von AT1G15520.



Tabelle 7: Übersichtstabelle der Promotorelemente der untersuchten Gene und deren DNA-Sequenz. Zusätzlich angegeben sind die Orientierung des jeweiligen Strangs und die Position des Start- bzw. Stopcodons.

Genmodell	Promotorelemente	Sequenz	Strang	Position zu Startcodon	
				Anfang	Ende
AT5G59720	TSS	AGCAG	+	-43	
	TATA Box	TCCCTATAAATA	+	-82	-71
	REG	AAAACGGCACG	+	-296	-286
AT1G53540	TSS	ACAA	+	-62	
	TATA Box	TCCCTATAAATA	+	-123	-112
	Y Patch	CTCTCTCCC	+	-128	-120
	REG	TTAATGGGCCTC	+	-365	-354
	REG	AAAACGGCA	+	-327	-319
	REG	ACGTCGTC	+	-288	-281
	REG	ACGTCGTT	+	-231	-224
AT2G29500	TSS	TCTCTCTCT	-	-64	
	REG	AAGGCCCATTA	-	-235	-246
	REG	TAAAGCCCAT	-	-248	-257
	REG	CGAACCGGAT	-	-304	-313
AT5G12020	TSS	TAA	-	-59	
	REG	TAAAAGCCCATATA	-	-263	-276
	REG	GAATGGGCCTTG	-	-291	-302
AT5G12030	TSS	AAAA	-	-31	
	REG	CTTGGGCCTGA	-	-246	-256
	REG	ATATGGGCCTGA	-	-269	-280
	REG	ATATGGGCCTGA	-	-317	-327
AT1G52560	TSS	AAAA	-	-58	
	TATA Box	TCTTTATAAACC	-	-84	-95
AT1G15520	keine Promotorelemente				
AT1G17180	keine Promotorelemente				
AT2G15490	TSS	AAAA	+	-115	
	TSS	AAAA	+	-114	
	TATA Box	GTGTATATATCT	+	-152	-141
	Y Patch	CTCTCTTT	+	-82	-75
	REG	GGCTTTAA	+	-413	-406
	REG	CCGGTTTG	+	-296	-289
AT1G60730	TSS	TAG	-	-47	

 TSS clone
  TATA box
  Y patch
  REG

4.2 Identifikation von Promotorelementen über AthaMAP

Ein weiteres Tool, das wir benutzten, war jenes, das als „AthaMap“ bezeichnet wird. AthaMap eignet sich, um potentiellen Bindungsfaktoren eines Promotors zu identifizieren und – wie in unserer Untersuchung von Relevanz – das Spektrum der bindenden Faktoren. AthaMap kann also über das gesamte *A. thaliana* Genom hinweg die Stellen identifizieren,

die potentielle Transkriptionsfaktorbindungsstellen (TFBS) darstellen. Die über AthaMap erhältlichen Informationen basieren auf Publikationen von Arbeitsgruppen, die Bindungsspezifitäten unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren untersucht und bestimmt hatten. Zu diesem Zweck wurden matrix- und musterbasierende Screenings im *A. thaliana*-Genom durchgeführt (Bülow et al., 2009). Bei der Entwicklung von AthaMap wurde des Weiteren ein Programm zum Finden von Patterns – Patsy – eingesetzt. Untersucht wurden öffentlich zugängliche Datensätze, wie die TRANSFEC Datenbank (Steffens et al., 2004).

Bei unserer eigenen *in silico* Analyse haben wir 3 Promotorfaktoren (**DOF2**, **GT1** und **ZmHOX2a**) bestimmen können, die in allen 10 Promotoren binden sollten (Tab. 8).¹

Tabelle 8: Bioinformatische Vorhersage von Transkriptionsfaktorbindungsstellen (TFBS), die in allen 10 Promotorbereichen auftreten und ihre Bindungshäufigkeit.

Promotor des Gens	Transkriptionsfaktor/TFBS (Häufigkeit)		
	DOF2	GT1	ZmHOX2a
AT5G59720	5	3	2
AT1G53540	7	3	2
AT2G29500	3	3	3
AT5G12020	9	2	6
AT5G12030	9	2	5
AT1G52560	6	8	3
AT1G15520	8	7	4
AT1G17180	15	8	3
AT2G15490	8	1	7
AT1G60730	3	6	2
Mittelwert	7,3	4,3	3,7
Standardabweichung	3,5	2,7	1,8

¹ Tabelle 8: Angegeben ist die Häufigkeit, mit der die TFBS jeweils *in silico* gefunden wurden. Vertreter der **AP₂/EREBP** Familie wurden ebenfalls in allen Promotorregionen gefunden, jedoch in Form unterschiedlicher Faktoren (**RAV1**, **RAV2 o. TEIL**).

Folgende Informationen sollen noch zusammenfassend ergänzt werden:

- a. In allen Promotorregionen außer bei AT2G29500 wurden zusätzlich folgendes TFBS vorhergesagt: Familie: **HD-PHD**; Faktor: **ALFIN1**
- b. In allen Promotorregionen außer bei AT5G12030 und AT1G53540 wurden außerdem folgende TFBS vorhergesagt: Familie: **HD-ZIP**; Faktor: **ATHB1**
- c. In allen Promotorregionen außer bei AT5G12030 und AT2G29500 wurden zusätzlich folgende TFBS vorhergesagt: Familie: **C₂H₂(Zn)**; Faktor: **ID1**
- d. In allen Promotorregionen außer bei AT1G60730 und AT1G17180 wurden zusätzlich folgende TFBS vorhergesagt: Familie: **MYB**; Faktor: **GAMYB**

4.3 Genexpression bei unterschiedlichen Bedingungen - eFP Browser Analyse

Über die Webseite von BAR (The **B**io-**A**rray **R**esource for Plant Functional Genomics) hatten wir die Möglichkeit, eines von mehreren Tools für unsere bioinformatische Analyse auszuwählen. Der sogenannte Electronic Fluorescent Pictograph Browser (eFP) war Mittel der Wahl, das uns erlaubte, Expressionsdaten unserer 10 ausgewählten *Arabidopsis* Gene unter unterschiedlichsten Konditionen zu erhalten. Dieses Tool beruht auf gesammelten Microarray-Daten, die graphisch und tabellarisch umgesetzt wurden (Winter et al., 2005). Die ZON-Expressionsdaten von Col-0 Wildtyp-Pflänzchen und jene der *ZORRO* Mutante hingegen stammen aus Microarray-Daten. Eine Zusammenfassung der ZON-Expressionsdaten und der über den eFP Browser erhaltenen Werte sind in Tabelle 9 ersichtlich.

Tabelle 9: Absolutwerte der Expressionsstimulierung der untersuchten Gene durch unterschiedliche Reize

Gen	Promogrosse	ZON	Deve.Map	Hormone	Abiotic Stress	Biotic Stress	Seed	Chemical	Light Series	Tissue specif
AT1g29500	799 bp	wt-2h 11233	336,08	207,6	Heat Shoot After 3 h	117,3	22,92	37,54	577,84	532,95
		zorro 14645	Flower Stage	IAA Treated at 30 Minutes	231,73	Phytophthora infestans	96 h after imbibition in H ₂ O	3µM Brz220 Treated at 3 h	Continuous light with temperature cycles, 4h	Stem epidermis, top of stem
				Mock treatment	Heat Root After 3 h at 38°C	Control P.i. at 6 h	96 h at 22 C	BS biosynthesis inhibitor	LLHC, 100 uE, 22°C/12°C cycles	18/6 hour light/dark conditions
					1,96					
AT1g17180	1407 bp	wt-2h-5477	87,25	103,4	1549,84	323,89	1455,05	1235,29	2164,61	1975,15
		zorro-8347	Flower Stage 15, Sepals	Control at 30 Minutes	Salt Root After 6 Hours	Treated B.c. at 48 h	Cycloheximide	TIBA Treated	Circadian experiment (12h L-D cycle/const. temp.,	Guard cells, with 100uM ABA,
				GA-3 (mock treatment)	150 mM NaCl		Chem. Treat. (4d, dark 4°C)	Auxin Inhibitors	continuous L/const. Temp.)	no cordycepin nor actinomycin
At1g15520	1692 bp	wt 2h 4985	254,65	266,4	1143,21	1973,4	82,45	681,94	226,17	1646,02
		zoffo 3538	Flower Stage 15, Petals	t-zeatin Treated ARR22 Overexpressed	Salt Root After 6 Hours 150 mM NaCl	Treated B.c. at 48 Hours (Mock Tretment)	SD2 (Secondary Dormant)	10uM PNO8 Treated at 3 Hours (Photosynthesis Inhibiter PNO8)	12h light-dark cycle, no temperature cycle, leaves from older plants, 16h	Guard cells, no ABA, no cordycepin nor actinomycin
At5g12030	413 bp	wt2h 3831	4268,51	2623,12	5869,66	820,86	11388,61	507,69	153,46	8757,93
		zorro 7134	Seeds Stage 10 w/o Siliques	No Treatment (No ABA)	Heat Root After 3 h at 38°C	Avirulent P.s. at 6 H. (Mock Tretment)	DDL (Dormancy)	TIBA Treated	Short day grown plants, 28h	Guard cells, no ABA, no cordycepin nor actinomycin
					5364,95					
					Heat Root After 3 h at 38°C					
At1g53540	530 bp	wt2h 3261	992,66	992,66	6043,74	484,36	3631,66	207,41	214,31	7301,26
		zorro 5515	Dry seed	No Treatment	Heat Shoot After 3 h at 38°C	Avirulent P.s. at 6 Hours	PD30d (after ripened)	1uM PNO8 Treated at 12 Hours	Short day grown plants, 28h	Guard cells, with 100uM ABA, no cordycepin nor actinomycin
5198,54					5198,54					
					Heat Root After 3 h at 38°C					
AT5g12020	1281 bp	wt2h 2304	327,03	233,12	4769,48	425,96	1024,49	220,99	183,73	3872,59
		zorro 5488	Flower Stage 12, Petals	No Treatment	Heat Shoot After 3 h at 38°C	Avirulent P.s. at 6 Hours	abi3-4 (Mutant Seeds after 24 h imbibition in water)	TIBA Treated	Short day grown plants, 4h	Guard cells, with 100uM ABA, no cordycepin nor actinomycin
					4216,91					
					Heat Root After 3 h at 38°					
AT1g60730	1002 bp	wt2h 1971	335,73	335,73	291,87	445,69	351,15	226,49	221,87	1380,62
		zorro 522	Dry seed	No Treatment	Salt Root After 3 Hours	Treated B.c. at 48 Hours	cvi-fresh	10uM AgNO3 Treated	Circadian experiment - plants grown under 12h light-dark cycle and constant temperature, then sampled under continuous light and constant temperature, 32h	Guard cells, with 100uM ABA, no cordycepin nor actinomycin
AT2g15490	1134 bp	wt2h 253	50,8	92,64	808,33	200,67	666,76	210,75	128,32	1386,66
		zorro 1174	Imbibed seed, 24 h	Giberellin Treated at 3 Hours	Salt Root After 6 Hours 150 mM NaCl	Treated B.c. at 48 Hours	Cycloheximide	TIBA Treated	Circadian experiment - plants grown under 12h light-dark cycle and constant temperature, then sampled under continuous light and constant temperature, 0h	Guard cells, with 100uM ABA, no cordycepin nor actinomycin
AT5g59720	742 bp	wt2h 949	78,93	30,98	5209,07	56,53	423,34	124,5	90,35	1336,94
		zorro 979	Flower Stage 12, Petals	ABA Treated at 3 Hours	Heat Shoot After 3 Hours	Virulent P.s. at 24 Hours	abi3-4	1uM PNO8 Treated at 12 Hours	Short day grown plants, 32h	Guard cells, with 100uM ABA, no cordycepin nor actinomycin
					4682,15					
					Heat Root After 3 Hours					
AT1g52560	908 bp	wt2h 287	1635,21	1635,21	1835,08	87,73	4254,47	188,35	103,19	559,34
		zorro 701	Dry seed	No Treatment	Heat Shoot After 3 Hours	Heat Shoot After 3 Hours	PD30d	TIBA Treated	Long day grown plants, 4h	Root Quiescent Center
					4805,26					
					Heat Root After 3 Hours					

4.4 Promotordefinition

Ausgangspunkt für die Promotoranalyse war die TAIR Webseite („The Arabidopsis Information Resource“), mit dessen Hilfe schnell Informationen über das gewünschte Gen, wie etwa dessen Expression, dessen genomische Position, dessen Produkte und auch diesbezüglich relevante Publikationen etc. eingeholt werden können. TAIR war für uns einerseits aufgrund der Sequenzdaten unserer Gene bzw. Promotoren wichtig, andererseits erfuhren wir auch durch entsprechende Links über neueste Publikationen zu unseren 10 Genen. Des Weiteren erfuhren wir Details zu deren Exon-Intron-Struktur.

Um eine Promotoranalyse vom Startcodon ATG bis zum stromaufwärts (oder stromabwärts bei Genen, die am Komplementärstrang codiert sind) liegenden Nachbarn durchführen zu können, mussten wir zunächst die Promotorsequenz der ausgewählten Gene erhalten. TAIR lieferte uns in diesem Fall die erforderlichen Daten (DNA-Sequenzen, cDNA, CDS und genomische DNA). Sie können von TAIR einfach kopiert und als *.txt, *.doc oder als *.seq Datei in Edit Seq (DNASStar) abgespeichert werden.

5 der von uns ausgewählten Gene hatten nur ein Exon, 3 Gene hatten 2, ein Gen 5 und eines 23. Auch bezüglich der Genlängen gab es größere Abweichungen: die genomische DNA des kürzesten Gens war 648 bp (AT5g59720) und diejenige des Längsten war 6469 bp lang (AT1G15520). Splicing-Varianten (jeweils 2) wurden für AT1G52560, AT2G15490 und AT1G60730 gefunden (Tab. 10).

Tabelle 10: Länge von Intergenbereich + 5' UTR, UTRs, cDNA, CDS, Exons/Introns

Name des Gens	Promotorlänge + 5'UTR-Anteil (in bp) ohne Start-Codon	Anzahl der Exons	Anzahl der Introns	5' UTR (in bp) ohne Start-Codon	3' UTR (in bp) ohne Stop-Codon	Länge der cDNA	Länge der CDS
AT5G59720	714bp	1	0	55bp	161bp	702bp	487bp
AT1G53540	426bp	1	0	48bp	126bp	648bp	473bp
AT1G29500	733bp	1	0	65bp	188bp	715bp	462bp
AT5G12020	1230bp	1	0	62bp	172bp	702bp	468bp
AT5G12030	383bp	1	0	53bp	108bp	631bp	471bp
AT1G52560	4119bp	2	1	100bp	23bp	822bp	699bp
AT1G15520	1785bp	23	22	151bp	135bp	4558bp	4272bp
AT1G17180	1367bp	2	1	53bp	128bp	857bp	666bp
AT2G15490	1116bp	2	1	115bp	102bp	1672bp	1455bp
AT1G60730	991bp	5	4	76bp	292bp	1406bp	1038bp

4.5 Primerdesign über Seqviewer und DNASTar

Für das Design der Primer zum Klonieren der Promotorbereiche wurde zum einen der SeqViewer von TAIR verwendet. Zum anderen war für das Design der Primer zusätzlich ein weiteres Programm notwendig, welches im unserem Fall durch das Unterprogramm „PrimerSelect“ von „DNASTar“ gestellt wurde. PrimerSelect verlangt die Angabe einer Reihe von Faktoren, die im tatsächlichen Versuchsansatz vorhanden sein sollen und in der automatisierten Erstellung entsprechender Primer sein sollte. Dadurch erfährt der Prozess des Primerdesigns eine Optimierung.

Zunächst wurde im TAIR SeqViewer über Copy/Paste der Promotor des jeweiligen Gens, das Startcodon und ein Stück des ersten Exons (etwa 100 bp) in EditSeq von DNASTar übertragen. Nach Eingabe der erforderlichen Parameter wurden vom Programm potentielle Primersequenzen errechnet. Abschließend wurden noch die Erkennungsstellen von Restriktionsendonukleasen an beide Seiten angehängt, die für die zielgerichtete Klonierung der amplifizierten Sequenzen in den Zielvektor benötigt wurden. Darüber hinaus mussten die Primerbindungsstellen so gewählt werden, dass im Zuge der Klonierungen des PCR-Produkts vor einen Reporter der codierende Bereich des 5'-Endes nach der Promotorregion (siehe Tabelle 10) „im Leserahmen“ des Reportergen ist.

Tabelle 11: PCR-Primer für die Promotorklonierungen in pPZP211MCSpUC-GFP2.

Gen	Promotor-länge	amplifiziertes Fragment	Primerbezeichnung	Primersequenz
AT2G29500	708 bp	799 bp	pm2g29500_F_EcoRI	AGA ATT CGA GTT GTT GAA GCG AGT GTG
			pm2g29500_R_BamHI	ATG GAT CCG AAG AAA CTT GGA ATC ATC G
AT1G60730	915 bp	1002 bp	pm1g60730_F_EcoRI	AGA ATT CGG AAT GAA GTA AAC CAT TCA T
			pm1g60730_R_BamHI	TAG GAT CCT AGC TTA ATC CTT CTC AC
AT1G15520	1634 bp	1692 bp	pm1g15520_F_EcoRI	AGA ATT CGA AAG CCT ATT CAG ATG
			pm1g15520_R_BamHI	TAG GAT CCC TCC ATT TTG TAT CCA AG
AT1G17180	1304 bp	1407 bp	pm1g17180_F_EcoRI	AGA ATT CAA TGG AGA ATT GTT GGT AC
			pm1g17180_R_BamHI	TAG GAT CCG AAA TCA AGA AGA ATC ACC TCG
AT2G15490	1001 bp	1178 bp	pm2g15490_F_EcoRI	TGA ATT CTT GTG ATC TTA CTA TGT GA
			pm2g15490_R_NcoI	TAC CAT GGC CAT GTC TAA GAG TGG A
AT5G12020	1168 bp	1281 bp	pm5g12020_F_EcoRI_2	TGA ATT CTT TGT GTT CAA TCT TCA AAT CA
			pm5g12020_R_NcoI	TAC CAT GGC TTC GAG GAT TGA GAT TAT TGG
AT1G53540	441 bp	530 bp	pm1g53540_F_EcoRI	AGA ATT CAG CTG GTG CGT TAT GGG ATG
			pm1g53540_R_BamHI	TAG GAT CCC CCG AAG ATG CTT GGA AT
AT5G12020	1168 bp	1285 bp	pm5g12020_F_EcoRI_2	TGA ATT CTT TGT GTT CAA TCT TCA AAT CA
			pm5g12020_R_SmaI	TAC CCG GGA TGT CTT CGA GGA TTG AGA TT
AT2G15490	1001 bp	1134 bp	pm2g15490_F_EcoRI	TGA ATT CTT GTG ATC TTA CTA TGT GA

			pm2g15490_F_SacI	TGA GCT CTT GTG ATC TTA CTA TGT GAT
AT5G59720	658 bp	742 bp	pm5g59720_F_EcoRI	GAG AAT TCT GGT TCA AGC ATG ACA TGA A
			pm5g59720_R_BamHI	CAG GAT CCA TGC TTG GAA TGA GAG ACA TTG T
AT5G12030	330 bp	413 bp	pm5g12030_F_EcoRI	GAG AAT TCA ACC GTA TTG ACG CGG TCC
			pm5g12030_R_BamHI	CAG GAT CCA AAC TCC AAA TCC ATT CT
AT1G52560	4022 bp	908 bp	pm1g52560_F_EcoRI	GAG AAT TCT AGC GAC ACA ACC CAC ATA
			pm1g52560_R_BamHI	CAG GAT CCG TTT CTC AAA GCC AGA CGA G

Tabelle 12: PCR-Primer für die Sequenzierreaktionen der klonierten Promotoren

Primername	Richtung	Primersequenz
m13-F	Forward	GTA AAA CGA CGG CCA GT
m13-R	Reverse	CAG GAA ACA GCT ATG AC
pGreen-GFP	Reverse	GTT CAC GTC GCC GTC CAG C
pm1g15520_EcoRI_F2	Forward	AGA ATT CGG TCA ACT GTA CTG TAT ATG

4.6 Sequenzenvergleich über BLAST

Das letzte unter diesem Punkt der Arbeit vorgestellte Tool ist BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). BLAST eignet sich hervorragend zum Vergleich von DNA-Sequenzen. In unserem Fall sollten die generierten Primer mit den Sequenzdaten des *A. thaliana* Genoms verglichen werden. Eine hohe Übereinstimmung hätte das Neudesign des jeweiligen Primers zur Folge gehabt.

4.7 Plasmide (Beschreibung, Plasmapper, Plasmide + Insert)

pPZP211MCSpUC-GFP2

pPZP enthält sowohl von pTiT37 T-DNA, als auch von pBR322 stammende Regionen, die für den Transfer von *E. coli* zum *Agrobacterium* relevant sind. Für die Replikation in *E. coli* bzw. im *Agrobacterium* sind die Replikationsursprünge ColE1 und pVS1 essentiell. Das Resistenzgen für Spectinomycin ermöglicht die Verwendung von pPZP in *Agrobacterium*. Das lacZ Alpha-Peptid mitsamt der pUC18 Multiple Cloning Site (MCS) befindet sich zwischen dem Pflanzenmarkergen Neomycin und dem „Right Border“ (RB).

Aufgrund des normalerweise stattfindenden Transfers des RB, ist eine Neomycin-Resistenz nur dann gegeben, wenn auch das zu transferierende Gen in der nunmehr transgenen Pflanze enthalten ist. Die mittels Plasmapper erhaltene Darstellung des pPZP211MCSpUC-GFP2 Plasmids ist nachfolgend (Abb. 17) zu sehen.

