

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Für die Herstellung von Agarosegelen wurde Agarose der Firma Roth (Karlsruhe) verwendet. Alle weiteren laborüblichen Chemikalien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma (St.Louis, USA), Merck (Darmstadt) und Serva (Heidelberg) bezogen.

#### 2.1.2 Stammlösungen

##### 2.1.2.1 Antibiotika

Ampicillin Natrium, Sigma (St.Louis, USA)

Chloramphenicol, Sigma (St.Louis, USA)

Hygromycin B, Roche Molecular Biochemicals (Mannheim)

Kanamycin Monosulfat, Duchefa (Haarlem, Niederlande)

Rifampicin, Duchefa (Haarlem, Niederlande)

Die Antibiotika wurden in geeignetem Lösungsmittel gelöst, mit Hilfe steriler Spritzenfilter der Firma Roth (Karlsruhe) Porengröße 0,2 µm sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

##### 2.1.2.2 Häufig verwendete Puffer und Stammlösungen

Alle Puffer und Stammlösungen wurden mit *Aqua bidest* angesetzt und anschließend sterilisiert. Die Sterilisierung erfolgte entweder mittels Autoklavieren (bei 121 °C und  $1,1 \times 10^5$  bar für 15 min) oder durch Sterilfiltration mit sterilen Spritzenfiltern Porengröße 0,2 µm, Roth (Karlsruhe).

##### Arabidopsis-Sterilisierungslösung

Aktive Chlor Endkonzentration 3,75%

SDS Endkonzentration 1%

Für 5 ml Stammlösung:

0,1875 g Chloriklar-Tabletten (Chloriklar®, Bayrol, München)

0,25 ml 20% SDS

4,75 ml steriles *Aqua bidest*

Zum besseren Lösen wurde die Flüssigkeit leicht erwärmt und mit 96% vergälltem Ethanol auf 50 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde immer frisch angesetzt, um die freigesetzte Chlormenge konstant zu halten.

##### 0,1% Agaroselösung

0,1% (w/v) Agarose (Neo, Ultra pure quality, Roth, Karlsruhe) in *Aqua bidest*

Die Lösung wurde vor Gebrauch autoklaviert.

##### 0,5 M EDTA

500 mM EDTA

pH 8,0

##### Ethidiumbromidfärbelösung 1%, Fluka (Buchs, Schweiz)

Die Lösung wurde in einer Verdünnung von 1:20000 eingesetzt.

IPTG-Stammlösung

IPTG, Roth (Karlsruhe)

100 mM Isopropylthio- $\beta$ -D-galactosid (IPTG)Endkonzentration 24  $\mu$ g/ml

sterilfiltriert, Lagerung bei -20 °C

10 x Ladepuffer für Agarose-Gele

10 mM EDTA (pH 8,0)

50% Glycerin

0,1% (w/v) Bromphenolblau, Sigma (St.Louis, USA)

Sequencing Mix 6%:

für 250 ml:

105 g Harnstoff

37,5 ml ABA 40% (19:1 oder 38:2)

25 ml 10 x TBE

20 x SSC

3 M NaCl

300 mM tri-Natriumcitrat-dihydrat

pH 7,0

20% SDS20% (w/v) in sterilem *Aqua bidest*

pH 7,2

1 x TAE

40 mM Tris-Acetat

1 mM EDTA (pH 8,0)

1 x TBE

100 mM Tris-Borat

2 mM Na<sub>2</sub>-EDTA (pH 8,0)

pH 7,4

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl (pH 8,0)

0,1 mM EDTA (pH 8,0)

X-Gal-StammlösungX-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside), Roth (Karlsruhe)

2% (w/v) in DMF gelöst

### 2.1.2.3 Nährmedien

Alle Nährmedien wurden mit *Aqua bidest* hergestellt und nach Einstellung des pH-Wertes mittels Autoklavieren sterilisiert. Die Sterilisation fand im Autoklaven bei 121 °C und  $1,1 \times 10^5$  Pa für 15 min statt.

#### LB-Medium (Luria-Bertani Medium)

Pro Liter:

25 g LB-Fertigmedium, Difco Laboratories (Detroit, Michigan, USA)

pH 7,0

#### YEB-Medium

Pro Liter:

5 g Bacto-Pepton (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA)

1 g Yeast-Extract (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA)

5 g Beef-Extract (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA)

5 g Saccharose

493 mg  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

pH 7,2 [1 N NaOH]

#### 1 x Arabidopsis-Medium

2,2 g/l Murashige and Skoog Basal Salt mixture (MS), Sigma (St.Louis, USA)

103,2 mg/l Murashige and Skoog Vitamin powder 1000 x, Sigma (St.Louis, USA)

1% Saccharose pH 5,8

Zur Herstellung von Arabidopsis-Medienplatten wurde zwischen 0,8% und 1,0% Agar-Agar (Merck, Darmstadt) zu dem Flüssigmedium vor dem Autoklavieren hinzugegeben. Die Zugabe von Antibiotika zum Medium erfolgte nach dem Autoklavieren bei einer Medientemperatur von ca. 50 °C unter sterilen Bedingungen.

### 2.1.3 Synthetische Oligonukleotide

Die Sequenzen der jeweils verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang gezeigt. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Tib Mol Biol (Berlin) synthetisiert. Sie wurden lyophilisiert, gereinigt, und getrocknet im Maßstab von 0,02 mMol-0,2 mMol geliefert. Für PCR-Untersuchungen wurden sie in einer Verdünnung von 0,5 µg/µl eingesetzt.

### 2.1.4 Enzyme

Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma Roche Molecular Biochemicals (Mannheim) und der Firma New England Biolabs (Frankfurt) bezogen und mit den mitgelieferten 10 x Reaktionspuffern eingesetzt.

Moloney-Murein Leukemia Virus Reverse Transcriptase, (20 U/µl) MBI Fermentas, (St.Leon-Roth)

Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transkriptase, (25 U/µl) Roche Molecular Biochemicals (Mannheim)

Shrimps alkalische Phosphatase, (1 U/µl), Roche Molecular Biochemicals (Mannheim)

T4-DNA-Ligase, (5 U/µl), Invitrogen (Paisley, Großbritannien), Q-Biogene (Heidelberg)

*Taq* DNA-Polymerase, (5 U/µl) von der Firma Appligene Oncor (Heidelberg) wurden entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt.

