

Einfluss von untranslatierten Regionen und Terminatoren auf die Expression von Transgenen unter subletalen Temperaturstress

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock

> vorgelegt von **Tobias Latzkow** geb. am 12.04.1981 in Kühlungsborn aus Rostock

> > Rostock 2011

urn:nbn:de:gbv:28-diss2011-0167-0

- 1. Gutachter: Prof. Dr. habil. Inge Broer, Universität Rostock, Agrar- und Umweltwissenschaftliche Fakultät, Agrobiotechnologie und Begleitforschung zur Bio- und Gentechnologie
- 2. Gutachter: Dr. habil. Matthias Fladung, Johann Heinrich von Thünen-Institut, Bundesforschungsinstitut für Ländliche Räume, Wald und Fischerei, Institut für Forstgenetik

Datum der Verteidigung: 11. Juli, 2011

Inhaltsverzeichnis

Ζι	Zusammenfassung1				
Α		Einleitu	ng	2	
	A1	Die Reg	ulation endogener pflanzlicher Gene	2	
	A2	Express	ion von Fremdgenen in transgenen Pflanzen	4	
	A3	Untersu	chung der Hitze-induzierten Transgeninaktivierung in Herbizid-resisten	ten	
		Tabakpf	lanzen	6	
	A4	Ziele de	r Arbeit	10	
в		Materia	l und Methoden	11	
	B1	Material		11	
	В	1.1 Verv	wendete Gene, Plasmide und Bakterienstämme	11	
		B1.1.1	Plasmide	11	
		B1.1.2	Bakterienstämme	11	
		B1.1.3	Verwendete Pflanzenspezies und erzeugte transgene Pflanzen	12	
	В	1.2 Mec	lien	12	
		B1.2.1	Bakterienmedien	12	
		B1.2.2	Pflanzenmedien	13	
		B1.2.3	Antibiotika- und Herbizid Zusätze	13	
	В	1.3 Puff	er und Lösungen	14	
		B1.3.1	Puffer und Lösungen für die Isolierung und Analyse von DNA	14	
		B1.3.2	Puffer und Lösungen für die Isolierung und Analyse von RNA	14	
		B1.3.3	Puffer und Lösungen für Southern- und Northern-Kapillarblot	15	
		B1.3.4	Puffer und Lösungen für die Isolierung und Analyse von Proteinen	15	
		B1.3.5	Puffer und Lösungen für die Isolierung und Analyse von nativen		
			Kernproteinextrakten	17	
		B1.3.6	Weitere Puffer und Lösungen	17	
	В	1.4 Prin	ner und Oligonukleotide	18	
	B2	Methode	en	18	
	В	2.1 Kult	urbedingungen	18	
		B2.1.1	Kultivierung von Bakterienstämmen	18	
		B2.1.2	Kultivierung von Pflanzen unter optimalen Temperaturen	18	
		B2.1.3	Induzierung eines moderaten Hitzestresses	19	
	В	2.2 Ster	ilisation von Tabaksamen	19	
	В	2.3 DNA	A-Transfer Methoden	19	
		B2.3.1	Transformation von Escherichia coli	19	
		B2.3.2	Transformation und Identifikation von Agrobacterium tumefaciens	20	
		B2.3.3	Transformation von Pflanzen	20	
	В	2.4 Isoli	ierung von Plasmid-DNA	21	
	В	2.5 Isoli	erung von Pflanzen Gesamt-DNA	22	
	В	2.6 Isoli	erung und Behandlung von Pflanzen Gesamt-RNA	23	
	В	2.7 Elek	ktrophorese	25	
	В	2.8 DN/	A-, RNA- und Protein-Blot-Nachweisverfahren	26	
	В	2.9 DNA	A-Klonierungstechniken		