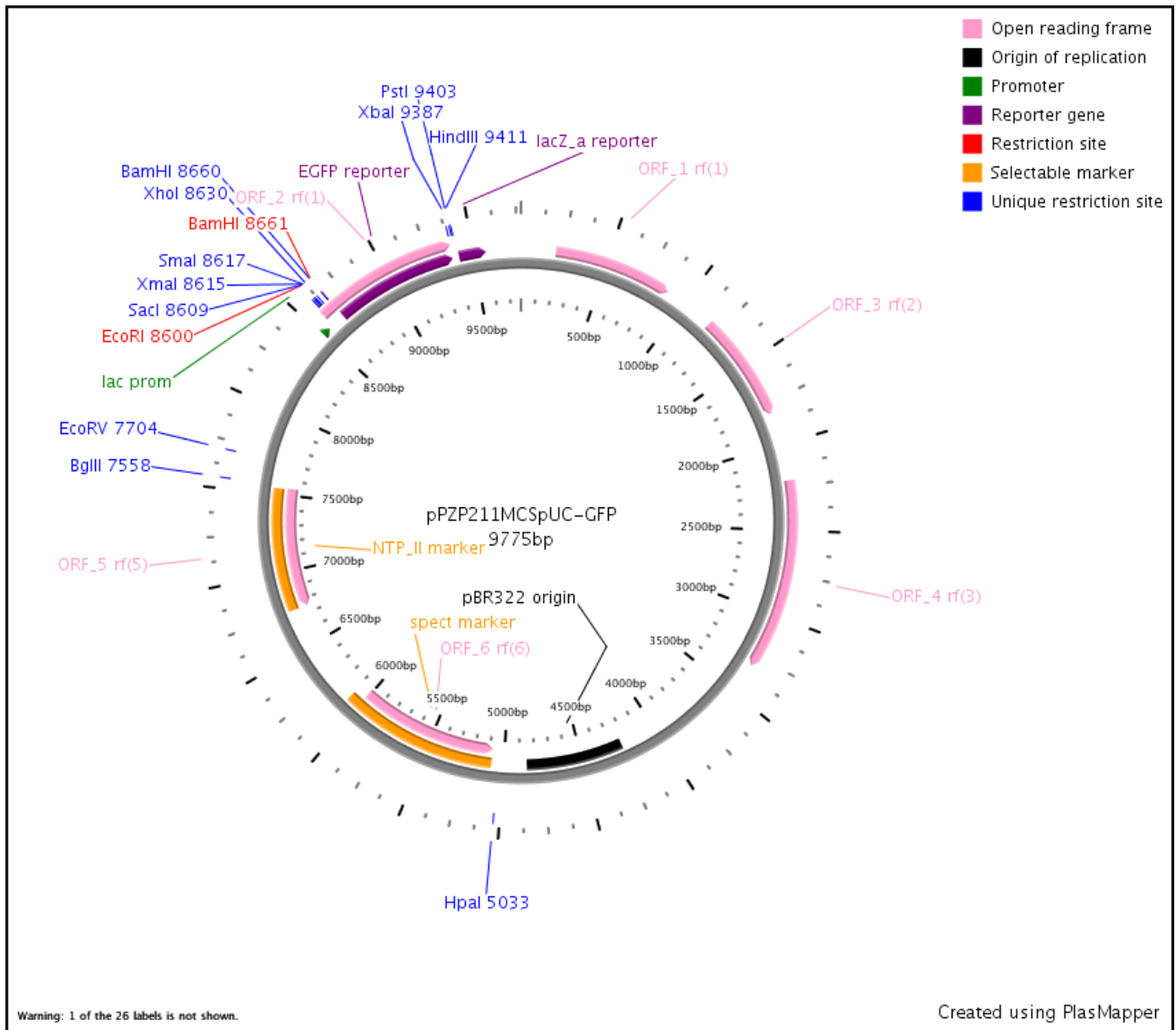
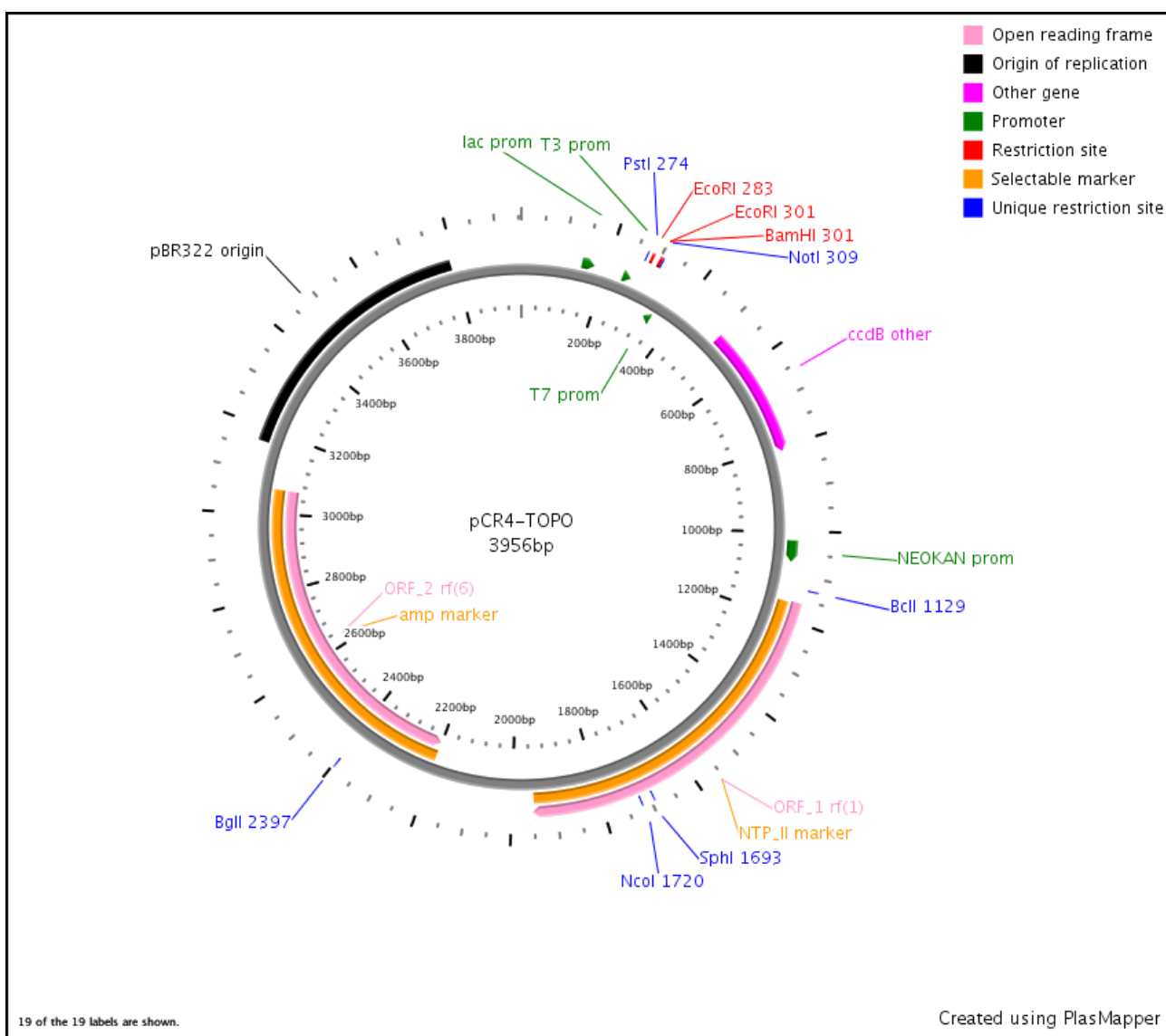


Abbildung 17: Plasmid-Karte des Vektors pPZP211MCSpUC-GFP2.

pCR4-TOPO

Mithilfe des pCR4-TOPO™-Vektors ist es möglich, PCR-Produkte direkt – ohne Ligase – zu klonieren und im nächsten Schritt auch zu sequenzieren. Ermöglicht wird das zum einen durch den 3' Thymidin-Überhang (der komplementär zu dem 3'-A ist, der am PCR-Produkt bei Amplifikation mittels DNA-Polymerase ohne 3'→5'-Exonuklease-Funktion vorhanden ist) und zum anderen durch die Topoisomerase, die kovalent am Vektor bindet



und die kovalente Bindung zum PCR-Produkt bewerkstelligt (Abb. 18).

Abbildung 18: Plasmid-Karte des Vektors pCR4-TOPO™.

pDrive®

pDrive® enthält 3'-Uracilnucleotide, die eine kovalente Bindung zu dem 3'-A des PCR-Produkts ermöglichen. Zusätzlich besitzt er mehrere Sequenzierprimer-Bindungsstellen und Promotoren zur *in vitro* Transkription. Sowohl eine Selektion auf Ampicillin als auch auf Kanamycin ist möglich. Das eingebaute LacZ-Gen ermöglicht zusätzlich ein „Blue/white screening“ (Abb. 19).

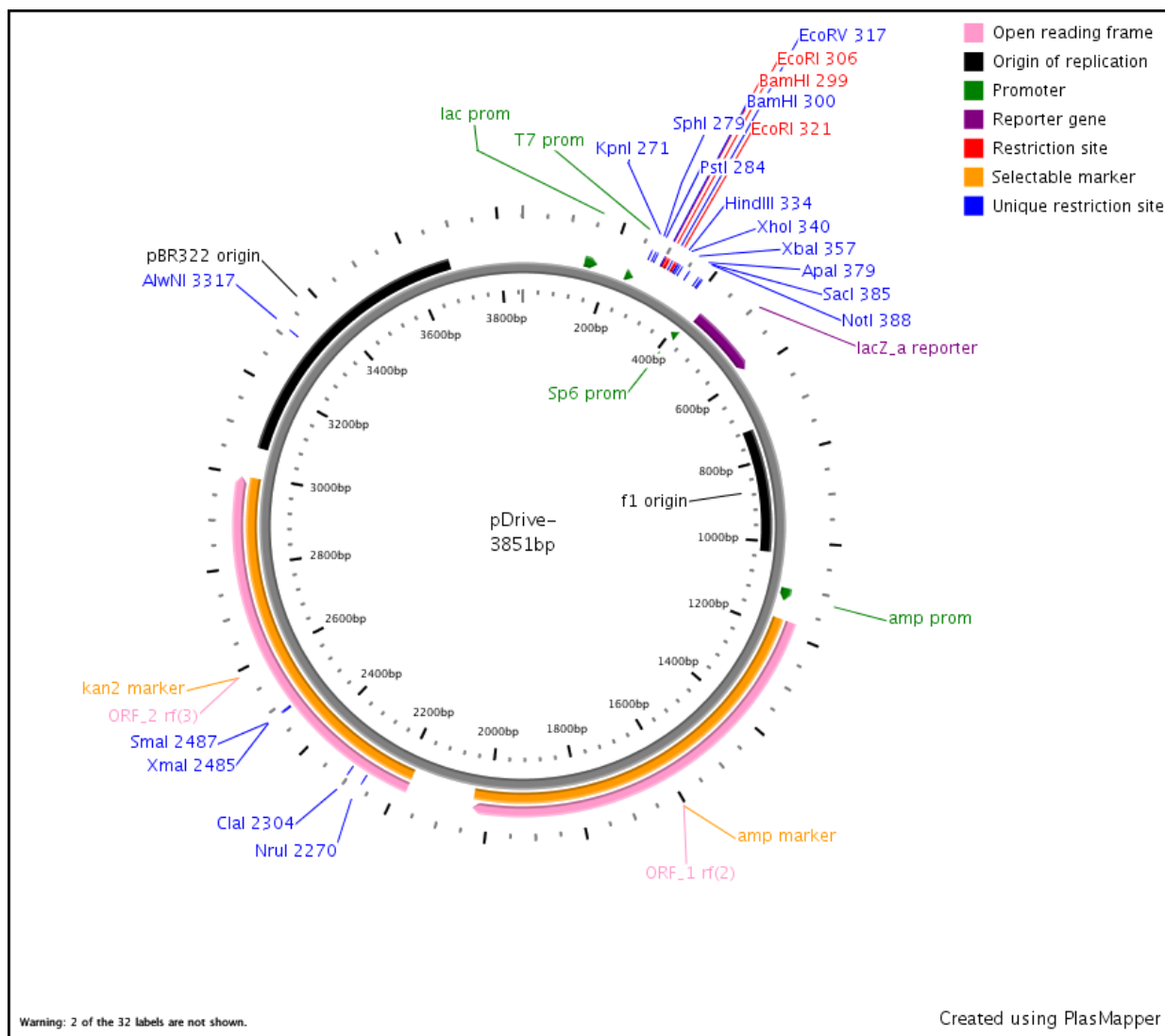


Abbildung 19: Plasmid-Karte des Vektors pDrive®.

4.8 Klonierungsstrategien (Tabellen)

Die klonierten und sequenzierten Promotoren sind im Folgenden ersichtlich. Im Vergleich zur Originalsequenz deletierte, insertierte, substituierte Nucleotide bzw. Promotor-, UTR-, Coding-Regionen und nicht sequenzierte Bereiche sind entsprechend farbig markiert. In den Tabellen 13 und 14 sind weiterführende Daten dargestellt, die Informationen über Fragmentlänge, verwendete Restriktionsschnittstellen, Vektoren und Zellen sowie Informationen zur Transformationseffizienz liefern. In den Abbildungen 19-22 sind DNA-Gele abgebildet, die einige Vektoren zeigen, die mit den in den Tabellen 13 und 14 angegebenen Restriktionsenzymen verdaut wurden. Auf den Seiten 61-71 sind zusätzlich und im Detail die sequenzierten, den entsprechenden Promoter der 10 gewählten Gene enthaltenden, DNA-Abschnitte angegeben. Deletionen, Insertionen, Substitutionen, Promotorregion, Rückgrat des Plasmids, UTR, Coding Region und nicht sequenzierte Bereiche sind unterschiedlich farblich gekennzeichnet.

LEGENDE zur Farbgebung

Hervorhebung durch Farben:

Bedeutung unterschiedlicher Schriftfarben:

Rot	Deletion (Nukleotid nicht präsent)	blau	Plasmid
Grün	Insertion	schwarz	Promotorbereich
Lila	Substitution	rot	5'-UTR
ATG	Startcodon Gen / GFP	gelborange	Kodierender Bereich
Hellgrün	GFP-Sequenz	grau	nicht sequenzierter Bereich
Gelb	Forward-Primer-Bindungsstelle (restliche Sequenz in pPZP)		
Türkis	Reverse-Primer-Bindungsstelle (restliche Sequenz in pPZP)		

AT1G15520

Promotor in pCR4-TOPO

ACCCTCACTAAAGGGACTAGTCCTGCAGGTTTAAACGAATTCGCCCTT **agaattcgaagcctattcagatgt**
acataacgtaggagacattt **ct**gtactacattgtttttcagtttcatttactctttttcagaaggtagactca
cagtggatgctttaactatggaccatgataatattaacaaggcccattaatgagtcaataagaataaaaatag
tagtattttcactattgaatcaaaccggaagagaaaacggtagccatttgacacacctacctataaattagatt
ggaacagaaacggttggacgaccaataaataatgattcgcaaca **g**gtaccaaatacacctgtttttatttaaatgaatt
ggcctaccaataactggtttcatcatcctaagctacattccgggtttgggacgttctcgatagaattggaatat
ttaaaaatg **g**caacttccaagaaagtgtgtttcgtttagtttttttggaggaagttaacgaagaccaactt
tcaattcatggtccaattagaatcttcgactcagactaataaaaagaaataaccataaaagaatatataaa **tcg**
gtcaactgtactgtatatgttttttttacacacggttaccat **y**taaattttttaatctctcttttattcatgac
ctagtatacttaattttatacattgagaagtcaattttataaattcagtgtaaatttctctagacgttaatttac
acataaccaattcaaaccacacacatatatttctctcttaaaatgcaggttttagttttaagaaatcagaagaat
atgaatattatttttgaagataaaaaagtccaaggctgatacaattcaattaataatggcggactacgaacaag
aaggggctgctgagaccacgtaacgagagtcgtcaacgtctagaagtaatacttacattcgtttgttttcttc
tcctcacgttactatttgtacattccaacttttgttttggttgaacacttgattttacaataagttaatcagt
ttctcactattttgatcattggaacatatataataatccggaaacgtaaaatggtggttggaccacgtgt
ttttgttttgtaaagatctttttgtggccaaattaaagttttgtggttgcatttaaaatggcaaagacaacaa
cgaaaaactgtccaatatgattgttgcataaaaaacatgattactgtatatattcaaacctttaatcatgaat
gagttcacactgtctagagaaatagtttagacttttagtggtggatcaattaattacttttaataaacgtctga
tgcagtaggactccttctagattttccagacagaggagtcacagctgacgtaaatagttctttttttagctg
atgtaatagtttctcttttttttccctttattcgttaaattcaaaagcacataacgtttatttcttggtcacgttc
cgtctctgattttttccacttttggtgaagaagaacatacatgcatgtgcctaattattatgaatagtgaatc
tcctcaatgcataatatatacggagcacacaaaaccaacattc **atatcatctttcatctacaatttctctcttg**
agtttcttttcatgtgttaaagtcttattgtcttgctaaattctttaaatctttcatctgacacaaacaaaa
aagagagaagaaaaaaaaagaagaagactttgattt **cttggatacaaa** **ATCGAGGATCCT** **AAGGGCGAATTC**
GCGGCC

Promotor in pPZP

ACCCTCACTAAAGGGACTAGTCCTGCAGGTTTAAACGAATTCGCCCTTAG **aattcgaagcctattcagatgt**
acataacgtaggagacattt **ct**gtactacattgtttttcagtttcatttactctttttcagaaggtagactca
cagtggatgctttaactatggaccatgataatattaacaaggcccattaatgagtcaataagaataaaaatag
tagtattttcactattgaatcaaaccggaagagaaaacggtagccatttgacacacctacctataaattagatt
ggaacagaaacggttggacgaccaataaataatgattcgcaaca **g**gtaccaaatacacctgtttttatttaaatgaatt
ggcctaccaataactggtttcatcatcctaagctacattccgggtttgggacgttctcgatagaattggaatat
ttaaaaatg **g**caacttccaagaaagtgtgtttcgtttagtttttttggaggaagttaacgaagaccaactt
tcaattcatggtccaattagaatcttcgactcagactaataaaaagaaataaccataaaagaatatataaa **tcg**
gtcaactgtactgtatatgttttttttacacacggttaccat **y**taaattttttaatctctcttttattcatgac
ctagtatacttaattttatacattgagaagtcaattttataaattcagtgtaaatttctctagacgttaatttac
acataaccaattcaaaccacacacatatatttctctcttaaaatgcaggttttagttttaagaaatcagaagaat
atgaatattatttttgaagataaaaaagtccaaggctgatacaattcaattaataatggcggactacgaacaag
aaggggctgctgagaccacgtaacgagagtcgtcaacgtctagaagtaatacttacattcgtttgttttcttc
tcctcacgttactatttgtacattccaacttttgttttggttgaacacttgattttacaataagttaatcagt
ttctcactattttgatcattggaacatatataataatccggaaacgtaaaatggtggttggaccacgtgt
ttttgttt **g**gtaaagatctttttgtggccaaattaaagttttgtggttgcatttaaaatggcaaagacaacaa
cgaaaaactgtccaatatgattgttgcataaaaaacatgattactgtatatattcaaacctttaatcatgaat
gagttcacactgtctagagaaatagtttagacttttagtggtggatcaattaattacttttaataaacgtctga
tgcagtaggactccttctagattttccagacagaggagtcacagctgacgtaaatagttctttttttagctg
atgtaatagtttctcttttttttccctttattcgttaaattcaaaagcacataacgtttatttcttggtcacgttc
cgtctctgattttttccacttttggtgaagaagaacatacatgcatgtgcctaattattatgaatagtgaatc
tcctcaatgcataatatatacggagcacacaaaaccaacattc **atatcatctttcatctacaatttctctcttg**
agtttcttttcatgtgttaaagtcttattgtcttgctaaattctttaaatctttcatctgacacaaacaaaa
aagagagaagaaaaaaaaagaagaagactttgattt **cttggatacaaa** **ATCGAGG** **GATCC** **ATG** **GTGAGCAAGG**
CGAGGAGCTGTTCAACCGGGGTGGTGG

AT1G17180

Promotor in pCR4-TOPO

CCCTCACTAMAGGGACTAGnTCCTGCAGGTTTAAACGAATTCGCCCTT **agaattcaatggagaattggttgta**
cattaatc**t**tggttgccataacggcgcttgctctaataccaaaatcgacgtaaataatgataaaagattaaat
tcggttgattcaatgaataacctcacatgtgaacaagatttgacgatcgtgattcaaaaaatgattaaactta
gttaaataaccaggagaaatgctaaaccggtcgaaaagaagaatacaagaatgaaacaaactaagtgaaaact
ttgagccaaagaaaaaaaactgaagtgaactaaaccgattagcaaaccgattaagaactttttaaccag
acacatctaaaaatcgttggatatttgcccaaagataagtcatttaatcatttgatttttgaagtattggaa
aaaatgttaaaagcaaatagttattatatcttaccatgcaaactcattctacaccgtttatttgtttaaatcgt
ttattggttatttttatttttgcgttagatgcacaaaagatacaagaatggggacaatgtgaaatgggaaatg
ggtgccaaacacatataatgagatatgcatatactctatatttttaaaaaagaggtatgtataattgtatatt
aatcaattttatttaggtttcagacagctaaaaatttggttttttgcgtatccttaaagtaaata
tagtcctaaccaaagaaaagtaaccaataaaaaagtttggaagaaagtgaaaggtatgatggcgtaag
cagtggcataatcaattcaactctgtgaatcatgtggtcaatgtcttgaaaccgaaaacattaataaatgagt
tgttcaactaaataattgtatactactcgttaccaatctctaggtttaagctttctgatttaaaatttgtcac
ataaattttacacca**g**atatttattaattccacatttttaataaaagtacgagaaactttacacgagaagaa
atc**g**acatgaaatttcaacatataaaattacaaaccccttgatagtttttttggtatgtataaccccttga
tagttgatatactcatattcaataacacaaaagtattgaagctaaataatctctgacgacttttaactaaagc
taatgaaaagaaaatgtttaatcaaaagtttattcccttcataattaaaatgctttagtgcgatgagatttagt
gtaatgggcacgttaatgcatttctgacttttagcggcaagcaaatgcgatttcgtttagtatttagtattt
gtctcctctataaattgaccaaacccttggtctcttcacca**taataatacttagacacaaaacaaaacaaa**
aatatcttagtgagcttaatcaagaacagcaATG**GCAGACGAGGTGATTCTTCTTGATTTCGGATCCTA****AAGG**
GCGAATTCGCGGCC

Promotor in pPZP

AG**aat****tcaatggagaattggttgta**cattaatc**t**tggttgccataacggcgcttgctctaataccaaaatcg
cgtaaataatgataaaagattaaattcggttgattcaatgaataacctcacatgtgaacaagatttgacgatcg
tgattcaaaaaatgattaaacttagttaaaataaccaggagaaatgctaaaccggtcgaaaagaagaatacaa
gaatgaaacaaactaagtgaaaactttgagccaaagaaaaaaaactgaagtgaactaaaccgattagcaaa
ccccgattaagaactttttaaccagacacatctaaaaatcggttgatatttgcccaaagataagtcatttaa
tcatttgatttttgaagtatttggaaaaaatgttaaaagcaaatagttattatatcttaccatgcaaacctcatt
ctacaccgtttatttgtttaaatcggttatttggttattttatttttgcgttagatgcacaaaagatacaagaa
tggggacaatgtgaaatgggaaatg**g**gtgccaaacacatataatgagatatgcatatactctatatttttaaa
aaagaggtatgtataattgtatattaatcaattttatttaggtttcagacagctaaaaatttggttttttgcgtt
tttttgcgtatccttaaagtaaataatagtcctaaccaaagaaaagtaaccaataaaaaagtttggaagaaagtga
aggtaaaaaggtatgatggcgtaagcagtggcataatcaattcaactctgtgaatcatgtggtcaatgtcttg
aaccgcaaaacattaataaatgagttgttcaactaaataatgtatactactcgttaccaatctctaggttta
agctttctgatttaaaatttgtcacataaaattttacacca**g**atatttattaattccacatttttaataaaag
tacgagaaactttacacgagaagaaatcaacatgaaatttcaacatataaaattacaaaccccttgatagttt
tttttggtatgtataaccccttgatagttgatatactcatattcaataacacaaaagtattgaagctaaataa
tctctgacgacttttaactaaagctaataagaaaagaaatgtttaatcaaaagtttattcccttcataataaa
atgcttttagtgcatgagatttagtgtaatgggcacgttaatgcatttctgacttttagcggcaagcaaatgcg
atttcgtttgtagttttgagttattgtctcctctataaattgaccaaacccttggtctcttcacca**taata**
cttagacacaaaacaaaacaaaataatcttagtgagcttaatcaagaacagcaATG**GCAGACGAGGTGAT**
TCTTCTTGATTTCG**GATCCATG****GTGASNC****AAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTG**