### 2.1.5 Kits

Zu unterschiedlichen Zwecken wurden folgende Kits eingesetzt:

Dig DNA labeling and detection kit, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

DNA purification and gel extraction kit von Qiagen, Hilden

DNeasy Plant Maxi Kit von Qiagen, Hilden

Dynabeads, Dynal AS, Oslo, Norwegen

First Strand cDNA Synthesis Kit von MBI Fermentas, St. Leon-Roth

Nucleobond AX Plasmid Purification Kit von Macherey und Nagel, Düren

Original TA-Cloning Kit, Invitrogen Groningen, Niederlande

RNA-Plant Mini Kit von Macherey und Nagel, Düren

RNeasy Plant Mini Kit von Qiagen, Hilden

T7-Sequencing Kit der Firma Amersham Biosciences, Freiburg

TNT®T7 Quick Coupled Transcription/Translation System von Promega, Mannheim

### 2.1.6 Geräte

#### Elektroporationsgerät

E.coli Pulser™ Transformation Appartus, BioRad, München

#### Gelelektrophoresekammern:

Gelelektrophoresekammer (GE-A2), AGS, Heidelberg

#### Homogenisatoren:

Homogenisator R25, Fra Mo Gerätetechnik, MORAT KG, Eisenbach

Ultra-Turrax T 25, Janke und Kunkel K.G., Staufen

#### Magnet-Heiz-Rührer:

IKAMAG RH, Janke und Kunkel K.G., Staufen

#### Netzteil:

Power Supply Bio-Rad, München

#### Photometer:

Photometer DU®, Beckman Coulter GmbH, Unterschleissheim-Lohhof

#### Röntgenfilmkassetten:

Cronex Lightning Plus, DuPont, Bad Homburg

Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine:

FujiFilm, Düsseldorf

Thermocycler:

Wasserbad-Thermo-Cycler, Typ: Thermocycler 60, bio-med GmbH, Theres

Gradienten-Biocycler, Typ: TGradient von Biometra, Göttingen

Thermomixer:

Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg

Thermomixer Compact, Eppendorf, Hamburg

UV-Crosslinker:

Stratalinker™, Stratagene, Heidelberg

UV-Dokumentationsanlage:

Gene Genius Bio Imaging System mit Software „GeneTools“,

Syngene, Cambridge, Großbritannien

Vacuublott-Apparatur:

Vacu Gene XL-Apparatur, Pharmacia, Freiburg

Vacu Gene Pump, Pharmacia, Freiburg

Zentrifugen:

Tischkühlzentrifuge 5402, Eppendorf, Hamburg

Kühlzentrifuge J2-21 mit Rotor JS-13.1 und Rotor JA-20 sowie Rotor JA-10, Beckman, München

Tischzentrifuge Centrifuge 5415D, Eppendorf, Hamburg

L7-55 mit Rotoren SW55-Ti und SW-28, Beckman, München

### 2.1.7 DNA-Marker

1kb ladder von Gibco BRL, Life Technologies GmbH, Paisley, Schottland

Digoxigenin-markierter DNA-Marker Nr. III, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

### 2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Sterile Petrischalen:

- quadratische Petrischalen (10 x 10cm)  $\gamma$ -sterilisiert, Sarstedt, Nümbrecht

- runde Petrischalen (Durchmesser 9, bzw. 12 cm), Greiner, Frickenhausen

Membranen:

- Nylon-Membran, positiv geladen, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

Alle weiteren verwendeten Geräte und Materialien gehörten zur laborüblichen Standardausstattung und werden daher hier nicht näher genannt.

### 2.1.9 Ausgangsvektoren

pCR2.1                      Invitrogen, Karlsruhe

pBinHygAR                Becker (1990)

### 2.1.10 Pflanzenmaterial

Als Wildtyp-Pflanzen wurde *Arabidopsis thaliana*, Ökotyp C24 verwendet. T-DNA-Insertionslinien (Ökotyp Columbia) wurden vom SIGnAL Salk Institute Genomic Analysis Laboratory (Torrey Mesa Research Institut, San Diego, USA) bezogen.

### 2.1.10.1 Pikier/*Arabidopsis*-Erde

Die zur Aussaat und zum Pikieren, sowie nach der Infiltration von *Arabidopsis*-Samen bzw. – Pflanzen eingesetzte sogenannte *Arabidopsis-Erde* setzte sich aus 2 Teilen Pikiererde, 1 Teil Torf und 2 Teilen Quarzsand zusammen.

### 2.1.11 Bakterienstämme

#### *Escherichia coli*

„One Shot™ cells“ (Invitrogen, Karlsruhe)

XL-1 Blue (Stratagene, Heidelberg)

Genotyp: *supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 th irelA1 lac<sup>-</sup> F' [proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZ ΔM15Tn10 (tet<sup>r</sup>)*

#### *Agrobacterium tumefaciens*

AGL1 (Genotyp: AGL0 *recA::bla pTiBo542ΔT Mop<sup>+</sup>Cb<sup>R</sup>*) (Lazo *et al.* 1991)

EHA105, Km(S) Derivat von EHA101 (Genotyp: C58 *pTiBo542*) (Hood *et al.* 1993)

LBA4404, Ach5 [*pAL4404*] (Genotyp: Ach5 *pTiAch5ΔT*) (Hoekema *et al.* 1983)

GV2260, C58C1 [*pGV2260*] (Genotyp: C58C1 *pTiB6s3ΔT Cb<sup>R</sup>*) (Deblaere *et al.* 1985)

## 2.2 Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden wie Restriktionsverdau, Gelelektrophorese von DNA und RNA, photometrische Vermessung von Nukleinsäuren, Elution von DNA aus Agarosegelen und Plasmid-DNA-Isolierungen erfolgten nach Sambrook *et al.* (1989) bzw. nach den Angaben der Hersteller.

### 2.2.1 Herstellung von *Antisense*- und *Sense*-Konstrukten

Folgende *Arabidopsis thaliana* kernkodierte RNA-Polymerasegene (Tab. 1) wurden für die Versuche eingesetzt. Geeignete Vektoren wurden eingesetzt, die eine Transformation von Wildtyp-Pflanzen mittels Agrobakterien-vermitteltem Gentransfer ermöglichten.

Tab. 1: Accession-Nummern der drei kernkodierten RNA-Polymerasen:

Bezeichnung der RNA-Polymerase	GenBank Nummer	Accession	GenBank Accession Nummer	Sequenz-Autoren
RNA-Polymerase 1	Y09432		At1g68990	W.Schuster 1996
RNA-Polymerase 2	AJ001037		At5g15700	W.Schuster 1997
RNA-Polymerase 3	Y08722		At2g24120	W.Schuster 1997/ Hedtke <i>et al.</i> 1997

Zur Herstellung der benötigten Antisense- und Sense-Konstrukte wurden die im Folgenden näher beschriebenen Methoden in aufeinander folgenden Schritten angewendet.

#### 2.2.1.1 Amplifizierung von DNA mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Sequenzen kam routinemässig die Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction, PCR) zum Einsatz. Für die PCR wurden ein Wasserbad-Thermo-Cycler, Typ: Thermocycler 60, der Firma bio-med GmbH (Theres) bzw. ein Gradienten-Biocyler, Typ: TGradient (Biometra, Göttingen) genutzt.

Der Gesamtansatz umfasste in der Regel ein Volumen von 100  $\mu$ l. Zwischen 10 und 50 ng DNA wurden jeweils als PCR-Matrize eingesetzt. Es wurde Reaktionspuffer ohne  $MgCl_2$  verwendet,  $MgCl_2$  wurde in einer Konzentration von 1,5 mM eingesetzt. Desoxy-Nukleotidtriphosphat-Gemisch wurde in einer Konzentration von 400  $\mu$ M (für jedes Nukleotid) hinzugefügt und 5'- und 3'-Primer grundsätzlich in einer Menge von 0,5  $\mu$ g verwendet. Von der *Taq*-DNA-Polymerase (Appligene Oncor, Heidelberg) wurde jeweils 1 U pro Ansatz benutzt.