E	32.10 Poly	meraseketten-Reaktion (PCR)	30
E	32.11 DNA	-Sequenzierung	31
E	32.12 Prote	einanalytik	32
	B2.12.1	Isolierung von Gesamt-Protein aus pflanzlichen Gewebe	32
	B2.12.2	Isolierung und Analyse nativer Kernproteinextrakte	32
	B2.12.3	Bestimmung der Gesamt-Proteinkonzentration	33
	B2.12.4	Bestimmung der Gesamt-Proteinkonzentration mit dem BCA™ Protei	n
		Assay Kit	33
	B2.12.5	Coomassie-Färbung von Proteingelen	34
	B2.12.6	Quantifizierung des Pat-Gehaltes mit dem Pat-ELISA	34
	B2.12.7	Nachweis der Pat-Enzymaktivität	34
	B2.12.8	In vivo Luciferasetest von ganzen Pflanzen, Blättern und Bakterien	35
	B2.12.9	Nachweis der Luciferase-Aktivität mit dem Luciferase Assay System.	35
С	Ergebnis	SSe	36
C1	Untersuc	hung des Einflusses spezifischer Kombinationen regulatorischer Sequ	enzen
	aus dem	pat41-Gen auf die Transgenexpression während eines moderaten	
	Hitzestre	sses	36
(C1.1 Klon	ierung des <i>pat</i> 47- und <i>pat</i> 48-Gens	37
	C1.1.1	Klonierung des binären Transformationsvektors pTLpat47	37
	C1.1.2	Klonierung des binären Transformationsvektors pTLpat48	39
(C1.2 Nach	nweis der <i>pat</i> -Gene und ihrer Expression <i>in planta</i>	40
	C1.2.1	Stabile Integration des pat47- und pat48-Gens in Nicotiana tabacum.	40
	C1.2.2	Inkubation der Tabakpflanzen unter erhöhten Temperaturbedingunge	n 44
	C1.2.3	Nachweis des Pat-Proteins und Bestimmung der Phosphinothricin-N-	
		Acetyltransferase Aktivität in den transgenen Pflanzen	45
	C1.2.4	Quantifizierung des Pat-Proteins in ausgewählten Linien	48
	C1.2.5	Etablierung einer effizienten Methode für die Quantifizierung der patS	i-
		mRNA	49
	C1.2.6	Bestimmung der Kopienzahl der pat-Gene in ausgewählten Linien	54
C2	Nachwei	s einer Hitze-induzierten DNA-Protein Interaktion	54
02	22.1 Klon	ierung einer snezifischen Sonde für den EMSA	55
(2.1 1001 22.2 Isola	tion nativer Kernproteinevtrakte	55
(22.2 1301a	hitt-Analysen mit der 5' LITR41 und dem as-1 Element	58
	52.0 0013		
C3	Untersuc	hung des Einflusses regulatorischen Regionen des pat41-Gens auf die	•
	Expressi	on der Luciferase während eines moderaten Hitzestresses	59
(C3.1 Klon	ierung des binären Transformationsvektors pLuc43	60
	C3.1.1	Qualitativer Nachweis der Luciferase-Aktivität in Bakterien	61
(C3.2 Nach	hweis des <i>luc</i> 43-Gens und deren Expression <i>in planta</i>	62
	C3.2.1	Stabile Integration des <i>luc</i> 43-Gens in <i>N. tabacum</i>	62
	C3.2.2	Qualitativer Nachweis der Luciferase-Aktivität in transgenen Tabakpfl	anzen
			65
	C3.2.3	Qualitativer Nachweis der Luciferase-Aktivität nach einen moderatem	
		Hitzestress	67
C4	Untersuc	hung des Einflusses der 5´ UTR41 und des 3´ nos auf die Pat Express	sion
	während	eines moderaten Hitzestresses in Arabidosis thaliana	70