AT2G15490

Promotor in pCR4-TOPO

TTACCCACTWTCAGAATTACCCCTCACTMAAGGGACTAGTCCTGCAGGTTTAAACGAATTCGCCCTTtgagctc
ttgtgatcttactatgtgatttatatggcatggattatataggtcggatttttctttgaattttaagtatataa
atttgaagtaacaaagtattgtgtagtaattgatgcatgaaaaattggtaaatgaatctagggcctaaactagta
tagtttcagggtttattccaccaaactcttagcgtatgtcacttggatccaccaaacttgatccaagcggttta
caaaattgtataccgagctaaaaataaaacatttctttgttgtttccacaaaccttattttctaacatagccta
catgtctttctccttaagcactcattcttttggcctctcgactctttgaaaatctctcacattaagacttaaat
gttacccaaaccctaattaaactactcgagaaccccatgttctgtgtccatgagaattctcactcaagtcttccc
tttagccacttacaaaactacttgtagaactatggctatgaatgatgacataactcgcacccaaaaccgcatc
gtaacagtgttgtaatagtatcaaaatctttacatatatacatatatactatgtatttttgttactatttaaac
cgcaccgcacttctcccacaccacaaaacgcagtcactattcggacaatatgttttaaaaacgctattttgcc
attccccataggtcatggcttttaaatgcaaagccttcgaaatttatggctcatagcttgcacaatactcatc
gctaagtgagaagtgcaaagtttgccttctacgagaaacagaacacatgtgctgactcgattcccggttttagc
caaccaaagatgacgaaccagaatacggcaacacaaaagtaaaatatgacgtatgcaaacacgtaagtgatct
tcgttaattaattttttatctgatcttctccactgtcttcttttaagtgcacacgtgcgtgtatatactctg
atatggccgaaactggaagaaacaaattcagacaaagtcctcaagctaagaaaagagactctctttgtttgtct
ggcagaataattttccattcttgttctgttttcttttcttttcttttcttttcttttcttttcttttcttttct
AGAGCAAAATTCATATTTTGTCTCTCCCGGGTAAGGGCGAATTCGCGGCCNCTA

Promotor in pPZP

tgagctcttgtgatcttactatgtgatttatatggcatggattatataggtcggatttttctttgaattttaag
tatataaatttgaagtaacaaagtattgtgtagtaattgatgcatgaaaaattggtaaatgaatctagggcctaa
actagtatagtttcagggtttattccaccaaactcttagcgtatgtcacttggatccaccaaacttgatccaag
cgttttacaaaattgtataccgagctaaaaataaaacatttctttgttgtttccacaaaccttattttctaaca
tagcctacatgtctttctccttaagcactcattcttttggcctctcgactctttgaaaatctctcacattaag
acttaatgttacccaaaccctaattaaactactcgagaaccccatgttctgtgtccatgagaattctcactcaag
tcttcccttttagccacttacaaaactacttgtagaactatggctatgaatgatgacataactcgcacccaaaa
ccgcatcgtaacagtgttgtaatagtatcaaaatctttacatatatacatatatactatgtatttttgttacta
tttaaacgcaccgcacttctcccacaccacaaaacgcagtcactattcggacaatatgttttaaaaacgcta
ttttgccattccccataggtcatggcttttaaatgcaaagccttcgaaatttatggctcatagcttgcacaat
actcatcgctaagtgagaagtgcaaagtttgccttctacgagaaacagaacacatgtgctgactcgattcccgg
ttgtagccaaccaaagatgacgaaccagaatacggcaacacaaaagtaaaatatgacgtatgcaaacacgtaa
gtgatcttcgttaattaattttttatctgatcttctccactgtcttcttttaagtgcacacgtgcgtgtata
tatctcgatatggccgaaactggaagaaacaaattcagacaaagtcctcaagctaagaaaagagactctctttgt
tttgcctggcagaataattttccattcttgttctgttttcttttcttttcttttcttttcttttcttttctttt
TGAAACAGAGAGCAAAATTCATATTTTGTCTCTCCCATGCTGAGCAAGGGAGCGGAGGKTTTCANCCGGGGT

AT2G29500

Promotor in pCR4-TOPO

AATTAACCCCTCACTCCAGGGATTAGNTCCTGCAGGTTTAAACGAATTCGCCCTtagaattcagagttggtgaag
cgagtgtgttttgttcgccgagtccttcgtcgaagttgtttttttttttcccaaaaaaaaaaacatatctt
tttgtggccgacggttttagtaaaaaaacagtataattttttataaagatgggcccaatagtagaatcgtacg
ctcaagattccgtaatgaacgcgggaagttacgtcattgtgaccctacttacttagtgagctcaatgtccaa
tatacacggttggatttgtttaatcctccttttagatgggccagtttttagtaatatctattcaattcagca
cgttatacaattgcttttaagcccatggcccataatactcagacagccttaaatgcttcagattaacaaaga
aatgttttagattttatggatagtgtagtagtccaattattttggaaatttaattcggttaaccagtcga
accggataatctgtagaaatccagtttttttttgggaagactacatatgttctaaagcccatgaaggcccat
taaaccacaacgaacacaaacaatcttcaaaatgctcctagaattttctggattcacctgatttttctcataga
cgtcctctagatgtttctgtattccccataacaactcgagaagctcgagaaatttcggttagtacctttaaat
agcttcaaaaatccttcgtgtgttctatcagaaaatcgaaaaatcaaagttctcaagaagatatcaacaaaaaa
aaaaagtaaatctctttaaATGTCGATGATTCGAAGTTTCTTCGGATCCAT AAGGGCGAATTCGCGGCCAGCT
AAAGTCAATTCGCCACTAT

Promotor in pPZP

tagaattcagagttggtgaagcgagtggttttgttcgccgagtccttcgtcgaagttgtttttttttttcc
aaaaaaaaaaaaacatatctttttgtggccgacggttttagtaaaaaaacagtataattttttataaagatggg
cccaatagtagaatcgtacgctcaagattccgtaatgaacgcgggaagttacgtcattgtgaccctacttact
tagtgagctcaatgtccaatatacacggttggatttgtttaatcctccttttagatgggccagtttttagta
atattctattcaattcagcacggttatacaattgcttttaagcccatggcccataatactcagacagccttaa
atgcttcagattaacaaagaaaaatgttttagattttatggatagtgtagtagtccaattattttggaaatt
taattcggttaaccagtcgaaccggataatctgtagaaatccagtttttttttgggaagactacatatgttc
taaagcccatgaaggcccattaaaccacaacgaacacaaacaatcttcaaaatgctcctagaattttctggatt
cacctgatttttctcatagacgtcctctagatgtttctgtattccccataacaactcgagaagctcgagaaat
ttcgggttagtacctttaaatagcttcaaaaatccttcgtgtgttctatcagaaaatcgaaaaatcaaagttctc
aagaagatatcaacaaaaaaaaaagtaaatctctttaaATGTCGATGATTCGAAGTTTCTTCGGATCCATGCT
GAGYAGGGAAGAGGAGGTGTTCACCGGGGTGT

AT5G12020

Promotor in pDrive

CCCATGTTCTAATACGACTCACTATASGGAAAGCTCGGTACCACGCATGCTGCAGACGCGTTACGTATCGGAT
CCAGAATTCGTGATTTtgaattctttgtgttcaatcttcaaatcaatgaagttttgtctctcttgaaccatcc
atgcttatgaggcaaaaataggaccacaacaaaaagacaccgaatggtcattcctctgtttttgcagaaatt
attactgttcatcctttcctaatatcattggtgctatttagcacattggccatcaaattccacatttgcatttc
acccttatctctgcagtcagcaaaaatataatttttgagttatgtcccttgaagtaatttatgggtatgagatc
agtaacacagtggtattatatctgcaaaaactcttacatattcaattttatcctttaagtattagatgaaagg
aaacaattttgttattctgatttttaaaatccaaacaactctttgtactttttcatgttgataacgtaactg
aatcttcagctactacatctgtagtataatacgaagctgataatctcaatctgctacattattttttaaatga
aatttgcatttgcgaatgcaaaataacatcaactgagttttaagacaaatcaagttttgtgcagatttgaacc
gtctttaatagcttatattaatgtcgttatacacgatttagtggtattcagtgagttagtgcctaccacatata
tagtatttttctttggtcactaaaaataaatatggtctttcattaatttttctgaccagaaaccagagcatata
ctaatttagtcttgtttccatcattaagactttgaacttctgatcttgagggtgcatgttgtagacttgaatc
caagtcttcagcaattgtatgtactttccagttgaatgtattctttaaaatgagcaatattgttcggattcct
taaatcacaaaatttgttctttaatttgcataaaactaatcttatgaatcatgaactattttcacatatgga
atgggccttgatataattcctaatttaaaagcccatatagatattaaaaattctgtaaagttatggctcatatt
ttatcaaacctgagttacagagttcacaaaaaccagaacgaccaagacgtttctcgacaataacggaagaact
tctaaagaccgcgacaatcgctctctcgacaatcctctagaaatatccatctccactcctatttaagtcccca
catttctcacatcaaatctatcaaaagaaaaacaaaagccaagaatcaaagaatcaggaaagcaaacacaacac
aactaacaATGCGATTTAGGAAGGTTTCCAATTAATCTCAATCTCGAAGACATCCCGGGTAATCTGAATTCGT
CGACAAGCTTCTCGAGCCTAGGCTAGCTCTAGACCACACGTGTGGGGGCCGAGCTCGCGGCCGCTGTATTC

Promotor in pPZP

gaat **ctcttctgtgttcaatcttca**aatcaatgaagtttttgcctctcttgaaccatccatgcttatgaggcaaaa
 ataggaccacaacaaaaaagacaccgaatgggtcattcctctgttttgcagaaattattactgttcaccttt
 cctaatatcattgggtgctattttagcacattggccatcaaattccacatttgcatcttcacccttatctctgcagt
 cagcaaaaatataattttggagttatgtcccttgaagtaatttatgggtatgagatcagtaacacagtggttatt
 atatctgcaaaaactcttacatattcaattttatcctttaagtattagatgaaaggaaacaattttgttattc
 tgattttaaaatccaaacaactctttgtactttttcatgttggataacgtaactgaatcttcagctactaca
 tctgtagtataatacgaagtctgataatctcaatctgctacattattttttaaatgaaatttgcatcttgcaat
 gcaaataacatcaactgagttttaagacaaatcaagttttgtgcagatttgtaaccgtctttaatagcttata
 ttaatgtcgtttatacacgatttagtggtattcagtgagtttagtgctaccacatatatagttttttctttgggt
 cactaaaataaatatgggtctttcattaattttctgaccagaaaccagagcatataactaatttagtcttggtt
 ccatcattaagactttgaacttctgatcttgaggtgcatgttgtacacttgtaatccaagtcttcagcaattg
 tatgtactttccagttgaatgtattctttaaaatgagcaatattgttcgattccttaaatcacaaaatttgg
 tctttaatttgctaaaaacactaatcttatgaatcatgaactattttcacatatggaatgggccttgatatatt
 cctaatttaaaagcccatatagatatataaaattctgtaaagtattggctcatattttatcaaacctgagtta
 cagagttcacaaaaaccagaacgaccaagacgtttctcgaacaatacgaagaacttctaagaccgcgacaa
 tcgctctctcgcacaatcctctagaaatatccatctccactcctattttaagtccccacattttctcacatcaaac
 tc**atcaaaagaaaaacaaaaagccaagaatcaaagaatcaggaaagcaaacacacacaaactaaca****ATG****GATTTA**
GGAAGGTTCCAATAATCTCAATCCTCGAAGACATCCC**CAT****GGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTC**

AT5G12030

Promotor in pDrive

TAATACGACTCACTATCGGGAATTGCTCGGTACCACGCATGCTGCAGACGCGTTACGTATCGGATCCAGAATT
CGTGATT**gagaattcaaccgtattgacgcggtt**caatcaattttatacactaaattcgaatgaaatcgtaacca
 aaccggataaaatttaacatccttactaaatccaaaacagaatacatatgggcctgaaaacgaattgggtcttg
 gcctgaccgaatcaatcgcttttctctacattcgctctagaaatatccatctacacttctccaacgatcaagac
 gtttctcgaacgtagagaagcgcttttaagtcttataacaccgaaacaatcgctctctctacattgctctag
 aactatccaactcaacttctatttaataactttcttacatcaaaatcaaaatc**aatcaaaccaagaaaaagcc**
aagaagcaagaaagttaacacacacagctaaga**ATG****GATTGGAGTTTGGATCCTGAATCTGAATTCGTCGACA**
AGCTTCTCGAGCCTAGGCTAGCTCTAGACCACACGTGTGGGGCCCGAGCTCGCGGCCGCTGTATTCTATAGT
GTCACCTAAATGGCCGCACAATTCACCTGGCCGTCGT

Promotor in pPZP

GCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACATGATT
ACG**aattcaaccgtattgacgcggtt**caatcaattttatacactaaattcgaatgaaatcgtaacaaaccgga
 taaatttaacatccttactaaatccaaaacagaatacatatgggcctgaaaacgaattgggtcttgggcctgac
 cgaatcaatcgcttttctctacattcgctctagaaatatccatctacacttctccaacgatcaagacgtttctc
 gaacgtagagaagcgcttttaagtcttataacaccgaaacaatcgctctctctacattgctctagaactatc
 caactcaacttctatttaataactttcttacatcaaaatcaaaatc**aatcga****aaaccaagaaaaagccaagaag**
caagaaagttaacacacacagctaaga**ATG****GATTGGAGTTTGGATCCTGAATCTGAATTCGTCGACA**
TCAACCGGGGTGTGCAGACCGCGTGTGAC

¹ Die Sequenz zeigte bei der SmaI Klonierungsstelle (CCC¹GGG), dass offensichtlich im Zuge der Blunting-Reaktion (Mung Bean Exonuklease) mehr Basen als erwünscht vom linearisierten Vektor abgespalten wurden. Dadurch wurde das Startcodon des GFPs entfernt, jedoch bleibt die codierende Sequenz des GFP-Proteins im Leserahmen des Startcodons der putativen Promotorregion.

AT5G59720

Promotor in pDrive

GCTCGGTACACGCATGCTGCAGACGCGTTACGTATCGGATCCAGAATTCGTGATTgagaattctggttcaag
catgacatgaa caggcaataaataagttgagattttgatcacagtaactgatacttgaatcgaatcatttaga
tttttttttttttagtttacttggttagtaaatatggtgtctatgttgtcacaaaaacgtggctcagttct
tgtatatatggagacaaaaaaatccattaaaagattggtgacattctcgaaatttagtgccaactgttattg
cgagaacttactatagttttcctttggcgaaaagctaataatcttaaatcttgattttgtcctcttttctctg
agttagattttcttaaatccacttccgacctattaagaaatgggcttttgcaaagaagatccgcttcactga
gcccgtatctcgaagaggataatacaacaacaaagcaaacggcacgtagttttaattgtaaccaaggattgc
atctcggtcttggtttcaacaaacgaaacttctgaaatgccaagaaaaatctggtcatttcaccacagtgatc
attgtgtatgtgttctaaagactcctagcgaagggttttagaaaaaggagcattttctattctattcaagaac
tcgaagaacattctctctcatcctctaaacttccctataaatatgtcctttgctaatacatagatcaaatacagcag
gaaaatcaagaacccaaagtctcccgaaaagcaacgaacaATGCTCTCATTCCAAGCATGGATCCTGAATCT
GAATTCGTCGACAAGCTTCTCGAGCCTAGGCTAGCTCTAGACCACACGTGTGGGGGCCCGAGCTCGCGGCC

Promotor in pPZP

AGCGGATAaCMATTTACMCAGGAACAGTATGACATGATTACgaattctggttcaagcatgacatgaa caggc
aataaataagttgagattttgatcacagtaactgatacttgaatcgaatcatttagatttttttttttttag
tttacttggttagtaaatatggtgtctatgttgtcacaaaaacgtggctcagttcttgatatatggagaca
aaaaaatccattaaaagattggtgacattctcgaaatttagtgccaactgttattgcgagaacttactatag
ttttcctttggcgaaaagctaataatcttaaatcttgattttgtcctcttttctctgagttagattttcttaa
attccacttccgacctattaagaaatgggcttttgcaaagaagatccgcttcactgagccgtatctcgaaga
ggataatacaacaacaaagcaaaaacggcacgtagttttaattgtaaccaaggattgcatttcggtcttggttc
aacaacgaaaacttctgaaatgccaagaaaaatctggtcatttcaccacagtgatcattgtgtatgtgttct
aaagactcctagcgaagggttttagaaaaaggagcattttctattctattcaagaactcgaagaacattctct
cttcatcctctaaacttccctataaatatgtcctttgctaatacatagatcaaatacagcaggaaaatcaagaaccaa
aagtctcccgaaaagcaacgaacaATGCTCTCATTCCAAGCATGGATCCATGCTGAGCAAGGGCGAGGAGCT
CTTACCGGGGTC

AT1G53540

Promotor in pCR4-TOPO

ATTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCAGAATTAACCCTCACTAAAGGGACTAGTCC
TGCAGGTTTAAACGAATTCGCCCTTagaattcagctgggtgcgttatgggatgataattgtgtccttgatacaa
agttttatagatgttttgattcatttgggggactcaagccaattgttcaatgttcacaaaaaaataaattta
gacgaaatcattaatgggcctcgatattatagcccaagaaaaaacaaaaaacggcaaggcggttactcgccg
acctgatgcattgcacgtcgtctcagccctcaacaccagaaacttcttgaaagcacctgagaagtctggtaac
gtcggttaaaagaaagaaacgaagatccctgatttttcaaggataccatcgatcaaaataattttcaagaaact
cgcagaatgttctatcttactttccatactctctccctataaatatgcgaaggctcgtagctgtgcgaaccaa
caaggagcaaagagttcatagcaaagcaaagttcaaaaacagagcaaacgcaaagagtagcaatcacaagagga
agtgaacgATGCTCTTAATTCCAAGCATCTTCGGAGGATCCTTAAGGGCGAATTCGCGGCCGCTAAATTCAA
TTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTAC

Tctagcgacacaaacccacata tttttttcaaagttgatttataaagttctatgagttgtaaaacattattacc
ttagcaaagagagacctgcggaagaatctggatgtgtacaaatattcaaatttcctatattaccacctcggt
tacaattttattaatggttatgatatatatgtttgtgactcagttgcttggttaagtatgaaccgtcaataatta
aaaagtcatttttagtagaaaaaacaaaaaaatgtataaattgtataaac aagttagcaacccacatatgtttgcag
agttgatttataaaaaaagattggggacagagttaccattagaagtttggtatcgaacaattgttttttttg
tttttgataaaatattgatcgacacaattgtttgacattcatttaatgttcttaacacaaaaccaaattccat
atgactatattttatattaattatgtttgtagttttgttgaaataagttatccaaaaacaaatttcaagaataa
tttgaaagatttttgggtcctttctactttctaggaattgcaaggtcaaggcggttggtcttgtgtcatgatttt
cttcgttttaactatttcaaagaaaaacaaatattgataataaaaaaaccttggttgattatctagaaaaaggg
ctgtagaagaacaagaagcatctctgttttatgtttcccaatgaaccagaactcttagaaacttctaacac
ctctagaaaccaaccttttagcataaaccctaa tccatctttataaaccaag cacttcttgcctttttctt
gcaactcacaaaaaagaagacaagaagacaaaaaattaaagaaatttaccgatttgaaaaca ATG GCTCTAG GT
CGTCTGGCTTTGAGAAACG GATCCATG GTGAGCAAGGGCGAGGAGGCTGTTTCANCCGGGGTGGT

Tabelle 13: Resultate der Promotorligationen der 10 untersuchten Gene (Vektoren: pCR4-TOPO bzw. pDrive)

Promotorfragment	Länge ungeschnitten	Länge geschnitten	Restriktionsstellen	Vektor	Zellen	3'-A Reaktion	T.E.	Datum	Positive Klone	Gescreente Kolonien	Sequenziert Nr.
AT2G29500	799 bp	794 bp	EcoRI BamHI	pCR4-TOPO	TOP10	ja	4.10 ²	04.08.2009	2	6	Nr. 1 (834, 836)
AT1G60730	1002 bp	997 bp	EcoRI BamHI	pCR4-TOPO	TOP10	nein	2,5.10 ²	15.05.2009	0	3	-
AT1G15520	1692 bp	1688 bp	EcoRI BamHI	pCR4-TOPO	TOP10			30.07.2009	5	8	Nr. 6 (862, 863), Nr. 7 (875, 876)
AT1G17180	1407 bp	1402 bp	EcoRI BamHI	pCR4-TOPO	TOP10		1,92.10 ²	31.08.2009	100%	10	Nr. 4 (883, 884)
AT2G15490	1134 bp	1127 bp	SacI SmaI	pCR4-TOPO	TOP10	ja	4,9.10 ²	31.08.2009	90%	10	Nr. 6 (881, 882)
AT5G12020	1281 bp	1276 bp	EcoRI NcoI	pCR4-TOPO	TOP10	ja	5,5.10 ⁴	16.10.2009	100%	8	Nr. 1 (895, 896)
AT5G12020	1285 bp	1278 bp	EcoRI SmaI	pDrive	DH5α	ja		05.11.2009	50%	8	Nr. 5 (420, 924, 925)
AT1G53540	530 bp	525 bp	EcoRI BamHI	pCR4-TOPO	TOP10	ja	94,34	26.08.2009	100%	5	Nr. 1 (879, 880)
AT5G59720	742 bp	736 bp	EcoRI BamHI	pDrive	DH5α	ja	5.10 ³	16.10.2009	50%	8	Nr. 3 (923)
AT5G12030	413 bp	407 bp	EcoRI BamHI	pDrive	DH5α	ja	1,6.10 ⁴	15.10.2009	50%	10	Nr. 2 (905)

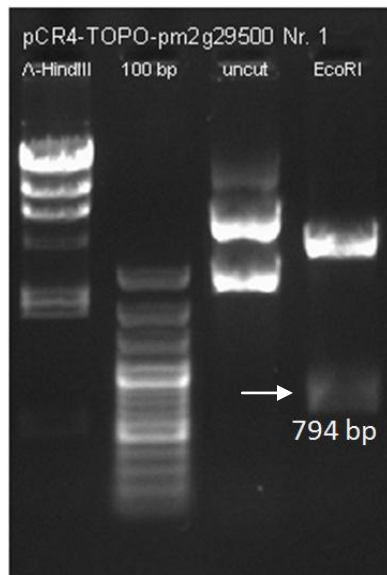


Abb. 19. Mit EcoRI verdauter Vektor pCR4-TOPO-pm2g29500. Das erwartete 794 bp-Fragment ist auf dem Bild schwach erkennbar (mit freiem Auge aber deutlich sichtbar; Markierung mit Pfeil)

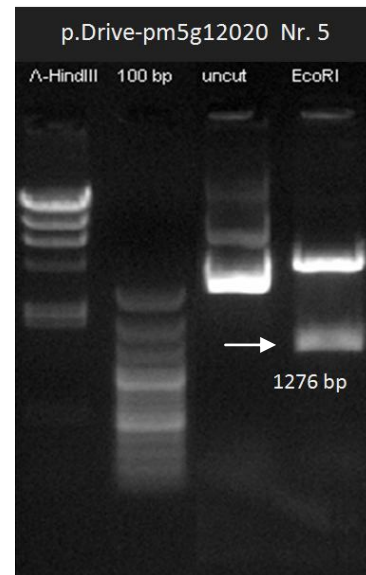


Abb. 20. Mit EcoRI/SalI verdauter Vektor pDrive-pm5g12020. Das mit einem Pfeil markierte 1276 bp-Fragment ist deutlich erkennbar.