Zu Beginn der PCR erfolgte eine 1-minütige Denaturierung, alle weiteren Denaturierungsschritte wurden für 30 sec durchgeführt. Die einzelnen PCR-Schritte wurden je nach Ansatz spezifisch angepasst, folgten aber im Allgemeinen folgendem Schema: 30 Zyklen mit einer Denaturierung bei 94 °C für 30 sec, Primeranlagerung bei Temperaturen zwischen 48 °C und 63 °C für 1 min, Verlängerungsreaktion durch die *Taq*-Polymerase bei 72 °C für 1 min. Abschließend erfolgte eine 10-minütige Inkubation bei 72 °C zur Fertigstellung der Amplifikation. Die Proben wurden in der Maschine auf 4 °C abgekühlt und bis zur späteren Verwendung im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

#### 2.2.1.2 *Inverse* PCR

Zur Klonierung der flankierenden Bereiche der T-DNA wurden die gesuchten Fragmente mittels *Inverser* PCR amplifiziert (Ochman *et al.* 1990, Silver 1991). Bei dieser Methode wird die genomische DNA mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut und die entstehenden Fragmente ligiert. Die Ligation wird dabei so durchgeführt, dass die einzelnen Fragmente zirkularisieren. Mit Oligonukleotidprimern, die entgegengesetzte Orientierung zeigen, kann dann das unbekannte Fragment aus der Insertionssequenz heraus amplifiziert werden. Dieses Fragment kann dann kloniert und sequenziert werden, damit ist eine Positionsbestimmung der T-DNA-Integration im Genom möglich.

Für die *Inverse* PCR wurden 2,5 µg genomische DNA mit verschiedenen Enzymen (*AluI* und *PvuII*) für 2 h bei 37 °C verdaut. Es folgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion und eine Ammoniumacetat-Ethanol-Fällung. Die anschließende Ligation erfolgte in einem 500 µl Ansatz mit 80 Units T4-DNA Ligase über Nacht bei 4 °C. Nach erneuter Ethanol-Fällung wurde die DNA zur PCR eingesetzt. Als Primerpaare wurden Binv1/Binv2 bzw. Binv4/Binv5 bei folgender PCR-Zyklusabfolge verwendet (1 x 3 min 96 °C, 25 x 30 sec 96 °C, 30 sec 56 °C, 1 min 72 °C, 1 x 5 min 72 °C). Die amplifizierten Fragmente, die je nach Primerpaar der linken bzw. rechten Borderintegration entsprechen, wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, aus dem Gel ausgeschnitten, eluiert und anschließend sequenziert.

#### 2.2.1.3 Ligation von PCR-Produkten mittels TA-Cloning Kit

Ligationen mit Hilfe der TA-Überhang-Methode machen sich eine besondere Eigenschaft der *Taq*-DNA-Polymerase zu Nutze, diese hängt an das 3'-Ende des Amplifikats Adenosinreste an. Der in vorliegender Arbeit verwendete pCR2.1-Vektor, der als Bestandteil des TA-Cloning Kits in linearisierter Form vorliegt und einen komplementären Thymidinrest an den



Enden trägt, konnte so mit dem frischen PCR-Produkt ligiert werden. Die Ligationsreaktion erfolgte nach Herstellerangaben (Invitrogen, Groningen, Niederlande).

#### 2.2.1.4 Dephosphorylierung von Vektor-DNA mittels SAP

Zur Dephosphorylierung der 5'-Phosphat-Enden der Vektor-DNA wurde das Enzym SAP (Shrimp alkalische Phosphatase) von Roche Molecular Biochemicals (Mannheim) verwendet. Für den Reaktionsansatz wurde ein vom Hersteller gelieferter Dephosphorylierungspuffer benutzt. Für einen Standardansatz wurden 50 ng Vektor-DNA eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde für 10 min bei 37 °C mit 1 Einheit SAP inkubiert. Die SAP wurde durch eine Inkubation für 15 min bei 65 °C vollständig inaktiviert.

#### 2.2.1.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Umklonierung der RNA-Polymerase-Gene aus dem pCR2.1-Vektor in die zur Pflanzentransformation geeigneten binären Vektoren mussten die DNA-Fragmente aus den Vektoren mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen ausgeschnitten und in die binären Vektoren nach erfolgter Dephosphorylierung ligiert werden. Die Ligation der DNA-Fragmente erfolgte in einem Fragment : Vektor-Verhältnis von 4 : 1. Für einen Standardligationsansatz wurden Vektor-DNA und Fragment in entsprechendem molaren Verhältnis gemischt und auf ein Volumen von 8 µl gebracht. 1 µl des vom Hersteller mitgelieferten T4-DNA-Ligase 10 x Reaktionspuffers wurde hinzugefügt und die Ligation durch Zugabe von 1 µl (2,5 U) T4-DNA-Ligase initiiert. Die Ligation erfolgte bei 14 °C für 4-16 h.

#### 2.2.1.6 Plasmid-DNA Mini-Präparation nach Birnboim und Doly (1979)

Zur näheren Untersuchung der erfolgten Plasmidtransformation wurden von den selektierten Bakterienklonen Minikulturen (10 ml) angesetzt, und diese über Nacht für *Escherichia coli* bei 37 °C und für *Agrobacterium tumefaciens* bei 28 °C schüttelnd inkubiert. Diese Minikulturen wurden dann nach einem Protokoll für einfache alkalische Lyse und Ethanol-Präzipitation leicht verändert nach Birnboim und Doly (1979) aufgearbeitet. Die erhaltene DNA wurde in sterilem *Aqua bidest* bzw. in TE-Puffer aufgenommen.

Anschließend wurde zur Überprüfung der klonierten Plasmide Restriktionsanalysen vorgenommen. Die Verdauungen wurden nach einem Standardprotokoll durchgeführt (Sambrook *et al.* 1989).

## 2.2.2 Klonierung von binären Vektoren zur Pflanzentransformation

### 2.2.2.1 Herstellung eines binären Klonierungsvektors mit Polylinkersite

Um für die Klonierung der unterschiedlichen RNA-Polymerasen-Konstrukte eine ausreichende Auswahl an Möglichkeiten zur Verfügung zu haben, wurde der binäre Ausgangsvektor pBinHygAR (Becker 1990) mit einer zusätzlichen Polylinkersite versehen. Zu diesem Zweck wurden zwei Oligonukleotide Hyg A und Hyg B, deren Sequenzen folgende zusätzliche Restriktionsschnittstellen (*AscI*, *XhoI*, *SpeI*, *PacI*) enthalten, in das Ausgangsplasmid pBinHygAR eingefügt.

Das binäre low copy Plasmid pBinHygAR wurde mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *Asp718* und *XbaI* linearisiert. Es folgte anschließend eine Ligation mit den Oligonukleotiden Hyg A und Hyg B in einem Standardligationsansatz bei 14 °C über Nacht. Das Produkt der erfolgten Ligation wurde mittels TA-Cloning Kit und den zugehörigen „One Shot™ cells“ nach Originalanweisung transformiert. Die Zellen aus dem Transformationsversuch wurden auf Selektionsmedium (mit Kanamycin 50 mg/ml) laut Herstellerangaben ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Von den Selektionsplatten wurden insgesamt 24 Kolonien gepickt und Minipräparationsansätze angeimpft. Nach erfolgter Minipräparation (siehe 2.2.1.6) wurde ein Kontroll-Verdau mit *XhoI* bzw. mit *SpeI* durchgeführt und die verdaute DNA mit Hilfe der Gelelektrophorese aufgetrennt, anschließend sichtbar gemacht und dokumentiert. Zusätzlich zur Restriktionsanalyse wurde eine Sequenzierung nach Sanger *et al.* (1977; siehe 2.2.2.3) durchgeführt und die Sequenz des Vektors überprüft.

### 2.2.2.2 Plasmid-DNA-Maxi-Präparation

Plasmid-DNA-Maxi-Präparationen wurden mit Hilfe des Kits Nucleobond AX von Macherey und Nagel (Düren, Deutschland) durchgeführt, wobei die Protokollvorschriften für low copy Plasmide befolgt wurden.

### 2.2.2.3 DNA-Sequenzierung nach Sanger *et al.* (1977)

Diese auch Kettenabbruchverfahren oder Didesoxynukleotidverfahren genannte Methode wurde zur Sequenzüberprüfung neu hergestellter Plasmide mit Polylinkersite (siehe 2.2.2.1) bzw. zur Überprüfung der *Antisense*- und *Sense*-Konstrukte der binären Plasmide zur Pflanzentransformation eingesetzt.

Dabei wurde zur Markierung radioaktiv markiertes [ $^{35}\text{S}$ ] $\alpha$ -dATP benutzt. Als Sequenzierprimer wurden je nach Plasmid ein 35S-Primer bzw. sequenzspezifische Primer verwendet. Für die Sequenzierung von DNA nach Sanger *et al.* wurde das T7-Sequenzierungskit der Firma Amersham Biosciences (Freiburg) verwendet. Für die DNA-Sequenzierungsreaktion musste die DNA einzelsträngig vorliegen, wozu im vorliegenden Fall die Denaturierung mittels NaOH gewählt wurde. Nach anschließender Aufreinigung der DNA über SepharoseCL-6B-Säulen (Amersham Biosciences, Freiburg) wurde sie sofort für die Sequenzierungsreaktion welche nach den Protokollangaben des Herstellers durchgeführt wurde, eingesetzt.

Die Sequenzierungsreaktionsprodukte wurden mittels Harnstoff-haltiger 6%iger Polyacrylamidgele aufgetrennt und eine Autoradiographie mit Hilfe von Röntgenfilmen angeschlossen.

#### 2.2.2.4 Herstellung und Transformation kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Die für die Hitzeschock-Transformation benötigten kompetenten Zellen wurden nach der leicht veränderten RbCl-Methode von Sambrook *et al.* (1989) wie folgt hergestellt. 1 ml einer 10 ml-Übernachtskultur wurden zum Animpfen einer 100 ml Kultur eingesetzt. Diese wurde bis zu einer optischen Dichte von  $\text{OD}_{600} = 0,4-0,6$  angezogen und anschließend mittels Zentrifugation (2.500 g, 10 min, 4 °C, Beckmann Kühlzentrifuge) pelletiert. Das Bakterienpellet wurde anschließend in 1/3 des ursprünglichen Volumens mit Puffer RF1 (30 mM KAc pH 7,5, 100 mM RbCl, 50 mM  $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ , 10 mM  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 15% (w/v) Glycerin, pH 5,8) versetzt und pelletiert (2.500 g, 10 min, 4 °C). Dieser Waschschrift wurde mit 1/12,5 des ursprünglichen Volumens mit RF2-Puffer (10 mM MPS pH 6,8, 10 mM RbCl, 75 mM  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 15% (w/v) Glycerin, pH 6,8) wiederholt. Die kompetenten Zellen wurden abschließend in 200  $\mu\text{l}$  Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Die Herstellung kompetenter Zellen für die Elektroporation unterscheidet sich lediglich in den Puffern für die Waschgänge. Hierbei wurde insgesamt dreimal gewaschen, einmal mit eisgekühltem *Aqua bidest* und zweimal mit 10% Glycerin in *Aqua bidest*, wobei das Puffer-Volumen jeweils um die Hälfte reduziert wurde.

Die Hitzeschock-Transformation erfolgte nach einem Protokoll von Cohen *et al.* (1972). Zu 100 µl kompetenten Zellen wurden 2-6 µl des Ligationsansatzes hinzugefügt, vorsichtig gemischt und für 30-60 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 90 sec bei 42 °C, gefolgt von einer 2-minütigen Inkubation auf Eis. Nach der Zugabe von 800 µl LB-Medium folgte eine 1-stündige Erholungsphase der Zellen bei 37 °C und leichtem Schütteln (200 rpm). Die Zellen wurden abschließend auf Antibiotika-haltigen Medien ausplattiert und selektiert.

Zur Elektroporation von *Escherichia coli*-Zellen wurden 40 µl der elektro-kompetenten Zellen in einer auf Eis vorgekühlten 0,2 cm Küvette mit 1-2 µl des Ligationsansatzes vorsichtig vermischt. Zur Elektroporation wurde die Küvette in den Elektroporationsapparat gestellt und eine Spannung von 12,5 kV/cm angelegt. Danach wurde 1 ml LB-Medium in die Küvette gegeben und die Zellen darin vorsichtig resuspendiert. Anschließend erfolgte eine 1-stündige Inkubation der Zellen bei 37 °C bei leichtem Schütteln (225 rpm). Danach wurden die Zellen auf Antibiotika-haltigen Medienplatten selektiert.

#### 2.2.2.5 Herstellung und Transformation kompetenter *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen

Die Herstellung kompetenter Zellen und die Transformation der Agrobakterien zur anschließenden Pflanzentransformation wurde nach dem Protokoll von Höfgen und Willmitzer (1988) durchgeführt.

Eine Übernachtskultur von *Agrobacterium tumefaciens* wird in 200 ml YEB-Medium verdünnt. Nach 3-4 h Wachstum wurden die Zellen durch Zentrifugation (3.000 g, 20 min, 4 °C) pelletiert. Es folgte ein Waschschrift mit 10 ml vorgekühltem TE-Puffer, anschließend wurden die Zellen in 20 ml frischem YEB-Medium resuspendiert. 500 µl-Aliquots wurden direkt zur Transformation eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C für maximal 3 Monate aufgehoben.

Die kompetenten Agrobakterien wurden mit 0,5-1 µg Plasmid-DNA gemischt und nacheinander für jeweils 5 min auf Eis, in flüssigem Stickstoff und bei 37 °C inkubiert. 1 ml YEB-Medium wird zu den Zellen hinzugegeben und diese bei 28 °C für 2-4 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf Antibiotika-haltigem Medium ausplattiert und bei 28 °C für 2 Tage inkubiert.