Tabelle 14: Resultate der Promotorligationen der 10 untersuchten Gene (in Vektor: pPZP211MCSpUC-GFP2)

Promotorfragment	Länge ungeschnitten	Länge geschnitten	Restriktionsstellen	Vektor	Zellen	T.E.	Datum	Positive Klone	Klone ges.	Kryostocks	Sequenziert Nr.
AT2G29500	799 bp	794 bp	EcoRI BamHI	pPZP211MCSpUC-GFP2	DH5 α	1,54.10 ⁵	07.07.2009	1	12	ja	Nr. 10 (842)
AT1G15520	1692 bp	1688 bp	EcoRI BamHI	pPZP211MCSpUC-GFP2	DH5 α	1,03.10 ³	12.09.2009	9	9	ja	Nr. 1 (878)
AT1G17180	1407 bp	1402 bp	EcoRI BamHI	pPZP211MCSpUC-GFP2	DH5 α	3,8.10 ²	15.09.2009	6	8	ja	Nr. 6 (888)
AT2G15490	1134 bp	1127 bp	SacI SmaI	pPZP211MCSpUC-GFP2	DH5 α	6,63.10 ²	06.10.2009	1	9	ja	Nr. 2 (902)
AT5G12020	1285 bp	1278 bp	EcoRI SmaI	pPZP211MCSpUC-GFP2	DH5 α	4,3.10 ³	13.11.2009	1-2	10	ja	Nr. 25 (934)
AT1G53540	530 bp	525 bp	EcoRI BamHI	pPZP211MCSpUC-GFP2	DH5 α	1,2.10 ⁵	12.09.2009	9	9	ja	Nr. 8 (885)
AT5G59720	742 bp	736 bp	EcoRI BamHI	pPZP211MCSpUC-GFP2	DH5 α	7,83.10 ³	05.11.2009	8	9	ja	Nr. 3 (923)
AT5G12030	413 bp	407 bp	EcoRI BamHI	pPZP211MCSpUC-GFP2	DH5 α	4.10 ⁵	23.10.2009	7-9	9	ja	Nr. 5 (914)
AT1G52560	908 bp	902 bp	EcoRI BamHI	pPZP211MCSpUC-GFP2	DH5 α	3,6.10 ²	17.11.2009	2	4	ja	Nr. 4 (926)
AT1G52560	908 bp	902 bp	EcoRI BamHI	pPZP211MCSpUC-GFP2	DH5 α	1.10 ³	19.11.2009	13	16	ja	-

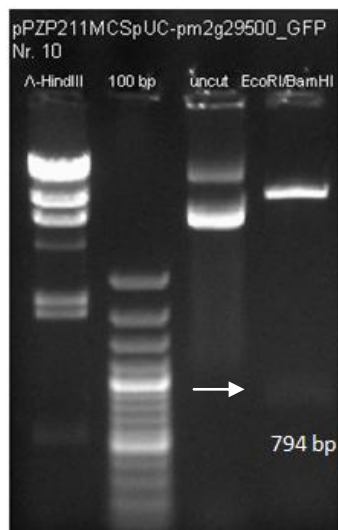


Abbildung 20: Mit EcoRI/BamHI verdauter Vektor pPZP211MCSpUC-pm2g29500-GFP.

Das erwartete 794 bp-Fragment ist auf dem Bild schwach erkennbar (mit freiem Auge aber deutlich sichtbar; Markierung mit Pfeil)

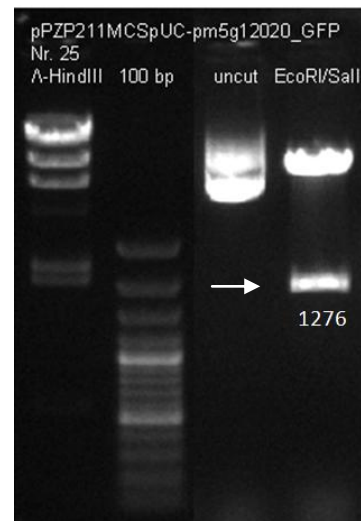


Abbildung 21: Mit EcoRI/Sall verdauter Vektor pPZP211MCSpUC-pm5g12020-GFP

Das erwartete 1276 bp-Fragment ist auf dem Bild deutlich erkennbar (siehe Markierung mit Pfeil).

4.9 Hergestellte Promotorkonstrukte

Die Sequenzen der fertigen Plasmide wurden mit dem Online-Tool Plasmapper 2.0 graphisch dargestellt (Abb. 22-37). Die Sequenzen wurden mit dem Programm ‚EditSeq‘ aus der DNASTar Software Suite (DNASTAR, WI, USA), die zur Bearbeitung und Veranschaulichung von Gensequenzen dient, verknüpft. Dafür wurden die sequenzierten Genbereiche (Promotor und Schnittstellen der Restriktionsenzyme) mit ‚SeqMan‘ ausgewertet und *in silico* entsprechend des Klonierungsvorganges in die Sequenz des jeweiligen Plasmides eingefügt. Die komplette Sequenz des Vektors wurde nun in die Online-Maske von Plasmapper 2.0 eingefügt, die wichtigen Restriktionsschnittstellen eingegeben und der klonierte Promotorbereich vom Forward-Primer bis zum Reverse-Primer der PCR-Reaktion eingezeichnet.

Kommentar zur Farbzweisung in den Vektoren: Die Promotorbereiche (grün) befinden sich in der MCS der jeweiligen Vektoren, gefolgt von dem Reportergen GFP (violett) in den pPZP Vektoren. Selektionsmarker (orange) sind im Fall von pCR4-TOPO und pDrive das Ampicillin-Resistenzgen (TEM1- β -Lactamase) und das Kanamycin-Resistenzgen (Neomycin Phosphotransferase II, NPT II) und im Fall von pPZP die Markergene für Kanamycin- und für Spectinomycinresistenz (Spectinomycin Adenyltransferase). Alle offenen Leserahmen (ORFs) sind in rosa dargestellt, endogene Promotoren sind als grüne Blockpfeile eingezeichnet. Der Replikationsursprung (ori), in beiden Fällen pBR322, ist in schwarz gehalten.

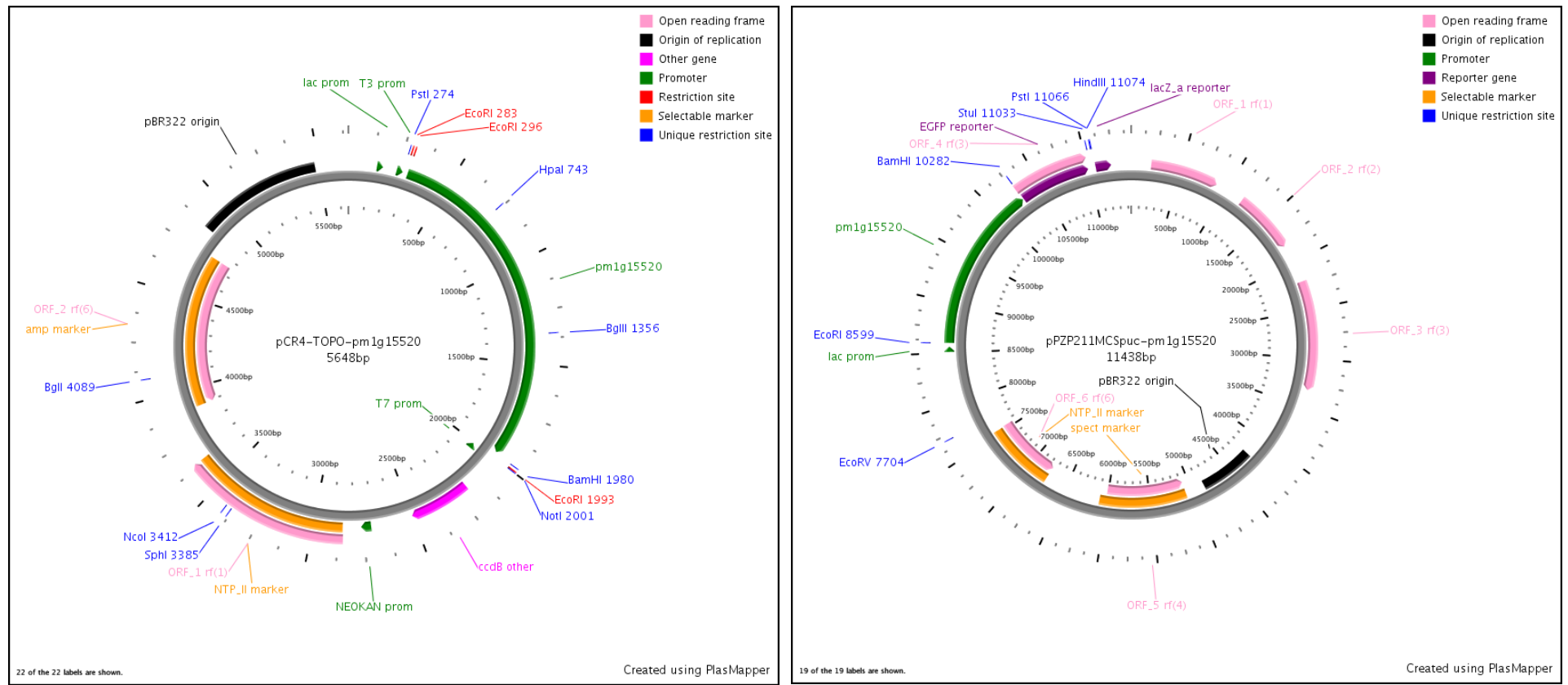


Abbildung 22/23: Promotor pm1g15520 in pCR4-TOPO und pPZP-GFP

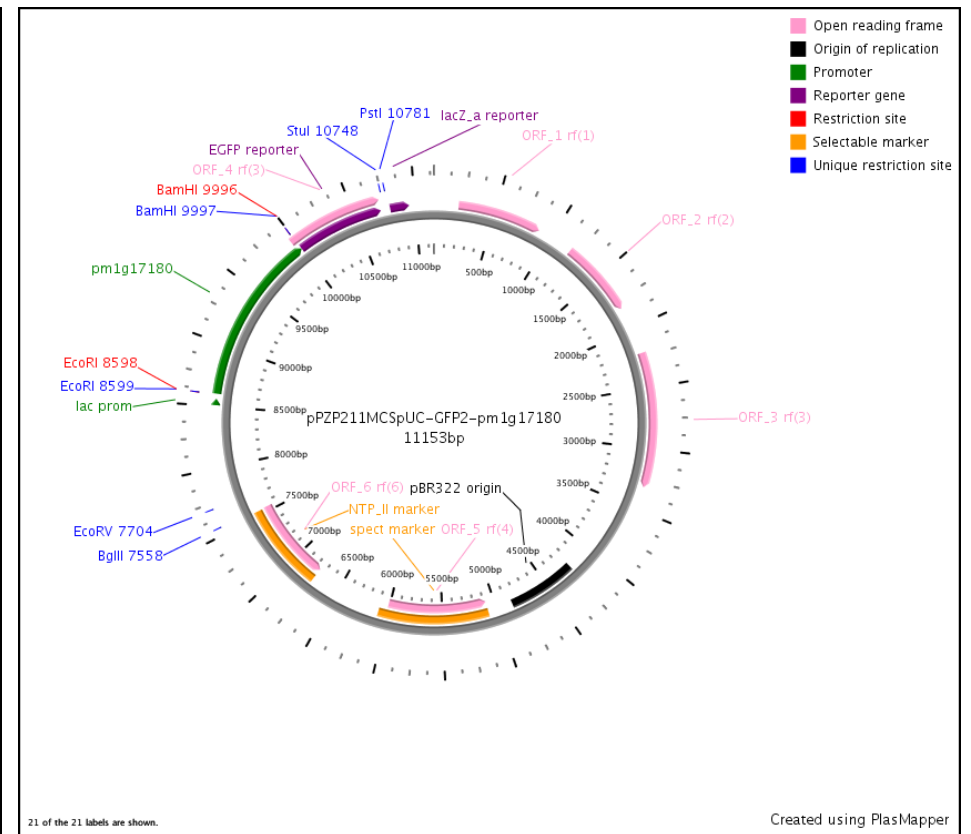
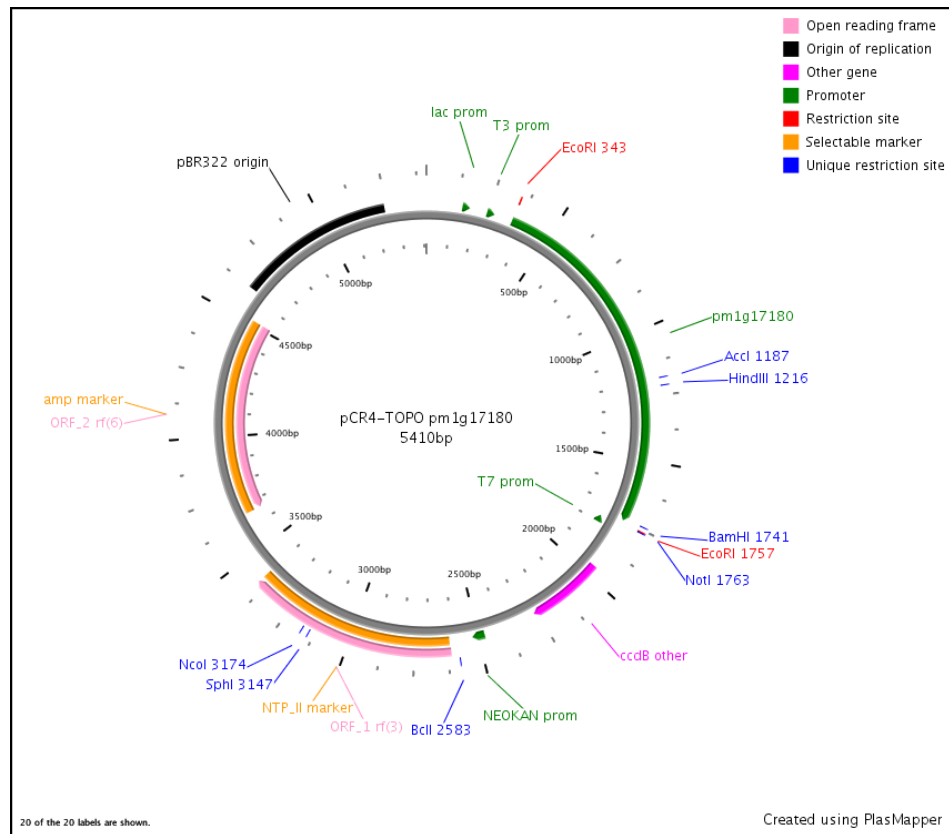


Abbildung 24/25: Promotor pm1g17180 in pCR4-TOPO und pPZP-GFP

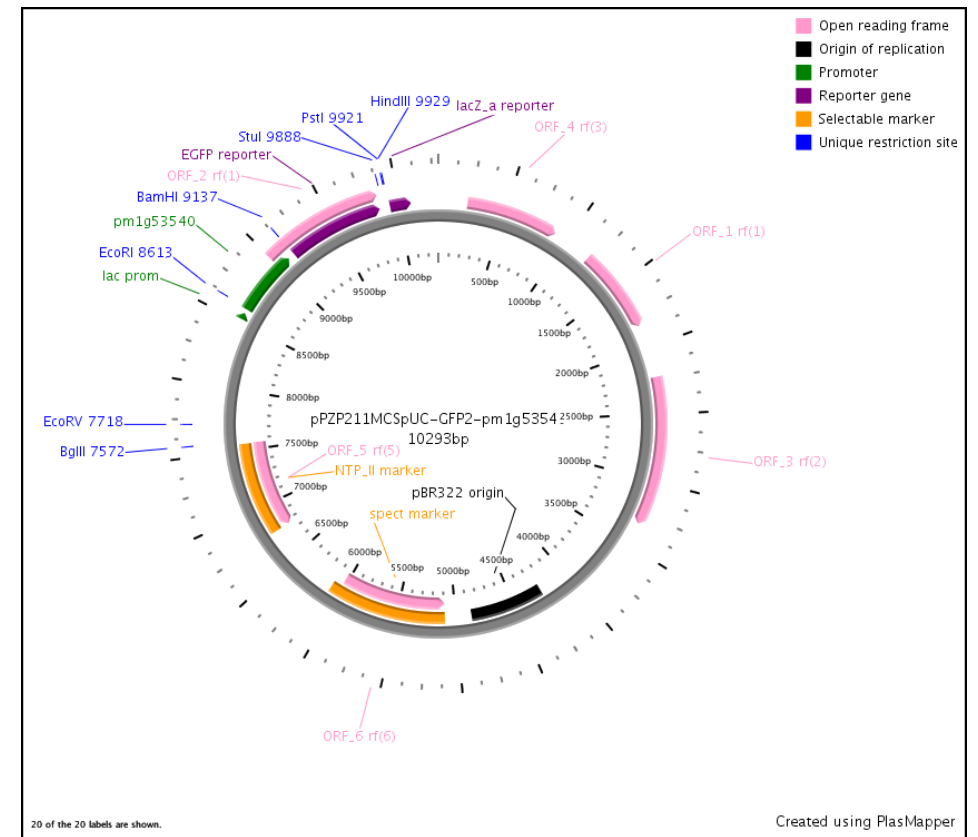
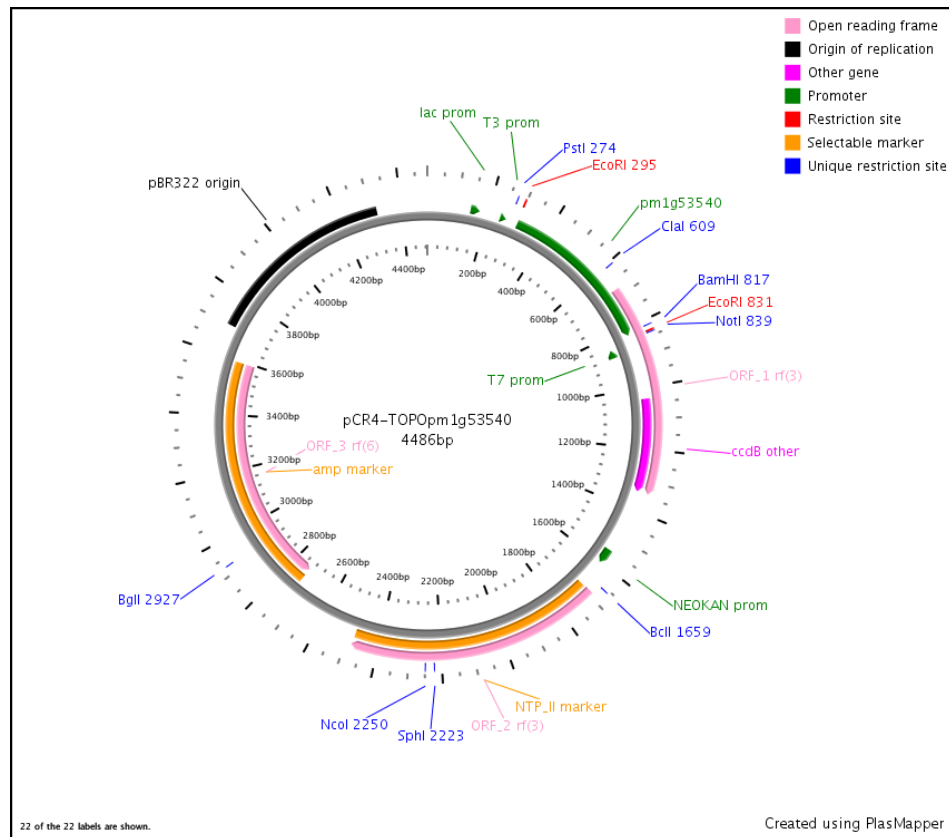