### 2.2.3 Anzucht von Pflanzen

Die Pflanzen wurden im Gewächshaus bei 20 °C und einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16 zu 8 h kultiviert. Die Lichtintensität betrug 16000 lx. Die Samen wurden nach der Ernte 48 h vernalisiert und anschließend auf *Arabidopsis*-Erde ausgelegt. Mit Hilfe einer Plastik-Haube wurde für 48 h das nötige Mikroklima zur Keimung geschaffen.

### 2.2.4 Herstellung einer Agrobakterien-Suspension für die *in planta*-Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Zur Durchführung einer *in planta*-Transformation von *Arabidopsis thaliana* wurden 10 ml YEB-Medium (Chloramphenicol 34 mg/ml, Kanamycin 50 mg/ml, Rifampicin 50 mg/ml) mit dem gewünschten Agrobakterienstamm angeimpft und für 48 h bei 28 °C und 125 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Diese Vorkultur wurde dann in 1 l Hauptkultur überführt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8-1,0 angezogen. Die Agrobakterien wurden dann in einer Beckmann Kühlzentrifuge mit Rotor JA-10 bei 4 °C und 2.000 g für 15 min abzentrifugiert, das überstehende Medium dekantiert und das Bakterienpellet vorsichtig in 300 ml Infiltrationsmedium (½ MS-Medium, 5% Saccharose, 0,44 µM BAP, 0,02% (v/v) Detergenz Silwet-Copolymer (Order Nr. 30819, Silwet L77, OSi Specialties Inc., USA), pH 5,8 mit KOH) resuspendiert. Diese Agrobaktériensuspension konnte anschließend für die Transformation (siehe 2.2.5) eingesetzt und mehrmals verwendet werden.

### 2.2.5 *In planta*-Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die *in planta*-Transformation von C24-*Arabidopsis*-Wildtyppflanzen wurde nach einem leicht abgeänderten Protokoll von Bechtold *et al.* (1993) und Bent *et al.* (1994) vorgenommen.

Im Gewächshaus angezogene, vier bis sechs Wochen alte C24-Wildtyp-Pflanzen, die sich im Stadium der Infloreszenz befanden, wurden vorsichtig samt unverletzter Wurzeln aus der Erde herausgezogen und die Wurzeln mit Wasser von Erdresten befreit. 10-15 dieser Pflanzen wurden dann in ein 2 l Becherglas mit 500-1000 ml Agrobaktériensuspension gegeben und mit einer gläsernen Petrischale beschwert, damit die Pflanzen vollständig mit Suspension bedeckt blieben. Das Becherglas wurde dann in einen Exsikkator gestellt und für 10 min im Vakuum inkubiert. Nach der Infiltration zeigten die Pflanzen ein glasiges, leicht durchsichtiges Aussehen. Sie wurden dann einzeln in kleine Töpfchen (Durchmesser 6 cm) mit *Arabidopsis*-Erde eingepflanzt, gewässert, mit einer perforierten Plastikhaube abgedeckt und ins Gewächshaus oder in die Kulturkammer überführt. Nach drei bis vier Tagen wurde

die Plastikhaube entfernt und die Pflanzen unter den üblichen Gewächshausbedingungen weiter kultiviert.

### 2.2.6 *In vitro*-Selektion von transgenen Pflanzen

Nach Abreifen der Samen der transformierten Pflanzen, wurden diese geerntet, gesäubert und bei 4 °C aufbewahrt. Zur *in vitro*-Selektion wurden Arabidopsis-Medienplatten (siehe Material 2.1.2.3) mit dem entsprechenden Antibiotikum hergestellt. Im vorliegenden Fall handelte es sich vor allem um Hygromycin (eingesetzte Konzentration 25 mg/l) und Kanamycin (eingesetzte Konzentration 50 mg/l).

500 zu selektierende Samen (entspricht ungefähr 10 mg) wurden in einem Plastikröhrchen für 10 - 15 min in Sterilisierungslösung inkubiert. Die Sterilisierungslösung wurde vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt, anschließend wurden die Samen drei Mal mit *Aqua bidest* gewaschen. Die Samen wurden in 5 ml 0,1%iger Agaroselösung aufgenommen und auf den getrockneten Medienplatten gleichmässig verteilt. Danach erfolgte die Vernalisation für 48 h bei 4 °C. Die Platten wurden in Kulturschränke überführt und bei einer Temperatur von 20 °C und einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16/8 h sowie einer Lichtstärke von 16000 lx kultiviert.

Die Hygromycin-resistenten Pflänzchen können bereits 1-2 Wochen nach dem Ausplattieren an ihrer dunklen Grünfärbung sowie an der Bildung von Primärblättern und ins Medium ragenden Wurzeln erkannt werden. Wildtyp-Pflanzen bleiben auch grün, bilden jedoch weder Primärblätter noch ins Medium wachsende Wurzeln.

Kanamycin-resistente Pflanzen verhalten sich wie die Hygromycin-resistenten Pflanzen, jedoch der Unterschied zu den Wildtypen ist hier stärker, da diese nicht ergrünen sondern eine bleich-gelbe fast weissliche Färbung annehmen und keine Primärblätter bilden.

Die selektierten Pflanzen wurden anschließend in Arabidopsis-Erde überführt und im Gewächshaus bei konstanten Bedingungen (16.000 lx, 20 °C, 16/8 h-Tag/Nacht-Rhythmus) kultiviert.

### 2.2.7 Analyse der transgenen Pflanzen

#### 2.2.7.1 Extraktion genomischer Pflanzen-DNA mittels CTAB-Methode

Zur Extraktion von genomischer Pflanzen-DNA wurde das DNeasy Plant Maxi Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) eingesetzt.

Das Pflanzenmaterial wurde im Gewächshaus abgenommen und sofort in flüssigem Stickstoff „schockgefroren“. Das so gewonnene Material konnte bei -80 °C dauerhaft gelagert werden.

Zur Homogenisierung des Pflanzenmaterials wurden mit flüssigem Stickstoff vorgekühlte Mörser mit passendem Stößel verwendet. Ansonsten wurde exakt das Protokoll des Herstellers befolgt.

#### 2.2.7.2 PCR-Untersuchung auf Markergen-Integration

Zum Nachweis des Markergens in den Transformanden wurde routinemässig die Polymerase-Ketten-Reaktion (kurz PCR), wie unter 2.2.1.1 bereits beschrieben, eingesetzt. Mit Hilfe des Primerpaares HPT 6/HPT 7 konnte ein 882 bp großer Abschnitt aus dem Hygromycin-Phosphotransferase-Gen amplifiziert werden. Als Matrizen-DNA fungierte mittels DNA-Maxipräparation (siehe 2.2.2.2) hergestellte DNA von Pflanzen der zu untersuchenden transformierten Linien.

Die Versuchsansätze waren Standardansätze, wie unter 2.2.1.1 angegeben. Das Primerpaar HPT 6/HPT 7 benötigt eine Annealingtemperatur von 48 °C.

Von den 100 µl PCR-Ansätzen wurden jeweils 10-15% in einem 0,8-1,0%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert.

#### 2.2.7.3 Southern Blot-Untersuchung auf T-DNA-Integration und Kopienanzahl

Um geelektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente von einem Agarose-Gel auf eine Membran zu übertragen, wurde von E. M. Southern (1975) ein Verfahren eingesetzt, welches in vielen Labors Verwendung findet.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Southern Transfer mittels einer Vakuum-Blotting-Apparatur (Vacu Gene XL-Apparatur, Pharmacia) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Insgesamt 3-5 µg verdaute Pflanzen-DNA wurde in einem 1%igen Agarose-Gel (Roth, Neo Agarose) über Nacht bei 1 V/cm in 1 x TBE-Puffer aufgetrennt. Nachdem das Gel vor dem Blotten auf dem Transilluminator für 5 min zur Depurinierung mit UV-Licht (280 nm) bestrahlt worden war, wurde die aufgetrennte DNA mit Hilfe eines alkalischen Vakuumblots (0,4 M NaOH, 50 mbar) auf eine positiv geladenen Nylon-Membran (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) transferiert. Zur DNA-Fixierung wurde die Membran für 30 min bei 120 °C gebacken, in einen Plastikbeutel eingeschweißt und bei 4 °C gelagert.

#### 2.2.7.4 Herstellung einer Dig-markierten Sonde

Aus dem Plasmid pBinOligo wurde ein *EcoRI/BamHI*-Fragment des 35S-Promotors mit einer Größe von 617 bp und aus dem Plasmid pGL2 ein *BamHI*-Fragment des hpt-Resistenzgens mit einer Größe von 1000 bp verdaut und eluiert und nach dem Prinzip der “random-primed labeling”-Methode (Feinberg und Vogelstein 1983), modifiziert für den Einsatz des nicht-radioaktiven Digoxigenins als Markierungssubstanz (Kessler *et al.* 1990; Seibl *et al.* 1990), markiert. Die benötigten Feinbiochemikalien wurden dem „Dig DNA labeling and detection kit“ (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) entnommen.

In je einem Ansatz von 15 µl wurden insgesamt 1 µg DNA pro Markierungsansatz eingesetzt, zuerst denaturiert (100 °C Wasserbad) und auf Eis abgekühlt, dann anschließend mit 2 µl random hexamer mixture, sowie dNTP-Markierungsgemisch, welches die Dig-dUTP's enthält, versetzt und gemischt. Nach der Zugabe von 1 µl Klenow-Enzym erfolgte eine Inkubation von 20 Stunden bei 37 °C im Thermoheizblock. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl 0,2 M Na<sub>2</sub>EDTA gestoppt. Zur Abtrennung der markierten und unmarkierten Polynukleotide von den Einzelnukeotiden folgte anschließend eine LiCl/EtOH-Fällung und die Aufnahme der gefällten DNA in 50 µl sterilem *Aqua bidest.*

#### 2.2.7.5 Bestimmung der Markierungseffizienz mittels Dot Blot

Zur Bestimmung der Markierungsstärke der hergestellten Sonde wurde eine von Roche Molecular Biochemicals (Mannheim) angebotene, in definierter Menge bereits markierte Vergleichs-DNA (Kontroll-DNA, Dig-markierte pBR328 Kontroll-DNA, 1 ng/µl-0,1 pg/µl) eingesetzt. Sowohl von der Kontroll-DNA als auch von der frisch markierten DNA wurden Verdünnungsreihen in 10er-Schritten von 1:10 bis 1:10.000 erstellt und je 1 µl der Lösung auf eine Nylon-Membran aufgetragen. Die immunologische Detektion erfolgte durch Colorimetrie laut Hersteller-Angaben. Die Farbreaktion wurde beendet, sobald ein optischer Vergleich der Intensität der Farbpräzipitate eine Ermittlung der Markierungsstärke zuließ.

#### 2.2.7.6 Hybridisierung, Waschen und Detektion

Die Hybridisierung und Chemilumineszenz-Detektion wurde mit leichten Veränderungen nach den Protokollen von Nielen (1993, 1995) durchgeführt.

Prähybridisierung und Hybridisierung fanden in einem Hybridisierungsröhrchen (Quantum, Appligene, Heidelberg) mit 20 ml (Prähybridisierung) bzw. 7,5 ml (Hybridisierung) Hybridisierungslösung (50 % (v/v) Formamid, 5 % (w/v) Blocking Reagenz, 5 x SSC (pH 7,0), 0,1 % Laurylsarkosinat, 0,02 % (w/v) SDS) pro 100 cm<sup>2</sup> Membran statt. Die



Prähybridisierung wurde für mindestens 4 h bei 42 °C im Hybridisierungssofen vorgenommen. Die Prähybridisierungslösung wurde anschließend durch Hybridisierungslösung mit frisch denaturierter Dig-Sonde (40 ng/ml) ersetzt. Die Hybridisierung erfolgte bei 42 °C (bei Hybridisierungslösung mit Formamid) im Hybridisierungssofen über Nacht (mindestens 16 h). Durch zwei aufeinanderfolgende Waschgänge mit 2 x SSC und 0,1% SDS (w/v) bei RT für jeweils 15 min und zwei weitere stringentere Waschvorgänge mit 1 x SSC und 0,1% SDS (w/v) bei 59 °C ebenfalls 15 min lang, wurde überschüssige Sonde von der Membran entfernt. Die immunologische Detektion der Hybridisierungssignale wurde mit Hilfe von polyklonalen Anti-Dig-Fab-Fragmenten konjugiert an alkalische Phosphatase durchgeführt. Nach der Behandlung der Membran mit Blockierungslösung (1% Blockierungsreagenz 1:10 in Maleinsäurepuffer, 100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5) erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit Antikörper-Lösung (75 mU/ml Blockierungslösung). Zur Entfernung überschüssiger und unspezifisch gebundener Antikörper schlossen sich dann drei Waschgänge mit Waschpuffer (MSP + 0,3% (v/v) Tween 20) für jeweils 15 min an. Die anschließende Äquilibration mit alkalischem Puffer (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,5) sorgte für die Aktivierung der an den Antikörper gebundenen alkalischen Phosphatase.

Die Anwendung des Ready-to-use-CSPD-Chemilumineszenz-Substrats (1 ml bzw. 20-30 Tropfen pro 100 cm<sup>2</sup> Membran) wurde in einer doppelseitig aufklappbaren Plastikhülle nach Protokollangaben (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) vorgenommen. Die feuchte Membran wurde in Klarsichtfolie eingeschweißt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Für die Belichtung eines Röntgenfilms wurde die Membran in eine Filmkassette eingeklebt und der Röntgenfilm (Kodak, X-omat AR, Biomax, Stuttgart) aufgelegt. Die Expositionszeit lag zwischen 3 und 24 h. Die Entwicklung des Röntgenfilms erfolgte mit Hilfe einer Röntgenfilm-Entwickler-Maschine (FujiFilm, Düsseldorf).