Abbildung 26/27: Promotor pm1g53540 in pCR4-TOPO und pPZP-GFP

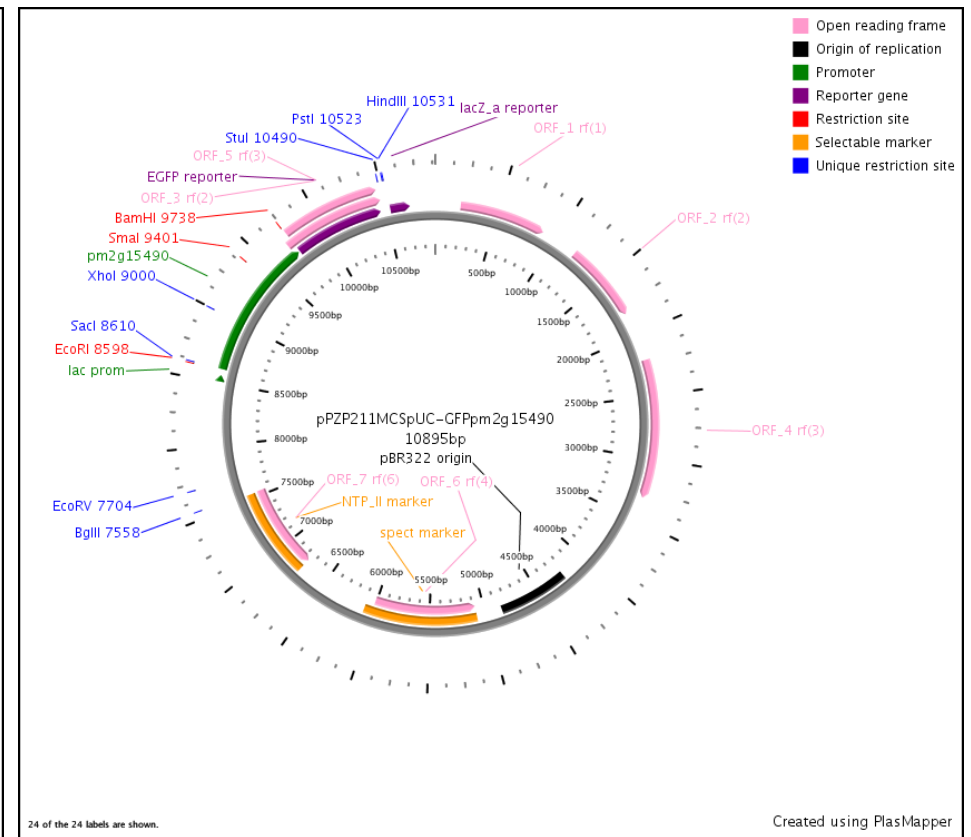
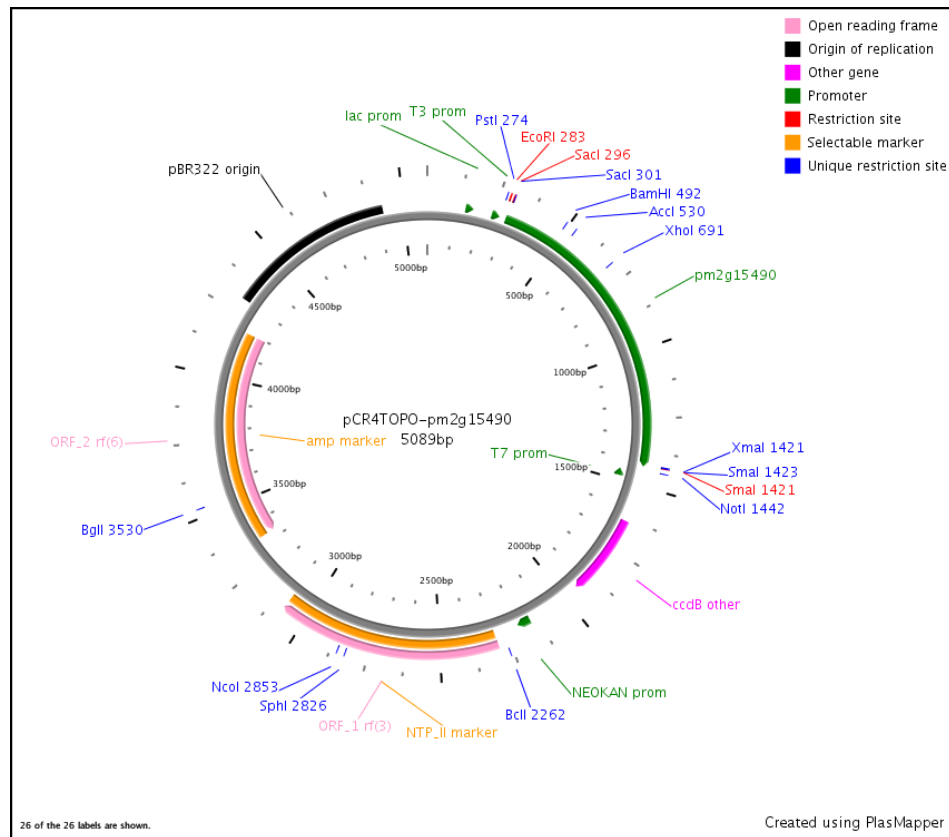


Abbildung 28/29: Promotor pm2g15490 in pCR4-TOPO und pPZP-GFP

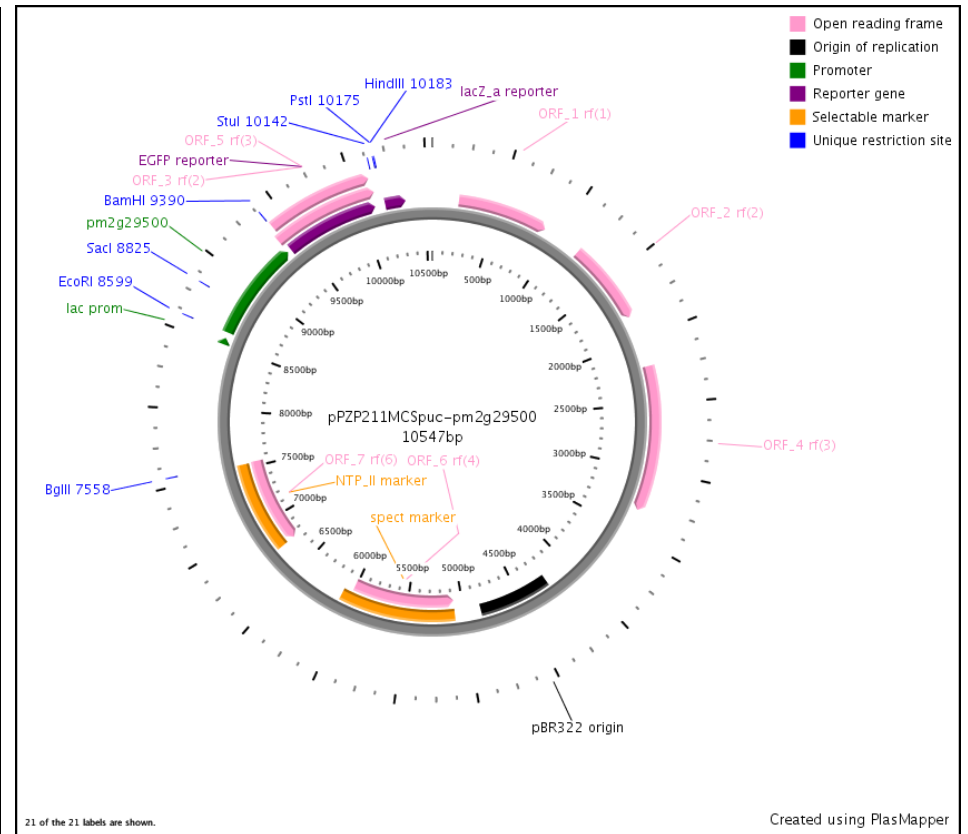
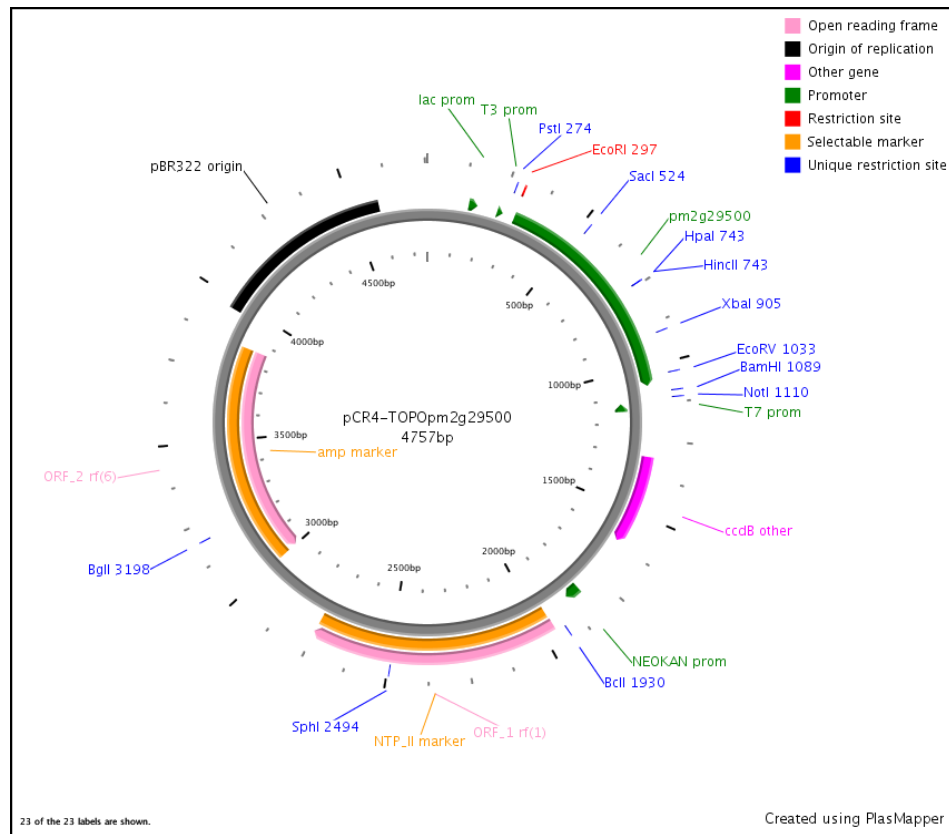


Abbildung 30/31: Promotor pm2g29500 in pCR4-TOPO und pPZP-GFP

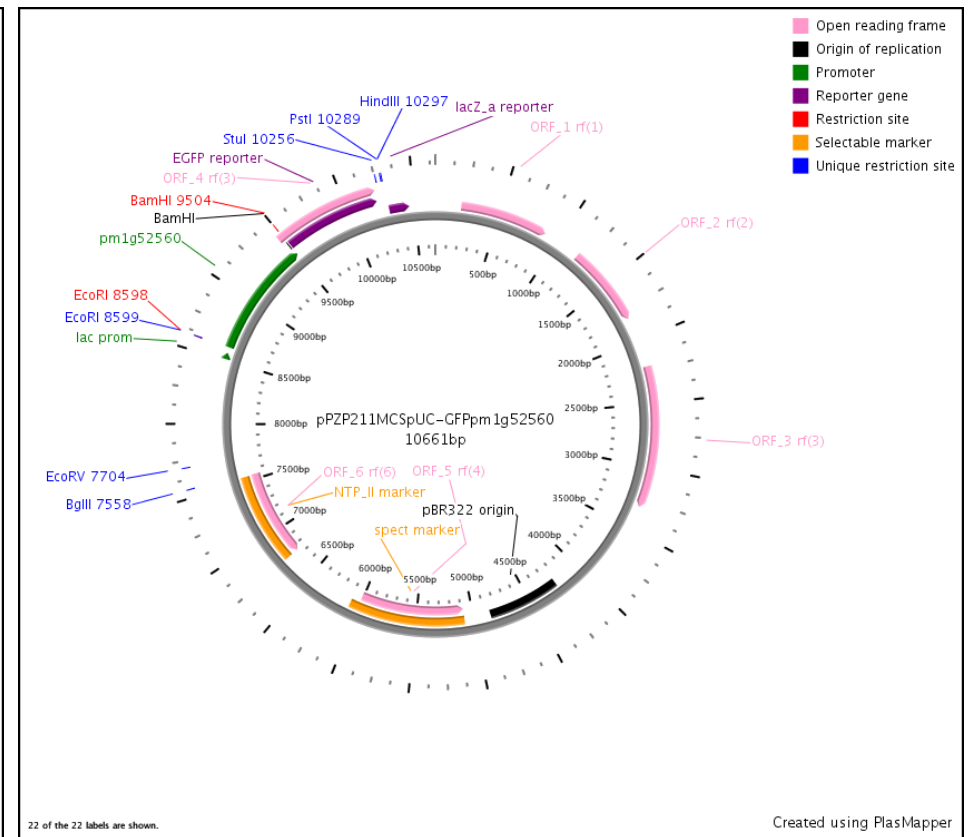
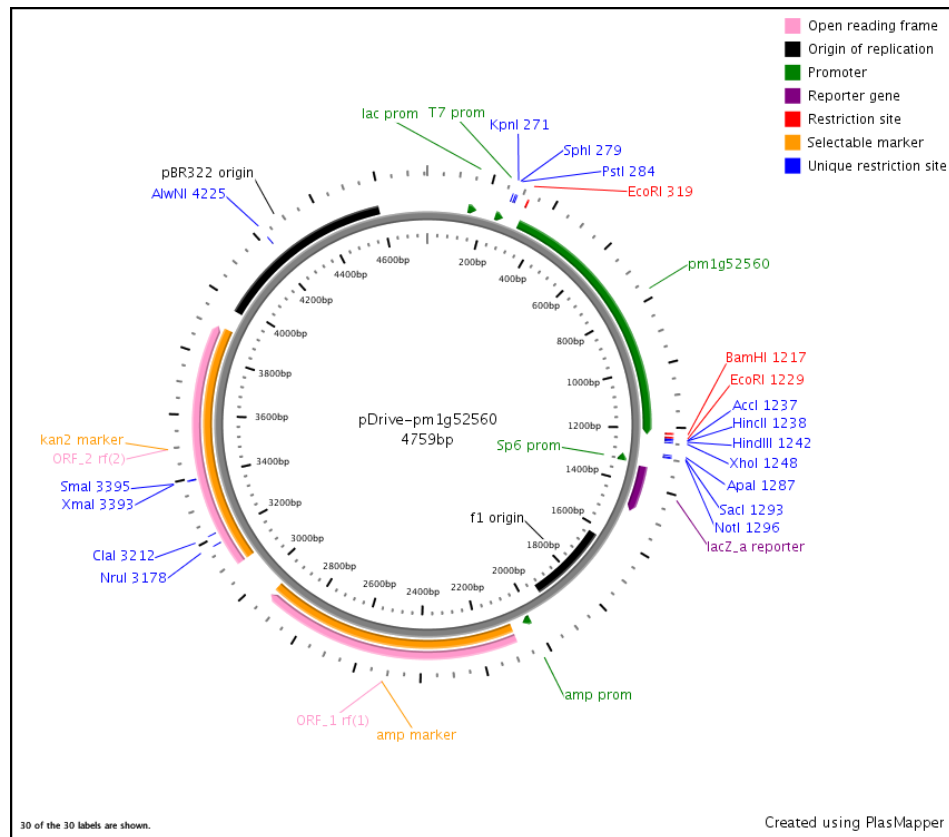


Abbildung 32/33: Promotor pm1g52560 in pDrive und pPZP-GFP

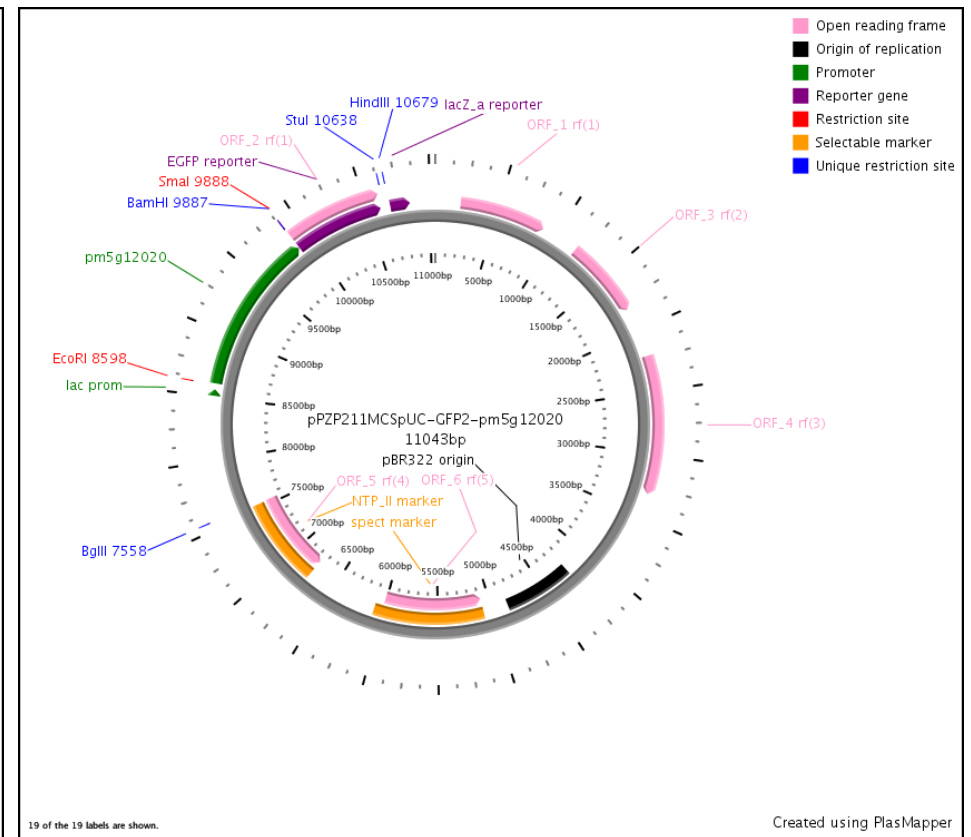
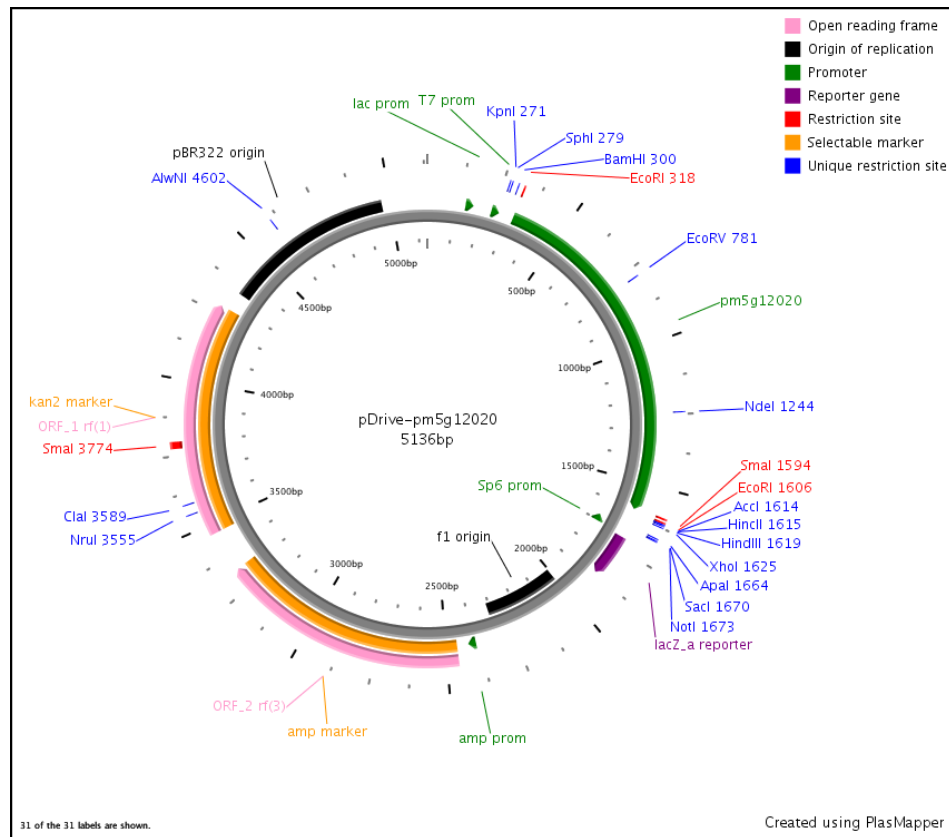


Abbildung 34/35: Promotor pm5g12020 in pDrive und pPZP-GFP

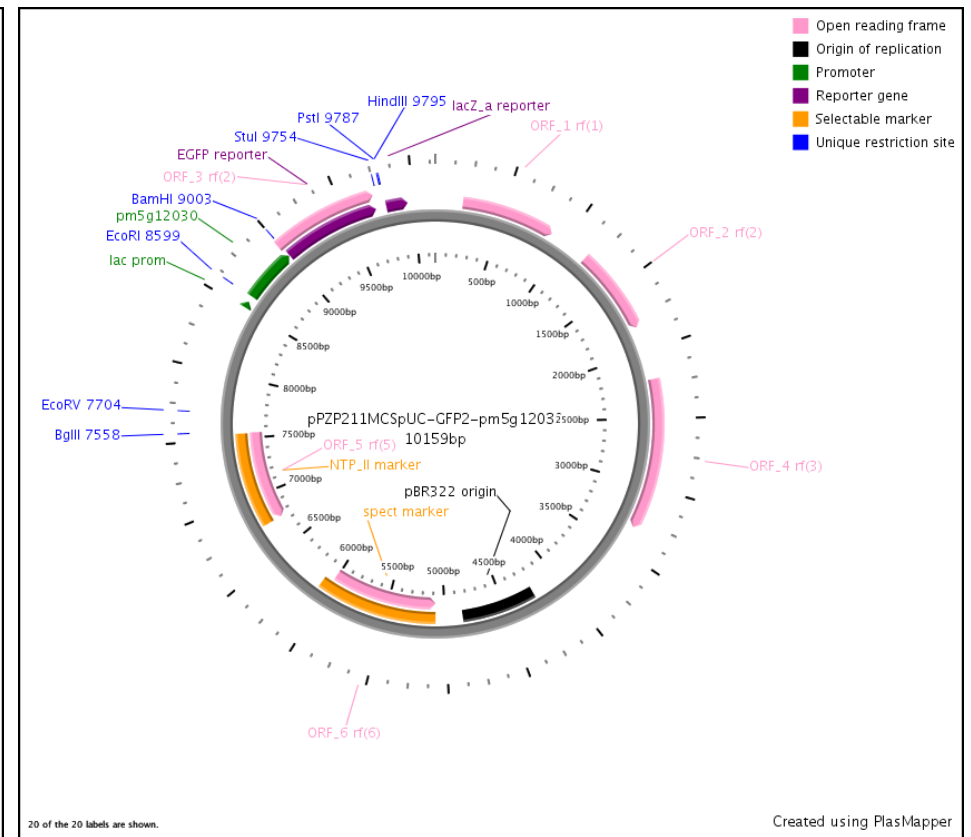
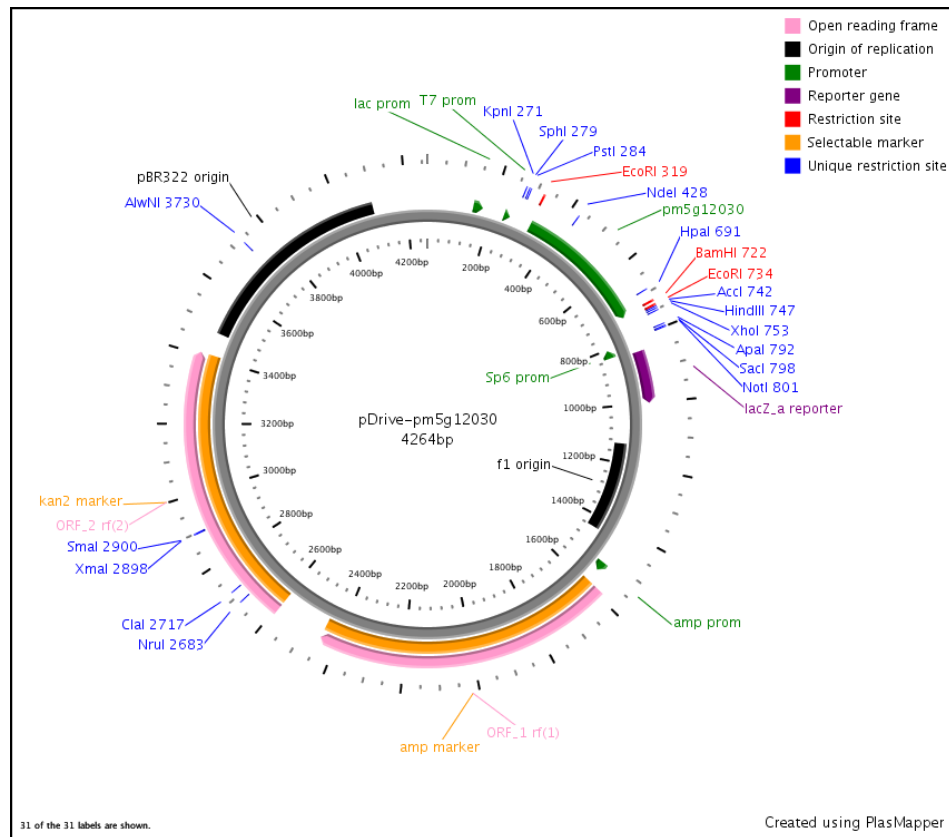


Abbildung 36/37: Promotor pm5g12030 in pDrive und pPZP-GFP

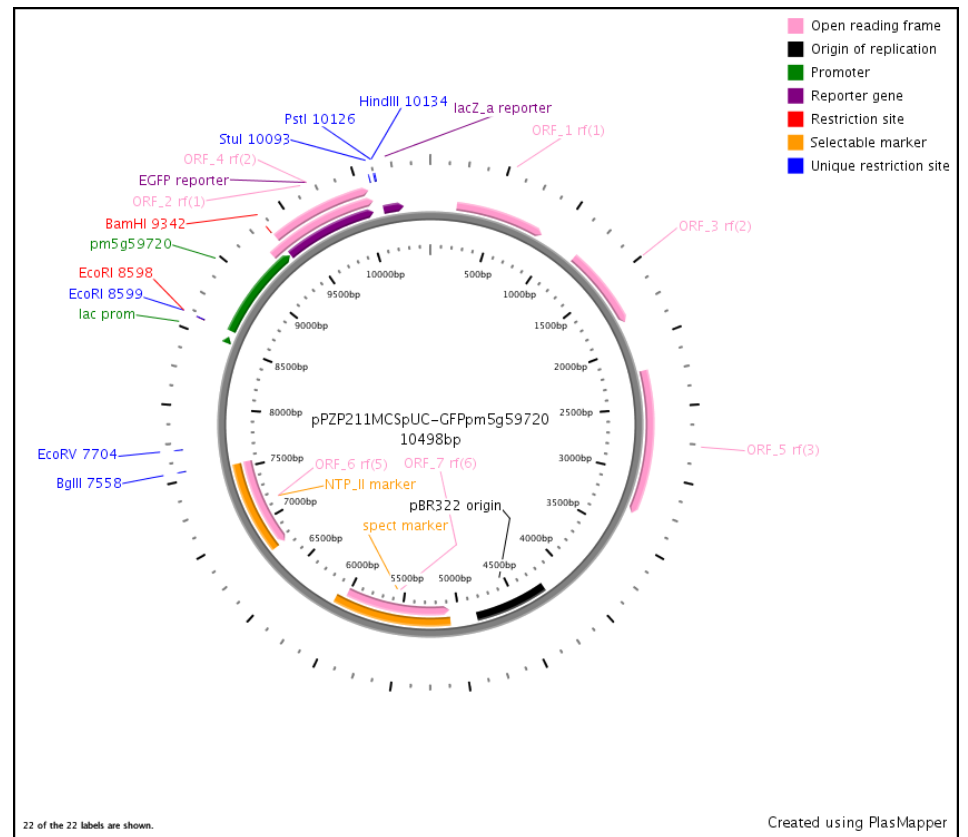
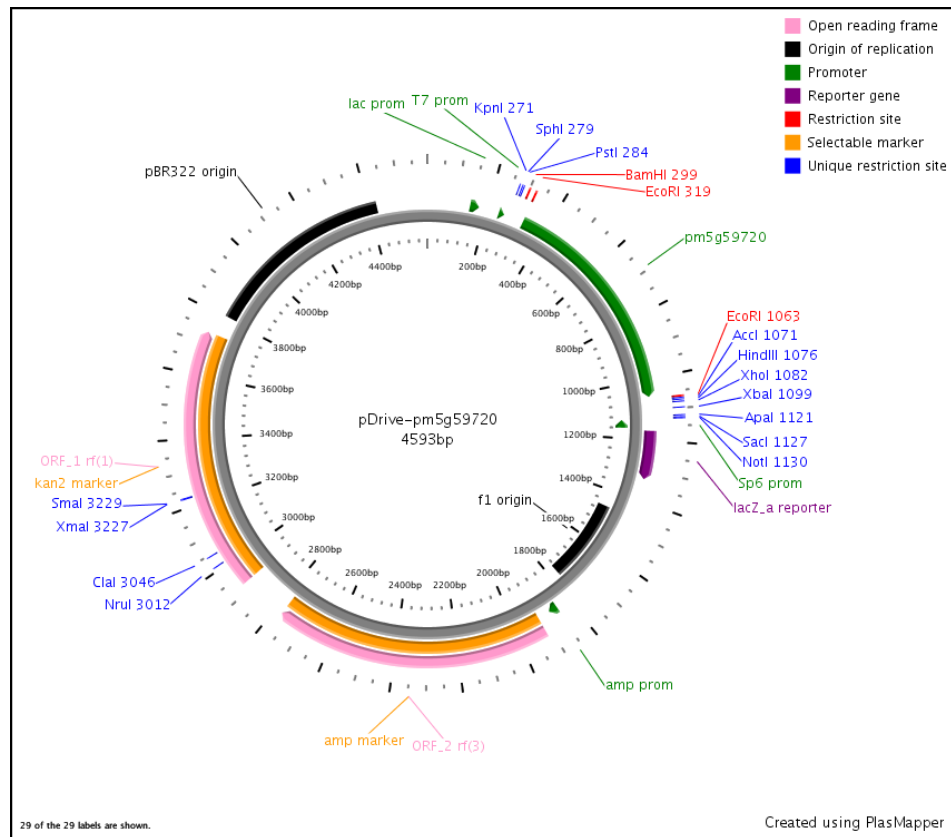


Abbildung 38/39: Promotor pm5g59720 in pDrive und pPZP-GFP

4.10 Agrotransformation

Die *Agrobacterium*-medierte Transformation wurde auf Selektionsplatten mit getrockneten Samen von T0 Pflanzen getestet. In den meisten Fällen wurde eine Transformationseffizienz von 3-4% beobachtet - in zwei Fällen allerdings gab es eine deutlich reduzierte Effizienz durch zu frühes Trocknen der T0 Pflanzen (pm1g15520 und pm1g53540). In einigen Fällen wurden auch überdurchschnittlich hohe Effizienzen (pm1g52560, pm5g12030 und pm5g59720) erreicht. Von den resistenten Pflanzen (T1 Generation) wurden immer 20-25 Pflanzen in die Erde umgesetzt um eine ausreichend große Menge an Folgegenerationen auf Insertanzahl (T2 auf MS 4,5 mit 100 µg/ml Kanamyzin) und für homozygote Linien (T3 auf MS 4,5 mit 100 µg/ml Kanamyzin) screenen zu können. Eine Übersicht über die Anzahl der ursprünglich ausgesäten Samen, der resistenten Pflanzen, der umgesetzten und letztendlich überlebenden Pflanzen, sowie die erzielte Transformationseffizienz ist in Tabelle 12 einsehbar. Mit pm5g59720-GFP transformierte Pflanzen sind in Abb. 38, pm1g53540-GFP/pm2g29500-GFP beinhaltende Pflänzchen sind in Abb. 39 ersichtlich.

Tabelle 15: Statistik der Transformationseffizienz durch *Agrobacterium*

Konstrukt	Ausplattier te Samen	Resistente Pflanze T ₁	Trans- formations- effizienz	Umgesetzte Pflanzen T ₁	Überlebende Pflanzen T ₂
pPZP-pm5g12030-GFP	2000	129	2,50%	20	20
pPZP-pm5g59720-GFP	2000	141	3,30%	20	20
pPZP-pm1g17180-GFP	1000	46	1,90%	36	35
pPZP-pm2g29500-GFP	2000	60	3,40%	25	21
pPZP-pm2g15490-GFP	1000	25	3,80%	26	25
pPZP-pm1g53540-GFP	1000	30	3,30%	25	19
pPZP-pm1g15520-GFP	1000	28	3,50%	20	17
pPZP-pm5g12020-GFP	2000	35	5,80%	25	23
pPZP-pm1g52560-GFP	1300	102	5,40%	25	22



Abbildung 40: T1-Generation *Agrobacterium* transformierter colwt:pm5g59720-GFP Pflanzen

Um auf das Vorhandensein des Reporterkonstruktes zu screenen, wurden Pflänzchen in Selektionsmedium (MS 4,5 mit 100 µg/ml Kanamycin) kultiviert. Pflanzen mit der von pPZP vermittelten Kanamycinresistenz zeigten normales Wachstum der Cotyledonen, Primärblätter und normale Wurzellängen. Sensitiven Pflanzen fehlt die Fähigkeit zur Chlorophyll-Bildung. Sie wachsen deshalb nicht über das Dicotyledon-Stadium hinaus.



Abbildung 41: T1 Generation resistenter colwt:pm1g53540-GFP/colwt:pm2g29500-GFP Pflanzen

Die Pflänzchen wurden nach ca. 10-14 Tagen auf Erde gesetzt, z.T. auch noch früher (schon ab sieben Tagen nach der Keimung bei stärkerem Pilz- oder Agrobakterienbefall der Medienplatten), und bei kontinuierlicher Beleuchtung und 20-22°C für 2-3 Monate bis zur Samenreife kultiviert. Linkes Bild: colwt:pm2g29500-GFP; mittleres Bild: colwt:pm1g53540-GFP, rechtes Bild: colwt:pm1g53540-GFP auf MS-Medium.

4.11 Induktionsversuch mit Einzelblättern von colwt:pm2g29500-GFP

In den abgeschnittenen Blättern war keine bzw. eine schwach sichtbare Induktion durch 10 bzw. 50 µM ZON detektierbar. Allerdings weiss man, dass die sehr starke Autofluoreszenz des Chlorophylls im Palisadenparenchym der Primärblätter, eine Detektion oftmals erschwert. Dennoch, Ansätze einer GFP-Expression ließen sich in den Blattstengeln,

teilweise an vereinzelt Stellen am Blattrand bzw. an Schadstellen und in manchen Trichomen feststellen (Abb. 40).

Interessanterweise zeigten die ausgetrockneten Blätter des 24-well Versuchs, neben stark erhöhter Autofluoreszenz, auch in vielen Primärblättern der verschiedenen T1 Pflanzen eine zum Teil recht stark ausgeprägte Grünfluoreszenz, die vor allem auch deutlich stärker als in der DMSO-Mockkontrolle ausfiel. Daraus lässt sich schließen, dass

- dieses Promotor-GFP Konstrukt zur Translation eines funktionsfähigen GFPs befähigt ist,
- die meisten Linien ein solches Konstrukt besitzen,
- Induktion durch ZON (möglicherweise auch in Kombination mit dem Trockenstress) in den ausgetrockneten 24-well-Platten deutlich vorhanden ist und
- kein deutlicher Zeitverlauf der GFP Induktion feststellbar war.

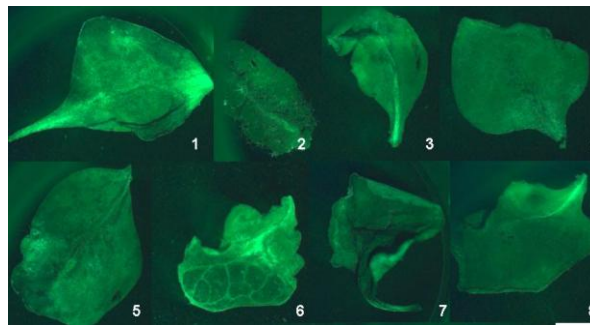


Abbildung 42: ZON-Induktionsversuch in Blättern der T1-Generation des 1. Reporterkonstrukt

In Abbildung 24 sind die mit 50 μM ZON behandelten Blätter zu sehen, die erst nach dem Verdunsten des Mediums und dem Austrocknen der Blätter deutliche Mengen GFP akkumuliert haben und dieses offensichtlich auch nicht vollständig degradiert haben. Sehr stark ist die Expression bei Nr. 1 und 6, hier auch besonders in der Vaskulatur. Deutlich Expression in den Blattstielen von Nr. 3 und 8 gezeigt.

4.12 ZON-Induktionsversuch mit colwt:pm2g29500-GFP Pflanzen (T2)

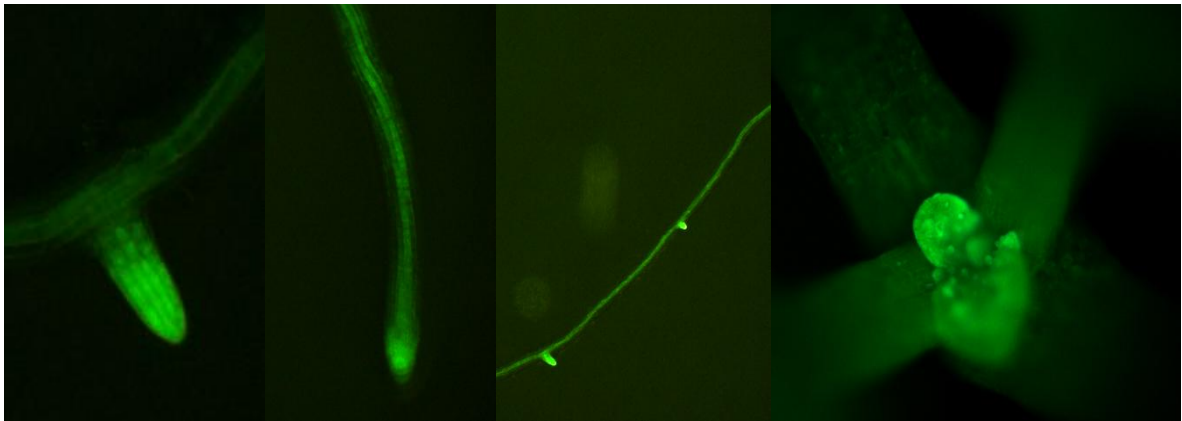
Nach der Samenernte der T2-Samen wurde unverzüglich mit den ZON-Induktionsversuchen begonnen. Dafür wurden Pflanzen, die für die Kopienzahlbestimmung auf MS 4,5 mit 100 µg/ml Kanamycin kultiviert wurden, verwendet. Da die resistenten T2-Pflanzen (3/4 der Pflanzen auf Selektivmedium bei Insertion einer T-DNA, 15/16 bei zwei Kopien, Abweichungen können durch Gen-Silencing oder den Einbauort der T-DNA erklärt werden) sowohl hetero- als auch homozygot für die T-DNA sein können, ist eine unterschiedlich starke Ausprägung eines GFP-Signals in den untersuchten T2-Pflanzen möglich oder gar zu erwarten.

10-14 Tage alte Pflanzen wurden im ersten Versuch direkt auf der Nährmedienplatte mit ZON bzw. DMSO-Mock behandelt (Messung der Fluoreszenz nach 2-6 h), im zweiten Versuch wurden die Keimlinge in einer Microtiterplatte (24-well) mit 300 µl Leitungswasser und 0-50 µM ZON untersucht. Mit dem UV-Mikroskop konnte jedoch zunächst kein GFP-Signal oder eine mögliche Induktion durch ZON in den 22 getesteten Linien beobachtet werden, unabhängig von der ZON-Konzentration.

Keine GFP-Expression konnte bei Applizierung unterschiedlicher Stressbedingungen (150 mM NaCl bzw. 300 mM Mannitol) beobachtet werden.

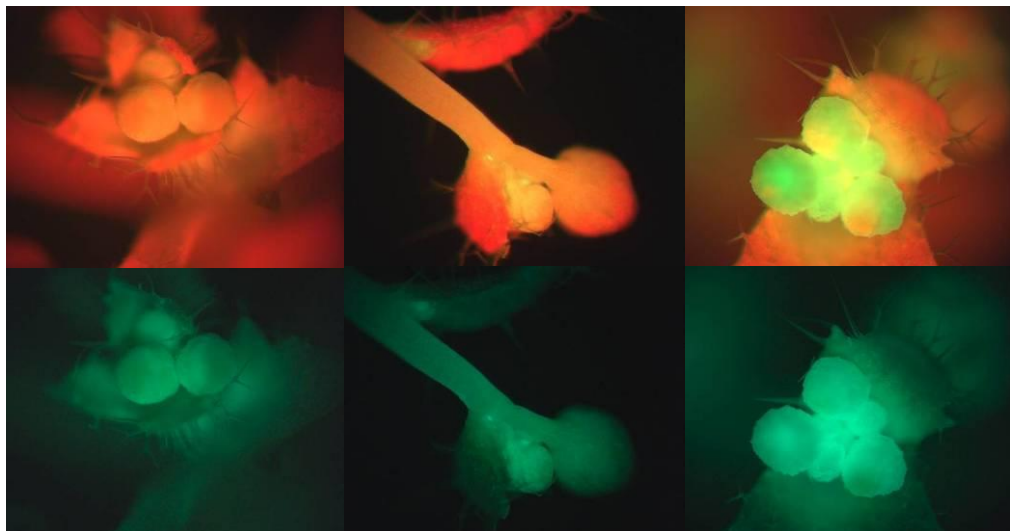
4.13 Hitzestress-Induktionsversuch

Um die Funktionsfähigkeit des Promotor-GFP Konstrukts im Allgemeinen zu testen, wurden die verschiedenen Linien in einem zweiten Experiment mit Hitzestress behandelt. Dafür wurden 7-14 Tage alte Pflanzen von der Selektionsplatte auf eine Transferplatte (MS 4.5) übertragen und mit Deckel geschlossen in einem Hybridisierungssofen für drei Stunden inkubiert. Nach dieser Zeit - im UV-Mikroskop war noch keine GFP-Bildung sichtbar - wurden die Platten in den Rumed gestellt und bei 22°C zwei Stunden weiterinkubiert, um eine Erholung der Pflanzen zu ermöglichen. Nach dieser Zeit wurden die verschiedenen Linien im UV-Mikroskop untersucht. Deutliche GFP-Bildung war in den Wurzelspitzen, den Meristemen der Seitenwurzeln, im Leitbündel und in einigen Linien auch im Hypokotyl und in den Primärblättern der Sprossspitze. Die GFP-Produktion blieb über mehrere Stunden erhalten, ein genauer Zeitverlauf wurde jedoch nicht aufgezeichnet (Abb. 42 und 43).



4.14 **Abbildung 43: GFP-Expression in verschiedenen Pflanzenteilen (colwt:pm2g29500-GFP [T2])**

GFP-Expression ist in verschiedenen Pflanzenteilen, aufgenommen mit einem Leica MZ FLIII Fluoreszenz- Stereomikroskop (Leica, Wetzlar, Germany), unter Verwendung einer UV-Lampe, kombiniert mit einem Erregerfilter im Bereich von 460- 500 nm und einem Sperrfilter bei 510 nm. Starke Induktion wurde vor allem in jungen Seitenwurzeln beobachtet, ebenso wie im Wurzelspitzenmeristem und im Leitbündel der Wurzel.



4.15 **Abbildung 44: GFP-Expression im Vegetationskegel (Apex) der Sprossachse mit Blütenknospen (colwt:pm1g15520-GFP [T2])**

GFP-Expression im Vegetationskegel (Apex) der Sprossachse mit Blütenknospen ist aufgenommen mit einem Leica MZ FLIII Fluoreszenz-Stereomikroskop (Leica, Wetzlar, Germany), unter Verwendung einer UV-Lampe, kombiniert mit einem Erregerfilter im

Bereich von 460-500 nm und einem Sperrfilter bei 510 nm (a) bzw. mit einem Erregerfilter im Bereich von 450-490 nm und einem Sperrfilter von 500-550 nm (GFP plant filter, b). Letzterer filtert die Autofluoreszenz von Chlorophyll a und b in Hypocotylen bzw. grünen Pflanzenteilen aus dem abzubildenden Wellenlängenbereich.

4.16 Segregationsanalyse

Tabelle 16: Segregationsanalyse zur Bestimmung der T-DNA Insertionen und GFP-Induktion in pPZP-pm2g29500-GFP bei verschiedenen Stressbedingungen

ZON oder Mock induzierten in keiner der 22 Pflänzchen die GFP-Expression.

colwt:pPZP-pm2g29500-GFP T2 Generation									GFP-Induktion durch Stress bedienungen		
Nr.	Ökotyp	Konstrukt	Anzahl	resistent	sensitiv	erw. res.	erw. sens.	Kopien	hs	ZON	MOCK
1	Colwt	pPZP-pm2g29500-GFP	73	53	20	54,8	18,3	1	++	-	-
2	Colwt	pPZP-pm2g29500-GFP	40	37	3	37,5	2,5	2	~	-	-
3	Colwt	pPZP-pm2g29500-GFP	74	69	5	69,4	4,6	2	~	-	-
4	Colwt	pPZP-pm2g29500-GFP	40	38	2	37,5	2,5	2	~	-	-
5	Colwt	pPZP-pm2g29500-GFP	71	66	5	66,6	4,4	2	+	-	-
6	Colwt	pPZP-pm2g29500-GFP	42	36	6	39,4	2,6	1 o. 2	~	-	-
7	Colwt	pPZP-pm2g29500-GFP	75	61	14	56,3	18,8	1	~	-	-
8	Colwt	pPZP-pm2g29500-GFP	68	59	9	51,0	17,0	1 o. 2	+	-	-
9	Colwt	pPZP-pm2g29500-GFP	16	15	1	12,0	4,0	2	~	-	-
10	Colwt	pPZP-pm2g29500-GFP	72	47	25	54,0	18,0	1*	++	-	-
11	colwt	pPZP-pm2g29500-GFP	72	55	17	54,0	18,0	1	++	-	-
12	colwt	pPZP-pm2g29500-GFP	40	29	11	30,0	10,0	1	~	-	-
13	colwt	pPZP-pm2g29500-GFP	40	29	11	30,0	10,0	1	~	-	-
14	colwt	pPZP-pm2g29500-GFP	40	28	12	30,0	10,0	1	++	-	-
15	colwt	pPZP-pm2g29500-GFP	40	34	6	30,0	10,0	1 o. 2	~	-	-
16	colwt	pPZP-pm2g29500-GFP	40	33	7	30,0	10,0	1	~	-	-
17	colwt	pPZP-pm2g29500-GFP	72	57	15	54,0	18,0	1	++	-	-
18	colwt	pPZP-pm2g29500-GFP	72	59	13	54,0	18,0	1	+++	-	-
19	colwt	pPZP-pm2g29500-GFP	40	38	2	37,5	2,5	2	~	-	-
20	colwt	pPZP-pm2g29500-GFP	72	53	19	54,0	18,0	1	++	-	-
21	colwt	pPZP-pm2g29500-GFP	71	68	3	66,6	4,4	2	~	-	-
22	colwt	pPZP-pm2g29500-GFP	75	52	23	56,3	18,8	1*	-	-	-

* möglicherweise Silencing-Effekt

Nr. 9: Sehr lange Wurzeln! Nur 16 Samen geerntet!