#### 2.2.7.6.1 Rehybridisierung

Membranen, die bereits mit einer Sonde hybridisiert und deren Signale durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht worden waren, konnten rehybridisiert werden, mussten zuvor jedoch gewaschen werden. Die Membran wurde in sterilem *Aqua bidest* für 5 min auf dem Schüttler gewaschen. Darauf folgend wurde die Membran zweimalig in 0,2 N NaOH + 0,1% SDS für jeweils 10 min bei 37 °C inkubiert. Es folgte ein Waschgang in 2 x SSC, nach dem die Membran entweder auf einem Bogen Whatmann 3 MM-Papier luftgetrocknet und anschließend in einen Gefrier- und Kochbeutel (Melitta, Minden) zur

weiteren Lagerung bei 4 °C eingeschweißt oder sofort zur erneuten Prähybridisierung weiterverwendet wurde.

#### 2.2.7.7 Gesamt-RNA-Extraktion

Die Gesamt-RNA der zu analysierenden Pflanzen wurde mit Hilfe des RNA-Plant Mini Kits von Macherey und Nagel extrahiert.

Entscheidend war die vor der eigentlichen Extraktion stattfindende Homogenisierung des Pflanzenmaterials, welches entweder frisch oder aus der -80 °C Lagerung nach „Schockgefrieren“ mittels flüssigem Stickstoff eingesetzt wurde. Die Homogenisierung erfolgte entweder mittels Plastikpistill und Homogenisatorvorrichtung (Homogenisator R25, Fra Mo Gerätetechnik, Eisenbach) im Extraktionspuffer unter Zusatz von feinkörnigem Quarzsand oder mittels Ultra-Turrax (Janke und Kunkel, Staufen), ebenfalls in Extraktionspuffer, jedoch ohne Quarzsand. Die weitere Bearbeitung der Proben wurde laut Protokollangaben des Herstellers vorgenommen.

Die isolierte Gesamt-RNA wurde zwecks Qualitäts- und Quantitätsprüfung jeweils gelelektrophoretisch aufgetrennt und im Photometer gemessen (molekularbiologische Standardprotokolle nach Sambrook *et al.* 1989).

#### 2.2.7.8 mRNA-Aufreinigung

Zur Aufreinigung der mRNA aus der Gesamt-RNA wurden paramagnetische Partikel (Dynabeads) der Firma Dynal AS (Oslo, Norwegen) verwendet. Bei den Dynabeads handelt es sich um para-magnetische Partikel mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 2,8 µm (+/- 0,2µm) an deren Oberfläche Oligo-dT-Sequenzen kovalent gebunden sind. Mit diesen Oligo-dT-Sequenzen können die Poly-A<sup>+</sup>-Enden der mRNA hybridisieren. Mit Hilfe eines Magnetes werden die Partikel samt mRNA dann aus der Suspension entfernt, können anschließend gereinigt und die mRNA eluiert werden. Zur mRNA-Aufreinigung wurde immer die Gesamt-RNA (100 µl) eingesetzt. Pufferzusammensetzungen und Vorgehensweisen entstammten dem Herstellerprotokoll.

### 2.2.7.9 Erst-Strang-cDNA-Synthese

Zur Erst-Strang-cDNA-Synthese wurden unterschiedliche Reverse Transkriptasen eingesetzt, im Wesentlichen wurde jedoch das First Strand cDNA Synthesis Kit von MBI Fermentas (St. Leon-Roth) benutzt, welches mit einer M-MuLV-Reversen Transkriptase ausgestattet ist. In einem 11 µl umfassenden Versuchsansatz wurden 0,1-0,5 µg Poly(A)<sup>+</sup>-mRNA mit 0,2 µg Random-hexamer-Primern für 5 min bei 70 °C inkubiert. Nach anschließender Zugabe von Reaktionspuffer, Ribonuklease-Inhibitor (20 Units) und 10 mM dNTP Gemisch (1 mM) auf Eis, erfolgte eine Inkubation bei 25 °C für 5 min. Die Reverse Transkription wurde mit Zugabe von 2 µl der M-MuLV Reverse Transkriptase (20 U/µl) und einer Inkubation von zuerst 10 min bei 25 °C gestartet und anschließend für 60 min bei 37 °C durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 70 °C für 10 min gestoppt, auf Eis anschließend abgekühlt und die cDNA bei -20 °C gelagert.

### 2.2.7.10 Quantitative RT-PCR

Bei der quantitativen RT-PCR handelte es sich um eine Multiplex-PCR. Sie wurde in Anschluß an die Erst-Strang-cDNA-Synthese zum Nachweis der Transkriptmenge der einzelnen RNA-Polymerasen eingesetzt. Als interner Standard zur Abschätzung der Transkriptmengen wurde das Actin2-Gen aus *Arabidopsis thaliana* gewählt (An *et al.*, 1996, Isono *et al.* 1997). Folgende Primer-Paare wurden verwendet (Tab. 2):

Tab. 2: Eingesetzte Primerpaare zur quantitativen RT-PCR mit den entsprechenden Annealingtemperaturen

Primerpaare	Gennachweis	Annealingtemperatur (°C)
Act 2A/ Act 2B	Actin 2	50-64
Nico Pol 1A/ Nico Pol 1B	RNA-Polymerase 1	59
Nico Pol 2D/ Nico Pol 2E	RNA-Polymerase 2	62,5
Nico Pol 3C/ Nico Pol 3D	RNA-Polymerase 3	59

In jedem Ansatz wurde das entsprechende Polymerase-spezifische Primerpaar zusammen mit dem Actin-Primerpaar eingesetzt. Die Ansätze wurden entsprechend einer Standard-PCR mit einem Volumen von 30 µl oder 50 µl angesetzt.

Von der hergestellten cDNA wurde jeweils 1 µl aus einem 30 µl Gesamtansatz verwendet. Als Kontrolle diente genomische Wildtyp-DNA und Wildtyp-cDNA. Die PCR-Produkte wurden nach der gelelektrophoretischen Auftrennung mittels einer Software der Firma Syngene (Cambridge, Großbritannien) quantifiziert, um die Menge der jeweiligen Polymerase mRNAs im Vergleich zum Actin-Standard zu bestimmen.

#### 2.2.7.11 RNA-Editing-Untersuchung mittels Hot-Shot-Sequenzierung

Zur Untersuchung des RNA-Editings bestimmter mitochondrialer und plastidärer Transkripte wurde, wie unter 2.2.7.9 beschrieben, Random-geprimte cDNA eingesetzt. Die Primersequenzen sind im Anhang gezeigt.

Erst-Strang-cDNA wurde nach Standard-PCR-Bedingungen mit entsprechenden Primern amplifiziert, die PCR-Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt, aus dem Gel eluiert und anschließend unter Vakuum getrocknet. Die PCR-Produkte wurden danach sequenziert.

#### 2.2.8 Wurzellängen-Test

Zur Untersuchung des Einflusses der *Antisense*-Expression auf die Pflanzen wurde das Wurzel-Längenwachstum bestimmt. Dazu wurden oberflächensterilisierte Samen (siehe auch Kap. 2.2.6) an definierten Punkten auf 1 AM ausgelegt. Die Platten wurden 48 h bei 4 °C und Dunkelheit, anschließend bei 20 °C (Tag/Nacht-Rhythmus von 16/8 h und einer Lichtintensität von 16000 lx) kultiviert. Im Abstand von 2-4 Tagen wurden die Wurzeln vermessen und die Länge dokumentiert.