Nr. 16: Auch einige Pflanzen mit langen Wurzeln hatten gelbliche Keimblätter

Nr. 22: Nur eine Pflanze getestet, daher kein Wert

4.17 ZON-Induktionsversuch mit colwt:pm1g15520-GFP Pflanzen (T2)

Das zweite Reporterkonstrukt, pm1g15520-GFP in Col-0 Pflanzen, wurde ebenso wie pm2g29500 zuerst auf Selektionsmedium auf die Anzahl der Inserts getestet, und anschließend direkt mit diesen T2-Pflanzen (die noch hetero- oder homozygot sein können) auf ZON-Induktivität und Spezifität getestet. Dazu wurden die Pflanzen nicht nur in Microtiterplatten mit ZON und DMSO-Mock inkubiert, sondern zusätzlich auch auf MS 4,5 Agarplatten mit 150 mM NaCl (Salzstress) bzw. 300 mM D-Mannitol (osmotischer Stress), da Microarray-Daten (Kilian et al., 2007) für beide Bedingungen eine Expressionssteigerung um das bis zu 15- bzw. 55-fache zeigen. Bei Salzstress kommt es diesen Daten zufolge zu einer Maximalexpression in der Wurzel nach sechs Stunden (55-fach), bei osmotischem Stress bereits nach drei Stunden im Spross (15-fach), verglichen mit unbehandelten Pflanzen. Für eine anderen Form des abiotischen Stresses, UV-B, weisen diese Expressionsdaten ebenfalls eine sehr starke Induktion um das 52-fache verglichen mit unbehandelten Pflanzen auf (Maximum nach 3h im Spross, 26-fach nach 6h und nur mehr 4-fach nach 12h). Deshalb wurde auch dieser Stress durch 15-minütige Bestrahlung mit UV-B (UV-Schrank, Perkin Elmer) von 12 tag alten Keimlingen auf einer geöffneten Agarplatte getestet.

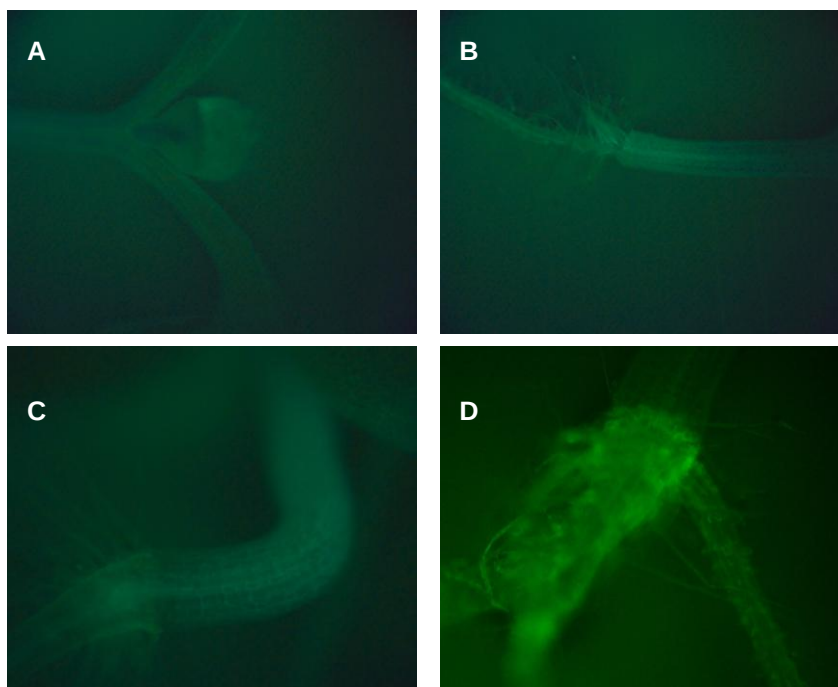


Abbildung 455: Fluoreszenzmikroskopie von colwt:pm1g15520-GFP Nr. 2 (A, B und D) bei ZON-Behandlung (50 μ M) nach 2 h (A, B) bzw. 4 h (D). In (C) ist Nr. 16 abgebildet, ebenfalls nach 4h ZON Behandlung.

Für das Reporterkonstrukt mit dem Promotorbereich des PDR12-Gens ergibt sich ein divergentes Bild bezüglich Induzierbarkeit durch ZON und Vergleich mit den Expressionsdaten. Wie in Abbildung 45 zu sehen ist, ist ein relatives schwaches Fluoreszenzsignal in einigen Linien vorhanden, wobei Autofluoreszenz nicht ausgeschlossen werden kann. Eine mögliche Induktion findet in folgenden Linien statt: 1, 2, 3, 10, 13 und 19, wobei jedoch der Unterschied zur Mock-behandelten Kontrolle eher gering ausfällt (Tabelle 17), was auf eine zu schwache Induktion der GFP-Expression schließen lässt. Linie 16 zeigt ein relativ starkes Signal sowohl bei ZON- als auch bei Mock-Behandlung, welches auch recht stark im Hypocotyl und zum Teil auch im Spross bei ~ 50% der Pflanzen zu sehen ist. Hier dürfte das Konstrukt zu einer hohen konstitutiven GFP-Expression führen, womit zumindest die generelle Funktionsfähigkeit der Promotor-GFP T-DNA indiziert ist.

Tabelle 17: ZON-Induktionsversuch mit colwt:pm1g15520-GFP

Linie	ZON		DMSO		Kopienzahl
	2h	6h	2h	6h	
1	~	+	-	~	1
2	-	+(+)	-	~	1
3	-	+	-	~	1
4	-	-	-	-	1
5					0
8	-	-	-	-	1
9	-	-	-	-	2
10	-	+	-	~	1
12	-	-	-	-	1
13	-	+	-	-	2
15	-	-	-	-	≥2
16	+	+	+	+	2
17	-	-	-	-	1
19		+		~	1
20	-	-	-	-	2

Keine starke Induktion konnte bei den abiotischen Stressbedingungen (Salzstress, osmotischer Stress und UV-B) beobachtet werden. Dies weist darauf hin, dass der ‚Threshold‘ für ein starkes Signal nicht erreicht wird, was auch ein Indiz dafür sein könnte, dass der Promotorbereich die entscheidenden Regulationselemente nicht beinhaltet (z.B. Enhancer, TFBS im kodierenden Bereich oder im 3'-UTR).

5 DISKUSSION

5.1 *Arabidopsis thaliana* als Modell für Kulturpflanzen

Arabidopsis thaliana ist fester Bestandteil der Gruppe der genetischen Modellorganismen als Vertreter der zweikeimblättrigen Pflanzen. *A. thaliana* ist aufgrund einiger Eigenschaften prädestiniert, der molekularbiologischen Forschung dienlich zu sein. Zum einen besitzt sie einen kurzen Lebenszyklus, produziert zahlreiche Nachkommen, braucht sehr wenig Platz und kann leicht im Glashaus kultiviert werden. Zum anderen kann das relativ kleine Genom schneller und leichter als jedes andere pflanzliche Genom genetisch manipuliert werden. Hypothesen werden somit leicht und effizient überprüfbar. Das somit generierte Wissen dient im Weiteren als Basis für Forschungsprojekte, die ökonomisch wichtige Pflanzen einbeziehen und deren Nutzbarkeit verbessern wollen. Obwohl nun Getreidearten bei weitem größere Genome haben als *A. thaliana* – beispielsweise hat Weizen (*Triticum*) mit 2400 Megabasen ein etwa 128 mal so großes Genom – ist es so, dass die enorme Genomgröße der Getreidearten weniger auf eine Vielzahl von neuen, nicht zu *A. thaliana* homologen Genen zurückzuführen ist, vielmehr geht man davon aus, dass aufgrund von Duplikationsereignissen viele Gene mehrfach vorhanden sind. Aus diesem Grund stellt *A. thaliana* einen vernünftigen genetischen Modellorganismus, für die Übertragung von Forschungsergebnissen auf Getreidepflanzen, dar.

5.2 Pflanze-Fusarien-Interaktion

Fusarium gehört zu der Gruppe der nekrotrophen Pilze. Keine Resistenzgene sind bei Pflanzen bisher bekannt. *Fusarien* bilden eine große Palette an Mykotoxinen, neben Zearalenon sind dies die am Besten untersuchte und bedeutende Gruppe der Trichotecene [Deoxynivalenol (DON), Nivalenol (NIV), T-2-Toxin, Diacetoxyscirpenol (DAS) und viele mehr], Fumonisine, Moniliformin oder Fusarinsäure.

Pflanzen besitzen unter anderem die Fähigkeit, sich vor biotischem Stress, wie etwa eindringende Pilze, Bakterien oder Viren, zu schützen. Abwehrmechanismen umfassen etwa Entgiftungs-Enzyme oder Proteine, die den „Feind“ direkt attackieren (Seki et al., 2003). Chitinasen beispielsweise attackieren Pilzzellwände auf direktem Weg (Schenk et al., 2000). Detoxifizierungsenzyme wie z.B. Glutathion-S-Transferasen, Glykosyltransferasen oder ATP-getriebene Pumpen (ABC-Transporter), ermöglichen es der

eukaryotischen Zelle, Zell- oder Organismusschädigende Substanzen zu inaktivieren, umzuwandeln oder aktiv auszuschleusen.

Unlängst konnte gezeigt werden, dass ZON, und in noch stärkerem Ausmaße β -Zearalenol, potente Inhibitoren der HSP90-ATPase Funktion sind. Das Hitzeschockprotein 90 (HSP90) dürfte in der Pathogenresistenz und -abwehr gegenüber einer Vielzahl von Pathogenen eine wichtige Rolle spielen, in dem es für die Funktion verschiedener Gen-für-Gen-Interaktionen essentiell ist, was mithilfe von HSP90 Inhibitoren gezeigt werden konnte (Shirazu 2009).

Im Gegensatz dazu sind die Metabolite, die *Arabidopsis* Pflanzen bei Kultivierung in ZON-hältigem Medium rasch bilden können, nicht mehr inhibitorisch wirksam. Die Bildung von Zearalenon-Konjugaten durch die befallene Pflanze könnte daher als Schutzmechanismus und Detoxifizierungssystem postuliert werden (Torres Acosta et al., 2010).

5.3 Funktionen der ZON-induzierten Gene

Zunächst soll die größte Gruppe an Proteinen, die durch ZON nach zwei Stunden stark überexprimiert werden, und darüber hinaus eine Rückkehr zur basalen Expression nach 24 Stunden zeigen (transiente Induktion), näher beleuchtet werden, denn sechs der zehn ausgewählten ZON induzierbaren Gene sind der Familie der sogenannten kleinen Hitzeschockproteine (small heat shock protein, sHSP), ubiquitär vorkommenden Chaperonen, zugehörig.

sHSPs sind hocheffektive, ATP-unabhängige Chaperone, die denaturierte Proteine davor schützen, zu aggregieren. Ihre Expression wird unter bestimmten abiotischen Stresssituationen hochreguliert. Trockenheit, Salz, osmotischer Stress, Ozon und UV-Strahlung beispielsweise haben einen signifikanten Effekt auf die Expression von sHSPs. Aufgrund von Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz und unterschiedlicher subzellulärer Lokalisierung werden sie in verschiedene Subklassen eingeteilt. In *Arabidopsis* wurden bisher 19 sHSP-Gene entdeckt, wobei 14 von ihnen Homologe zu in anderen Pflanzengattungen gefundenen Hitzeschockproteinen darstellen (Vierling, 2008). Nach U. Werner waren fünf cytosolische und ein plastidiales sHSP, mit Werten zwischen 6,4 – 47,8-fach, hochreguliert (U. Werner, 2006a).

Ihr Aufenthaltsort kann entweder im Cytoplasma, im Endoplasmatischen Reticulum, in Mitochondrien, in Peroxisomen oder in Plastiden sein. Abgesehen von HSP26.5-P,

welches in Plastiden zu finden ist, sind sämtliche hier untersuchten sHSPs (HSP18.2, HSP17.6, HSP17.6A, HSP17.6B und HSP17.6C) im Cytoplasma zugegen.

Bezüglich der Funktion der großen Gruppe der Hitzeschockproteine weiß man, dass sie eine Reihe von Aufgaben bei Reaktion auf Stress, Krankheiten, aber auch in herkömmlichen Wachstums- und Entwicklungsprozessen wahrnehmen. Abgesehen von der nachgewiesenen *in vivo* und *in vitro* Chaperon-Aktivität von Hitzeschockproteinen, weiß man mittlerweile, dass sie thermo-sensitive Substrate davor schützen, bei Hitze zu denaturieren und in Folge auch zu aggregieren. Der Energieträger Adenosintriphosphat (ATP) spielt hierbei eine wichtige Rolle (Vierling et al., 2008).

Kleine Hitzeschockproteine im speziellen binden an den hydrophoben Teil von teilweise denaturierten Proteinen und ermöglichen ihnen, in einem Zustand zu bleiben, der eine Wiederauffaltung zulässt. Im folgenden können ATP-abhängige Hitzeschockproteine mit höherem Molekulargewicht, sogenannte Chaperone, bei der tatsächlichen Wiederauffaltung des jeweiligen, zuvor gebundenen Proteins, aktiv werden (Neta-Sharir et al., 2005, Guo et al., 2007). Denkbar ist es, dass jene HSPs, die in unserer Arbeit Untersuchungsgegenstand waren, eine ähnlich Funktion - in Reaktion auf eine ZON-Exposition – erfüllen. Es ist anzunehmen, dass sie vom Fusarium-Toxin ZON betroffenen Proteinen ein Refolding ermöglicht.

Ein weiteres Gen, das durch ZON stark hochreguliert wird, wird ebenfalls mit einer protektiven Wirkung gegenüber Stresssituationen in Zusammenhang gebracht: GSTU25 weist in einem von Dixon et al. durchgeführten Versuch eine signifikant erhöhte GPOX-Aktivität auf (Dixon et al., 2009). GPOX ist dem Glutathion/Glutathion-Peroxidase System zugehörig, welches essentiell für die Erhaltung der Redoxbalance bei oxidativem Stress ist (Fu et al., 2007). GSTU25 ist der Gruppe der pflanzlichen Glutathion-Transferasen zugehörig. Glutathion-Transferasen haben ebenfalls eine wichtige Funktion im Metabolismus und der Beseitigung von Giften. Sie nehmen diese Funktion dahingehend wahr, dass sie das Tripeptid Glutathion auf ein Co-Substrat übertragen, welches ein elektrophiles Reaktionszentrum hat. Sehr passend scheint also auch die gefundene Hochregulierung von GSTU25 in Reaktion auf ZON. Möglicherweise bindet GSTU25 ZON, um mit ihm ein S-glutathionyliertes Reaktionsprodukt zu bilden. Wie man von anderen Publikation weiß, wird ein derartiges Konjugat rasch vom Zytosol in die Vakuole transportiert, wo es über Transporter der ATP-bindenden Klasse weiter prozessiert wird (Edwards et al., 2000)

Ein weiteres, ebenfalls im Cytosol zu findendes und durch ZON induziertes Protein, soll im Folgenden diskutiert werden. UGT73B4 ist der Klasse der UDP-Glykosyltransferasen (UGTs) zugehörig, die eine nachgewiesene Aktivität in stressbezogenen Ereignissen, im speziellen in der „hypersensitive response“ (HR), einnehmen. Einige UGTs der Gruppe D (eine Klassifizierung der UGTs), haben alle transkriptionellen Eigenschaften von HR-induzierbaren Genen – ähnlich den zuvor beschriebenen Glutathion-S-transferase-Genen (GSTs). Eine sehr ähnliche Situation zu unseren ZON-behandelten Pflanzen wurde in einer Publikation von M. Langlois-Meurinne et al. beschrieben (2005). Hier wurde auch durch einen Pilz – *Botrytis cinerea* – die UGT73B4 Expression stimuliert. Die Autoren besagter Publikation meinen, dass UGT73B4 unter anderem eine Rolle in der zellulären Redox-Homöostase einnehmen könnte. Außerdem werden sie, wiederum passend zu den Ergebnissen unseres Expressionsprofils, mit Prozessen des Zellsterbens und der HR in Zusammenhang gebracht. UGT73B4, eine Uridindiphosphat (UDP)-Glykosyltransferase, ist deswegen für unsere geplanten Reporterlinien so interessant, da sie zum einen nach der ZON Behandlung hoch exprimiert wird, zum anderen aber mit Entgiftungsprozessen in Verbindung gebracht wird. Sogar erst kürzlich in der Umwelt auftretende, anthropogene Substanzen wie 2-Methyl-1,3,5-trinitrobenzol (TNT), können unter anderem mit Hilfe von UGT73B4 eliminiert werden (Gandia-Herrero et al., 2008). Des Weiteren spielt UGT73B4 erwiesenermaßen eine wichtige Rolle in der Resistenz von *Arabidopsis* gegenüber *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC 3000 (Langlois-Meurinne et al., 2005).

Im Vergleich zu den zuvor beschriebenen Genen ist die Lokalisation eines weiteren Proteins, dass durch ZON stark hochreguliert wurde, außergewöhnlich: PDR12 lokalisiert in der Plasmamembran, wo es als Pumpe arbeitet. PDR12 wird zur Familie der ABC-Transporter gezählt. Von ABC-Transportern, von denen es in *A.thaliana* etwa 130 gibt, ist bekannt, dass sie zum Transport einer Reihe von Substanzen, unter anderem toxische, beitragen, obwohl man deren tatsächliche Substrate zumeist noch nicht kennt. Während ABC-Transporter bei Entgiftungsprozessen im allgemeinen eine Rolle spielen, weiß man von PDR12 mittlerweile auch über dessen Involvierung in spezifische Aktivitäten in *A. thaliana*. Zum einen weiß man, dass PDR12 beim Transport von schwachen organischen Säuren beteiligt ist (Piper et al., 1998). Zum anderen deuten experimentelle Daten darauf hin, dass PDR12 bei der Blei- (Lee et al., 2005) und Sclareol- (van den Brûle, 2002; Campbell et al., 2003) Entgiftung einen wesentlichen Beitrag leistet. Da PDR12,

zumindest für die Entgiftung zweier Substanzen – Blei und Sclareol, eine maßgebliche Rolle spielt, ist es denkbar, dass dieses Protein – sowie andere ABC-Transporter vieler Organismen, mehrere Substanzen transportieren kann, möglicherweise auch ZON oder eines seiner Metabolite. Von anderen ABC-Transportern wie z.B. ScPDR5 in *Saccharomyces cerevisiae* ist bekannt, dass sie beispielsweise Cycloheximid, Oligomycin, Steroide und antimykotische Gifte exportieren (Kolackowski et al., 1996; Mahe et al., 1996). Auch soll erwähnt werden, dass PDR12 durch mehrere Hormone aktiviert wird, die Mediatoren in biotischen Stresssituationen sind. Des Weiteren wird die Expression von PDR12 durch die Pilze *Alternaria brassicicola* und *Sclerotinia sclerotiorum* und das Bakterium *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 stark induziert (Campbell et al., 2003).

Das letzte Protein, welches durch ZON massiv hochreguliert wurde und nun besprochen werden soll, ist eine Aldo/Ketoreduktase (AT1G60730). Aldo/Ketoreduktasen (AKRs) weisen, ähnlich wie die oben beschriebenen sHSPs, ein ubiquitäres Vorkommen in einer Vielzahl von Lebewesen auf. Bekannt ist ihre Funktion im Stoffwechsel von Steroiden, Zucker und anderen Carbonylverbindungen. Außerdem weiß man von ihrer Rolle im Metabolismus exogener und endogener Gifte - einschließlich jener, die durch Stress stimuliert werden.

In *A. thaliana*, wo man zumindest 21 Gene kennt, die der AKR-Familie von Genen zugehörig sind, ist allerdings noch sehr wenig über deren spezifische Funktionen bekannt. Hinweise auf eine mögliche Rolle von AKRs in der Entgiftung von Substanzen kommen von einer kürzlich erschienenen Studie von Simpson et al. (2009). Die Autoren schlagen vor, obwohl sie nicht die exakte chemische Struktur des Substrats bestimmen konnten, dass die primäre Aufgabe der Gruppe von AKRs, die sie untersuchten, in der Entgiftung von toxischen Aldehyden und Ketonen, die in Stresssituationen produziert werden, zu finden sei. Erneut scheint ein Zusammenhang erkennbar zu unserer Studie, in der die AKR AT1G60730 in Antwort auf die Applikation von ZON hochreguliert wurde.

Auch in der Reaktion des Organismus auf biologischen Stress scheint die Aldo/Ketoreduktase eine Rolle zu spielen. In einer Arbeit von Ditt et al. (2006) wurde AT1G60730 nach der Infektion mit einem onkogenen *Agrobacterium tumefaciens* Stamm um das 1,74-fache induziert. Auch bei Verwundung wird dieses Gen verstärkt exprimiert: ein dosisabhängiger, 3,9-8,9-fach erhöhter Expressionswert im Vergleich zur Normalexpression wurde von Taki et al. (2005) ermittelt. Auch soll noch ergänzt werden,

dass dieselbe Aldo/Ketoreduktase auf abiotischen Stress – konkret auf Applikation von BOA [Benzoxazolin-2(3*H*)-on] – mit einer Erhöhung der Expression reagiert (Baerson et al., 2005).

5.4 Spezifität der ZON induzierbaren Promotoren

Die Strategie zur Etablierung eines *in vivo* ZON induzierbaren Reportersystemes in *Arabidopsis thaliana* bestand darin, putative Promotorregionen von Genen, die durch Zearalenon stark, jedoch transient induziert werden, in entsprechende Reporterplasmide zu klonieren und später in Pflanzen zu transformieren. Eingehende Analyse möglicher Promotorelemente wie TBFS (transcription factor binding sites) mit Hilfe einer web-basierten Datenbank, AthaMAP, oder regulatorischer Elemente mittels der plantpromotordb 2.0 Datenbank, bestärkte die Entscheidung, den Intergenbereich vor dem entsprechenden Gen inklusive 5'-UTR und eventuell auch Teile des codierenden Bereichs nach dem Startcodon, bei einer Maximallänge von 2000 bp, in die Reportervektoren zu klonieren.

Um den Einfluss möglicher anderer Umwelt- und Stressfaktoren auf die Induktion der Genexpression des jeweiligen Genes zu testen, wurde mithilfe eines Datenbanksystems (BAR, Bio-Array Resource), welches die Expressionsdaten vieler verschiedener *Arabidopsis thaliana* Microarrays sammelt, eine Liste mit absoluten Genexpressionswerten bei verschiedenen Bedingungen erstellt (siehe Tabelle 9, S. 52), in der jeweils die stärksten Elicitoren eingezeichnet wurden. Für die meisten Kandidatengene ist die starke und transiente Expression bei ZON-Behandlung im Verlauf von 0 bis 24 Stunden sehr spezifisch. Mittlere bis stark erhöhte Expression der kleinen Hitzeschockproteine findet darüber hinaus auch nach Hitzestress und anderen abiotischen Stressbedingungen statt. Ein Großteil der Kandidatengene wird auch in Samen und im Stoma des Spaltöffnungsapparats bei Behandlung mit 100 μ M Abscisin-Säure stärker exprimiert.

5.5 Ergebnisse der ZON-induzierbaren Markerpflanzen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte, bedingt durch die Generationszeit der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* von rund drei bis vier Monaten, nur vier der insgesamt neun transgenen Pflanzen auf ZON-Induzierbarkeit und Spezifität getestet werden.

Als erstes wurden jene transgenen Pflanzen mit einem sHSP-Promotor-GFP Konstrukt, pm2g29500-GFP, untersucht. Eine Selektion von 23 T1 Pflanzen wurde vorab auf ZON-Induzierbarkeit in Blattexplantaten („detached leaves“) getestet, wobei unter anderem durch Vacuum-infiltration versucht wurde, eine möglichst gute Diffusion des Mykotoxins in die relativ alten Rosetteblätter zu erreichen. Ein erwartetes GFP-Signals in zumindest einigen dieser Pflanzen konnte durch mikroskopische Untersuchungen jedoch nicht festgestellt werden (Vergleich 10-50 μ M ZON und Mock-Kontrolle). Erstaunlicherweise konnte in einer Mikrotiterplatte mit ausgetrockneten Pflanzenexplantaten ein relativ starkes Signal in einigen Blättern gesehen werden (Abbildung 42, Seite 89). Dies trat auch verstärkt in den ZON-induzierten Proben auf. Ein möglicher Grund könnte, abgesehen von erhöhter Autofluoreszenz von nekrotischem oder abgestorbenem Pflanzenmaterial, GFP-Expression aufgrund von Trocken- oder Dehydrierungsstress sein. Dies deutet zumindest auf die Funktionsfähigkeit des GFP-Konstruktes bzw. seine Induzierbarkeit hin.

In weiterem Verlauf wurde die Tochtergeneration T2 dieser Pflanzen im Stadium ganzer Keimlinge (10-14 Tage nach Keimung) getestet. Auf Selektivmedium gewachsene Pflanzen wurden zuerst hinsichtlich ihrer T-DNA Kopienzahl evaluiert (ein, zwei oder mehr Insertionen und eventuell auftretende Silencing-Effekte) und direkt von diesen Medienplatten in Mikrotiterplatten oder Glaspetrischalen mit ZON-Lösung bzw. Mock-Lösung überführt. Bedauerlicherweise konnte auch in diesem Versuchsansatz keine Induktion eines starken GFP-Signals geortet werden, wobei in dieser Generation noch hetero- und homozygote Pflanzen zu erwarten sind.

Um andere Bedingungen, bei denen At2g29500 (sHSP) in Microarraydaten stark induziert wurde, zu testen, wurde ein Hitzestress-Experiment ausgeführt. Nishizawa et al. (2006) etwa konnten die starke Induktion des Hitzeschock-Transkriptionsfaktors *HsfA2* zeitgleich mit verschiedenen kleinen Hitzeschockproteinen in besonderem Ausmaß bei „Highlight“ und Hitzestressbedingungen und bei oxidativem Stress durch H_2O_2 auf transkriptioneller Ebene zeigen. Ebenso kann dieser Effekt im eFP Browser der BAR Homepage gefunden werden. Bei Hitzestressbedingungen (3 h 38°C, 2 h Erholung bei 22°C) konnte nach ein bis zwei Stunden eine deutliche GFP Expression der Wurzeln und im Sproß festgestellt werden (Abb. 43).

Interessanterweise korreliert die Intensität der hitzeinduzierbaren pm2g29500-GFP Expression negativ mit der Anzahl der T-DNA Insertionen des Konstruktes. So weisen überwiegend Pflanzen mit einem Insert ein stärkeres GFP-Signal auf, wohingegen

Pflanzen mit zwei Inserts paradoxerweise deutlich schwächer GFP exprimieren. Dies könnte z.B. durch (transkriptionelles oder posttranskriptionelles) Gen-Silencing herrühren, wobei jedoch bei den getesteten Pflanzen die Segregation kanamycinresistenter Pflanzen auf Selektivmedium nicht beeinflusst wurde, also das Konstrukt insgesamt nicht stillgelegt wurde.

Zusätzlich wurden noch ältere Pflanzen getestet, die bereits Blütenstände entwickelt hatten (Abb. 44). Auch hier konnte eine starke Reaktion auf einen Hitzestress (siehe oben genannte Bedingungen), vor allem in der Sprossspitze inklusive Blütenstände beobachtet werden. GFP konnte auch am nächsten Tag (rund 24 h nach Stressinduktion) noch detektiert werden. Dies würde mit Expressionsdaten von AT2G29500 nach Hitzestress (BAR eFP Browser) übereinstimmen. Darüber hinaus könnte es jedoch auch bedeuten, dass das exprimierte GFP-Protein, auch bei Inaktivität des Promotors, nur langsam degradiert und inaktiviert wird.

Folgende Hypothesen für die nicht erreichte Induzierbarkeit des Konstrukts mit Zearalenon müssen noch überprüft werden:

- 1) Dem regulatorische Bereich, der kloniert wurde, fehlen die für die ZON-Induzierbarkeit notwendigen Domänen. Diese Domänen könnten am Exon oder auch am 3'-Ende des Gens liegen. Interessanterweise genügt der Promoterbereich für die Hitzeinduzierbarkeit. Das beweist, dass das Konstrukt funktional ist und im Prinzip GFP Induktion im Mikroskop gut detektierbar ist. Neue Klonierungen der Promotor-GFP Konstrukte könnten dieses Problem lösen.
- 2) Die ZON Induktion ist zu schwach, als dass sie im Mikroskop detektiert werden könnte. Dieser mögliche Grund ist unwahrscheinlich, da in meiner Spezifitätsanalyse das Gen AT2G29500 in Mikroarray-Experimenten durch ZON 48-mal stärker als durch Hitzeschock induziert wurde. Interessanterweise sind seit meiner 1. Analyse neue Hitzedaten in der BAR-Datenbank erschienen, die zeigen, dass das Gen nach Hitzestressbedingungen (1 h 30°C) ungefähr so stark induziert wird wie durch ZON (ca. 12.000 Absolutwert) und nach 12 h nur noch halb so stark. Diese neuen Daten können mittels qRT-PCR zum Vergleich der Expression des GFP-Konstruktes mit dem endogenen Gen überprüft werden.

Ein divergentes Bild ergibt sich für die GFP-Induktion in colwt:pm1g15520-GFP Pflanzen: Zwar konnte in einigen ZON-behandelten Linien (T2-Generation, siehe Tabelle 17) eine optisch stärkere Expression des GFPs beobachtet werden, allerdings auf niedrigem Niveau und erst nach längerer Inkubationsdauer (4-6 h). Da auch die anderen Stressbedingungen keine eklatanten Unterscheidungen der behandelten und unbehandelten Pflanzen zuließen, ist es durchaus möglich, dass sich entscheidende Regulationselemente der Promotorregion nicht auf dem Konstrukt befinden.

Eine andere Möglichkeit könnte auch sein, dass vier vorhandene Mutationen (-1633, -1393, -1279 und -1100 bp vom ATG des Endogens) gerade auf eine entscheidenden TFBS fallen.

Gerade im Vergleich mit der erreichten GFP-Expression in colwt:pm2g2900-GFP nach Hitzestress-Behandlung, wo ZON-Behandlung sogar ein noch stärkeres Signal liefern sollte (nach den alten Expressionsdaten), ist die bisher gesehene Intensität des GFP-Signals für ein Screening-Verfahren mittels Mikroskop eher ungeeignet, und würde wohl eher automatisierter bildgebender Verfahren bedürfen, die gleich mehrere Einzelpflanzen erfassen und entsprechend lange aufzeichnen könnten, ohne ein zu starkes Hintergrundsignal zu erzeugen.

Trotzdem ist die Untersuchung von PDR12 (AT1G15520) für das Projekt auch in weiterer Folge sehr interessant, da es sich hierbei um einen ABC-typ *Pleiotropic Drug Resistance* Exporter handelt, der vielleicht direkt am Ausschleußen von ZON oder eines seiner Metabolite beteiligt ist, und so ein Kandidat für ein mögliches Resistenzgen sein könnte.

AUSBLICK

Für die ersten Reporterpflanzen mit dem pm2g29500-GFP Konstrukt, welches durch Hitzestress sehr stark induziert wird, ist es in nächster Zeit noch erforderlich, die T3-Generation auf Homo- oder Heterozygotität zu testen (ebenfalls auf Selektionsplatten mit Kanamycin), da dieses Reporter-GFP-Konstrukt in anderen Versuchen verwendet werden könnte. Außerdem wurde beschlossen, neue Klonierungen durchzuführen, indem i.) die komplette 3'-UTR an das GFP im pPZP-pm2g29500-GFP Plasmid fusioniert wird, falls sich ZON regulierbare TFBS hier befinden sollten. Da jedoch auch im kodierenden Bereich des Exons TFBS für verschiedenen Transkriptionsfaktoren mit zum Teil recht starker Wahrscheinlichkeit vorhergesagt wurden (AthaMAP), wird als weiteres Projekt ii.)

die Promotorregion mit zwei neuen Reversen-Primern kloniert werden, die weiter in den kodierenden Bereich des Gens AT2G29500 reichen und diese Elemente miteinbeziehen.

Inzwischen wurden auch noch anderer Reporterkonstrukte *in vivo* getestet, die in einigen Fällen recht erfolgversprechende Ergebnisse lieferten. Diese Konstrukte, pm1g17180-GFP, pm5g59720-GFP und pm5g12030 wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr untersucht, geben aber Hoffnung, bald ein ZON-induzierbares Reporterkonstrukt für die weiteren Untersuchungen und die Durchführung eines Mutagenese-Screening zur Verfügung zu haben.

LITERATURVERZEICHNIS

Abid-Essefi S, Baudrimont I, Hassen W, Ouanes Z, Mobio TA, Anane R, Creppy EE, Bacha H (2003) DNA fragmentation, apoptosis and cell cycle arrest induced by zearalenone in cultured DOK, Vero and Caco-2 cells: prevention by Vitamin E. *Toxicology* 192(2-3): 237-48

Berthiller F, Sulyok M, Krska R, Schuhmacher R. *Int J Food Microbiol.* 2007 Oct 20;119(1-2):33-7. Epub 2007 Jul 31. Chromatographic methods for the simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals.

Boyd PA, Wittliff JL (1978) Mechanism of Fusarium mycotoxin action in mammary gland. *J Toxicol Environ Health* 4(1): 1-8

Bülow L, Engelmann, S., Schindler, M., Hehl R. 2009. AthaMap, integrating transcriptional and post-transcriptional data. *Nucleic Acids Res.* 37: D983-986. PDF (396 KB)

Campbell EJ, Schenk PM, Kazan K, Penninckx IA, Anderson JP, Maclean DJ, Cammue BP, Ebert PR, Manners JM. *Plant Physiol.* 2003 Nov;133(3):1272-84. Epub 2003 Oct 2. Pathogen-responsive expression of a putative ATP-binding cassette transporter gene conferring resistance to the diterpenoid sclareol is regulated by multiple defense signaling pathways in Arabidopsis.

Commission regulation (EC) No 856/2005 of 6 June 2005 amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards Fusarium toxins. *Official Journal of the European Union* **L 143**: 3-8
Martins ML, Martins HM (2002) Influence of water activity, temperature and incubation time on the simultaneous production of deoxynivalenol and zearalnon in corn (*Zea mays*) by *Fusarium graminearum*. *Food Chemistry* 79: 315-318

Dixon DP, Hawkins T, Hussey PJ, Edwards R. J Exp Bot. 2009;60(4):1207-18. Epub 2009 Jan 27. Enzyme activities and subcellular localization of members of the Arabidopsis glutathione transferase superfamily.

Edwards R, Dixon DP, Walbot V: Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. Trends Plant Sci 2000, 5:193-198.

Etienne M, Dourmad JY (1994) Effects of zearalenone or glucosinolates in the diet on reproduction in sows: A review. Livestock Production Science 40: 99-113

Etienne M, Jemmali M (1982) Effects of zearalenone (F2) on estrous activity and reproduction in gilts. J Anim Sci 55(1): 1-10

Fu ZQ, Guo M, Jeong BR, Tian F, Elthon TE, Cerny RL, Staiger D, Alfano JR. Nature. 2007 May 17;447(7142):284-8. Epub 2007 Apr 22. A type III effector ADP-ribosylates RNA-binding proteins and quells plant immunity.

Gandia-Herrero F, Lorenz A, Larson T, Graham IA, Bowles DJ, Rylott EL, Bruce NC. Detoxification of the explosive 2,4,6-trinitrotoluene in Arabidopsis: discovery of bifunctional O- and C-glucosyltransferases. Plant J. 2008 Dec;56(6):963-74.

Green ML, Diekman MA, Malayer JR, Scheidt AB, Long GG (1990) Effect of prepubertal consumption of zearalenone on puberty and subsequent reproduction of gilts. J Anim Sci 68(1): 171-8

Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA, Mordecai D (1979) Zearalenones: characterization of the estrogenic potencies and receptor interactions of a series of fungal beta-resorcylic acid lactones. Endocrinology 105(1): 33-40

Kolaczowski M, van der Rest M, Cybularz-Kolaczowska A, Soumillion JP, Konings WN, Goffeau A (1996) Anticancer drugs, ionophoric peptides, and steroids as substrates of the yeast multidrug transporter Pdr5p. *J Biol Chem* 271: 31543–31548

Knudsen S. Promoter2.0: for the recognition of PolII promoter sequences. *Bioinformatics*. 1999 May;15(5):356-61.

Kuiper-Goodman T, Scott PM, Watanabe H (1987) Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regul Toxicol Pharmacol* 3: 253-306

Langlois-Meurinne M, Gachon CM, Saindrenan P. Pathogen-responsive expression of glycosyltransferase genes UGT73B3 and UGT73B5 is necessary for resistance to *Pseudomonas syringae* pv tomato in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 2005 Dec;139(4):1890-901.

Lee M, Lee K, Lee J, Noh EW, Lee Y. *Plant Physiol*. 2005 Jun;138(2):827-36. Epub 2005 May 27. AtPDR12 contributes to lead resistance in *Arabidopsis*.

Macri F, Vianello A, Braidot E, Petrusa E, Mokhova EN (1996) Zearalenone-induced uncoupling in plant mitochondria is sensitive to 6-Ketocholestanol. *Biochemistry and molecular biology international* 39: 1001-1006

Mahe Y, Lemoine Y, Kuchler K (1996) The ATP binding cassette transporters Pdr5 and Snq2 of *Saccharomyces cerevisiae* can mediate transport of steroids in vivo. *J Biol Chem* 271: 25167–25172

Masood Siddique & Sascha Gernhard & Pascal von Koskull-Döring & Elizabeth Vierling & Klaus-Dieter Scharf *Cell Stress and Chaperones* (2008) 13:183–197 The plant sHSP superfamily: five new members in *Arabidopsis thaliana* with unexpected properties

McLean M (1996) The phytotoxicity of selected mycotoxins on mature, germinating Zea mays embryos. *Mycopathologia* 132: 173-183

Miksicek RJ (1994) Interaction of naturally occurring nonsteroidal estrogens with expressed recombinant human estrogen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 49(2-3): 153-60

Nishizawa A, Yabuta Y, Yoshida E, Maruta T, Yoshimura K, Shigeoka S., Arabidopsis heat shock transcription factor A2 as a key regulator in response to several types of environmental stress. *Plant J.* 2006 Nov;48(4):535-47. Epub 2006 Oct 19.

Nozomi Taki, Yuko Sasaki-Sekimoto, Takeshi Obayashi, Akihiro Kikuta, Koichi Kobayashi, Takayuki Ainai, Kaori Yagi, Nozomu Sakurai, Hideyuki Suzuki, Tatsuru Masuda, Ken-ichiro Takamiya, Daisuke Shibata, Yuichi Kobayashi, and Hiroyuki Ohta* 12-Oxo-Phytodienoic Acid Triggers Expression of a Distinct Set of Genes and Plays a Role in Wound-Induced Gene Expression in Arabidopsis1[w] *Plant Physiology*, November 2005, Vol. 139, pp. 1268–1283

Penninckx IA, Thomma BP, Buchala A, Metraux JP, Broekaert WF (1998) Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in Arabidopsis. *Plant Cell* 10(12): 2103-13

Pfohl-Leszkowicz A, Chekir-Ghedira L, Bacha H (1995) Genotoxicity of zearalenone, an estrogenic mycotoxin: DNA adduct formation in female mouse tissues *Carcinogenesis* 16(10): 2315-20

Renata F. Ditt,¹ Kathleen F. Kerr,² Paul de Figueiredo,³ Jeff Delrow,⁴ Luca Comai,¹ and Eugene W. Nester^{1,3} *MPMI* Vol. 19, No. 6, 2006, pp. 665–681. DOI: 10.1094/MPMI -19-

0665. © 2006 The American Phytopathological Society The *Arabidopsis thaliana* Transcriptome in Response to *Agrobacterium tumefaciens*

Schenk PM, Kazan K, Wilson I, Anderson JP, Richmond T, Somerville SC, Manners JM (2000) Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(21): 11655-60

Scott R. Baerson, Adela Sa´nchez-Moreiras, Nuria Pedrol-Bonjoch, Margot Schulz, Isabelle A. Kagan, Ameeta K. Agarwal, Manuel J. Reigosa, and Stephen O. Duke

Seki M, Kamei A, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2003) Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection. *Curr Opin Biotechnol* 14(2): 194-9

Shier WT, Shier AC, Xie W, Mirocha CJ (2001) Structure-activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins. *Toxicon* 39(9): 1435-8

Shirasu K, 2009: The HSP90-SGT1 chaperone complex for NLR immune sensors. *Annu Rev Plant Biol* 60, 139-164.

Simpson PJ, Tantitadapitak C, Reed AM, Mather OC, Bunce CM, White SA, Ride JP. *J Mol Biol.* 2009 Sep 18;392(2):465-80. Epub 2009 Jul 15. Characterization of two novel aldo-keto reductases from *Arabidopsis*: expression patterns, broad substrate specificity, and an open active-site structure suggest a role in toxicant metabolism following stress.

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 280, No. 23, Issue of June 10, pp. 21867–21881, 2005 Printed in U.S.A. Detoxification and Transcriptome Response in *Arabidopsis* Seedlings Exposed to the Allelochemical Benzoxazolin-2(3H)-one*S

Torres Acosta, J. A., Berthiller, F., Wiesenberger, G., Mitterbauer, R., Werner, U., Merz, D., Hauser, M.-T. Shams, M., Krska, R., Adam, G. (2010): The Fusarium mycotoxin zearalenone inhibits Hsp90 ATPase activity and is inactivated in planta by glucosylation and sulfatation. In: Tagungsband der 60. Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs. Züchtung und Genressourcen gegen abiotische Stressfaktoren. Markergestützte Selektion in der Praxis., 121-123; ISBN: 978-3-902559-37-1; ISSN 2072-9596)

Van den Brûle S, Smart CC. The plant PDR family of ABC transporters. *Planta*. 2002 Nov;216(1):95-106. Epub 2002 Nov 12.

Verkhusha VV, Lukyanov KA. The molecular properties and applications of Anthozoa fluorescent proteins and chromoproteins. *Nat Biotechnol*. 2004 Mar;22(3):289-96. Review.

Vianello A, Macri F (1981) Effect of Zearalenone (F-2) on pea stem, maize root, and rat liver mitochondria. *Planta* 153: 443-446

Vianello A, Macri F (1978) Inhibition of plant cell membrane transport phenomena induced by zearalenone (F-2). *Planta* 143: 51-57

Wagner U, Edwards R, Dixon DP, Mauch F (2002) Probing the diversity of the *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene family. *Plant Mol Biol* 49(5): 515-32

Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ. An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One*. 2007 Aug 8;2(1):e718.

Yamamoto YY, Obokata J. *Nucleic Acids Res*. 2008 Jan;36(Database issue):D977-81. Epub 2007 Oct 18. ppdb: a plant promoter database.

Internet Resources;

Arabidopsis as a model plant: report from the NSF and MASC
[<http://www.nsf.gov/pubs/2002/bio0202/model.htm>]

Plantpromoterdb 2.0

(<http://ppdb.gene.nagoya-u.ac.jp/cgi-bin/index.cgi>)

Plasmapper

(<http://wishart.biology.ualberta.ca/PlasMapper/>)

C.V

Name: **Mona AYAD**

Adresse: Friedrich-Engels-Platz 15-16/8/9
1200 Vienna, Austria

Telefon&Fax: 004319681356

Telefon: 0043676 / 87 96 12 025

e-Mail: m.ayad@gmx.at

Geboren: 11.05.1973, Ägypten, Kom-Hamada-Biban

Educations

1980 – 1985: Primary School, Egypt

1986 – 1988: Preparatory School, Egypt

1989 – 1991: Secondary School, Egypt

1991 – 1995: BSc Microbiology. Faculty of Science, Ain Shams University, 1995
Very good with honor

2004-2010 : Master degree in Molecular Biology, Institute of Genetic, University of Natural resources and applied life Science.
Master title: molecular analysis of promoters for the in vivo detection of mycotoxins in *Arabidopsis thaliana*

Lab. Experiences:

Medical Analysis Lab. Cleopatra Hospital, Cairo, Egypt. 1995-1998

Practical courses in Vienna biocenter : Experimental genetics, Experimental Microbiology and Organic chemistry. 2002-2003.

Master student in Plant Genetics lab., University of Natural resources and Applied life Sciences.

Lab. Skills PCR, Real time PCR, DNA sequencing, Westen blotting,
Transformation in plants and bacteria, DNA and RNA extraction

from plant and animals and bioinformatic analysis.

Computer skills Word, Excel, powerpoint and Internet.

Languages

Arabic: Mother tongue.

German: Very good(written and spoken).

English: Very good (written and spoken).

References

- 1- **Prof. Marie-Theres Hauser**, University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna, Austria.
Telephon: 0043-1/36006-6371
E.mail : marie-theres.hauser@boku.ac.at
- 2- **Dr. Christina Lang-Mladek**, University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna, Austria.
Telephon: (+43)1/36006-6370.
E.mail: christina.lang-mladek@boku.ac.at
- 3- **Dr. Mohamed Al-Mughrabi**, Division for Asia and the Pacific Technical Cooperation Dept. International Atomic Energy Agency
E.Mail: M.Al-Mughrabi@iaea.org