#### 2.2.9 Gekoppelte *in vitro*-Transkription und -Translation von RNA-Polymerase-Proteinen

Mit Hilfe des TNT®T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega, Mannheim) können Sequenzen, die entweder in einem Plasmid (pCR2.1) oder als PCR-Produkt vorliegen, und über einen T7-Promotor verfügen, *in vitro* transkribiert und translatiert werden. Die Markierung des Proteins erfolgt dabei über den Einbau von [<sup>35</sup>S]-Methionin. Die so markierten Proteine lassen sich für *In organello*-Import-Versuche einsetzen.

Für die Reaktion wurden jeweils 0,2-2 µg linearisierte Plasmid-DNA (bzw. PCR-Produkte) zu 40 µl TNT®T7 Quick Master Mix, 10-40 µCi von [<sup>35</sup>S]-Methionin (1000 Ci/mmol) hinzugefügt und anschließend mit Nuklease-freiem *Aqua bideest* auf 50 µl aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde danach für 60-90 min bei 30 °C inkubiert. Zur Überprüfung der Transkriptions-/Translations-Reaktion wurden 2 µl des Reaktionsansatzes mit 2 x SDS versetzt und mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Autoradiographie analysiert.

### 2.2.10 Import von *in vitro*-translatierten RNA-Polymerase-Proteinen in Chloroplasten

#### Isolierung von Chloroplasten aus *Arabidopsis thaliana*

Für die Importversuche wurden aus Pflanzenmaterial von *Arabidopsis thaliana* Chloroplasten isoliert. Alle Arbeitsschritte zur Chloroplastenisolierung fanden bei 4 °C statt. 100 g Pflanzenmaterial wurden in HS-Puffer (330 mM Sorbitol, 50 mM HEPES, pH 8,0, 0,1 % BSA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>) homogenisiert, durch zwei Lagen Miracloth (Calbiochem, La Jolla, USA) filtriert und für 2 min bei 1.700 g (Rotor JA-20) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 8 ml HS-Puffer resuspendiert und anschließend über 10 ml Percollgradienten (80 %, 65 %, 45 %, 25 % und 10 % v/v) in HS-Puffer für 8 min bei 800 g und 4 °C zentrifugiert. Die intakten Chloroplasten konnten dann aus der Interphase entnommen und in 5 Volumen HS-Puffer aufgenommen werden. Es folgte eine Zentrifugation bei 4.000 g und 4 °C für 2 min. Nach einem abschließenden Waschgang in 10 ml HS-Puffer zur Entfernung des Percoll wurde das Chloroplasten-Pellet in 1 ml HS-Puffer aufgenommen.

#### Import von *in vitro*-translatierten Proteinen in Chloroplasten

Zum Import *in vitro*-translatierter Proteine wurden die Reaktionsansätze folgendermaßen präpariert. 100 µl der 1:2 verdünnten Chloroplasten (25 µg Chlorophyll) wurden mit 20 µl Mg-ATP (10 mM) versetzt und auf Eis für 10 min inkubiert. Anschließend wurden 25 µl des Protein-Lysats hinzugefügt und für 30 min bei RT und Licht (50 µEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) inkubiert. Nach dem Import wurden die Plastiden bei 2.500 g für 3 min abzentrifugiert und das Pellet in 125 µl HS-Puffer resuspendiert. Von diesem Ansatz wurden 30 µl entnommen bei 2.500 g für 3 min pelletiert und in 100 µl 1 x SDS-PAGE-Puffer resuspendiert. Die restlichen 95 µl des Importansatzes wurden mit 12,5 µl Thermolysin (Sigma, St.Louis, USA) für 25 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz bei 2.500 g für 3 min zentrifugiert und in 100 µl 1 x SDS aufgenommen. Zur Analyse wurden die Proben mittels 10%igem SDS-Gel aufgetrennt und eine Autoradiographie durchgeführt.

### 2.2.11 Import von *in vitro*-translatierten RNA-Polymerase-Proteinen in Mitochondrien

#### Isolierung von Mitochondrien aus *Arabidopsis thaliana*

Für die Importversuche wurden aus Pflanzenmaterial von *Arabidopsis thaliana* Mitochondrien wie folgt isoliert. 20-100g Pflanzenmaterial wurden mit Hilfe von Mörser und Stößel in Aufschlusspuffer (400 mM Mannitol, 1 mM EGTA, 25 mM Tricin, 10 mM β-Mercaptoethanol, 0,2 mM PMSF, 0,1 % (w/v) BSA, pH 7,2) homogenisiert. Eine Entfernung der Zelltrümmer erfolgte durch Zentrifugation bei 1.600 g für 25 min, eine Anreicherung der

Mitochondrien durch weitere Zentrifugation bei 12.800 g ebenfalls für 25 min. Die Mitochondrien wurden in wenig Resuspensionspuffer (0,4 M Mannitol, 10 mM MOPS, pH 7,2) aufgenommen und mehrmals mit in Waschpuffer (400 mM Mannitol, 10 mM Tricin, pH 7,2, 1 mM EGTA, 0,2 mM PMSF) gewaschen. Durch Zentrifugation im dreistufigen Percoll-Gradienten (14 %, 28 %, 45 %) bei 70.000 g im SW-28-Rotor wurden die Mitochondrien weiter angereichert und konnten aus der Interphase zwischen der Stufe bei 28 % und 45 % entnommen werden. Die Mitochondrien wurden abschließend mit Percoll-freiem Puffer mehrmals gewaschen.

#### Import von *in vitro*-translatierten Proteinen in Mitochondrien

Für den Import der *in vitro*-translatierten Protein in Mitochondrien wurden die isolierten Mitochondrien in 400 mM Mannitol, 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,2) und 0,1 % (w/v) BSA gewaschen und aufgenommen. Für jeden Importversuch wurden 40  $\mu\text{l}$  aufgereinigte Mitochondrien (10 mg Protein/ml), 160  $\mu\text{l}$  Importpuffer (240 mM Mannitol, 20 mM HEPES, 80 mM KCl, 1 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1 mM ATP, 1 mM Malat, 2 mM NADH, 1 mM DTT) und 10  $\mu\text{l}$  Lysat verwendet. Die Importansätze wurden für 20 min bei 10 °C inkubiert.

Die anschließende Proteasebehandlung erfolgte mit 200  $\mu\text{g/ml}$  Proteinase K pro Importansatz, bei 20 °C für 20 min. Es folgte eine weitere Inkubation bei 20 °C für 1 min nach der Zugabe von 1 mM PMSF, um die Proteinase K zu hemmen.

Zur Detergenzbehandlung wurde während des Proteaseverdaus 1 % (w/v) Triton X-100 hinzugefügt. Die Hemmbarkeit des Imports wurde durch Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  Valinomycin getestet.

Mit Hilfe einer Zentrifugation durch ein 25%iges (w/v) Saccharose-Kissen wurden die Mitochondrien anschließend gereinigt. Die mitochondrialen Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, das Gel unter Vakuum getrocknet und anschließend eine Autoradiographie durchgeführt.