C4.1 Übertragung der pat-Gene in A. tumefaciens GV3101 (pMP90)70

	C	 4.2 Nachweis der <i>pat</i>-Gene und ihrer Expression <i>in planta</i> C4.2.1 Stabile Integration der <i>pat</i>-Gene in <i>A. thaliana</i> C4.2.2 Inkubation der Arabidopsis Pflanzen unter erhöhten 	71 71
		C4.2.3 Nachweis des Pat-Proteins und Bestimmung der Phosphinothricin- <i>N</i> - Acetyltransferase Aktivität in transgenen Arabidopsis Pflanzen nach dem moderatem Hitzestress.	72 75
D		Diskussion	77
	D1	Erzeugung transgener Pflanzen durch die Integration der Phosphinothricin-N-	
		Acetyltransferase und der Luciferase	77
	D2	Die Grundexpression des pat-Gens wird durch die Kombination der regulatorischer Elemente beeinflusst.	י 80
	D3	Die Hitze-induzierte Transgeninaktivierung wird durch den 5´ UTR41 und den 3´ no reguliert.	s 82
	D D	 Die Hitze-induzierte Transgeninaktivierung in Tabak ist unabhängig von der Kopienzahl, dem spezifischen Transkritplevel und der Grundexpression Welcher Mechanismus ist für die Hitze-induzierte Reduktion des transgenen Protein steady state Levels verantwortlich? 	88 89
	D4	Welche Konsequenzen hat ein Hitze-induzierter Verlust Transgen-kodierter Genprodukte für den Einsatz gentechnisch veränderter Pflanzen in der Landwirtsch und Grundlagenforschung?	naft 93
F		Literaturverzeichnis	05
			90
F		Anhang1	95
F	F1	Anhang	95 14 14
F	F1 F2	Anhang 1 Abkürzungsverzeichnis 1 Abbildungsverzeichnis 1	95 14 14
F	F1 F2 F3	Anhang 1 Abkürzungsverzeichnis 1 Abbildungsverzeichnis 1 Tabellenverzeichnis 1	95 14 14 17 17
F	F1 F2 F3 F4	Anhang 1 Abkürzungsverzeichnis 1 Abbildungsverzeichnis 1 Tabellenverzeichnis 1 Sequenzen und Sequenzvergleiche 1	95 1 4 17 17 19
F	F1 F2 F3 F4 F4	Anhang 1 Abkürzungsverzeichnis 1 Abbildungsverzeichnis 1 Tabellenverzeichnis 1 Sequenzen und Sequenzvergleiche 1 4.1 Sequenzen und Sequenzvergleich des CaMV823 und CaMV534 1	93 14 <i>14 17 19 20</i> 20
F	F1 F2 F3 F4 F4	Anhang 1 Abkürzungsverzeichnis 1 Abbildungsverzeichnis 1 Tabellenverzeichnis 1 Sequenzen und Sequenzvergleiche 1 4.1 Sequenzen und Sequenzvergleich des CaMV823 und CaMV534 1 4.2 Sequenzen und Sequenzvergleich der patS- und pat41-Kodierregion 1	93 1 14 117 117 119 120 20 20
F	F1 F2 F3 F4 F4 F4	Anhang 1 Abkürzungsverzeichnis 1 Abbildungsverzeichnis 1 Tabellenverzeichnis 1 Tabellenverzeichnis 1 Sequenzen und Sequenzvergleiche 1 4.1 Sequenzen und Sequenzvergleich des CaMV823 und CaMV534 1 4.2 Sequenzen und Sequenzvergleich der patS- und pat41-Kodierregion 1 4.3 Sequenzen und Sequenzvergleich der 3' UTRS, 3' UTR41 und t3' UTR41 1	93 14 <i>114</i> <i>117</i> <i>119</i> <i>20</i> <i>20</i> <i>21</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i>
F	F1 F2 F3 F4 F4 F4 F4 F5	Anhang 1 Abkürzungsverzeichnis 1 Abbildungsverzeichnis 1 Tabellenverzeichnis 1 Tabellenverzeichnis 1 Sequenzen und Sequenzvergleiche 1 4.1 Sequenzen und Sequenzvergleich des CaMV823 und CaMV534 1 4.2 Sequenzen und Sequenzvergleich der patS- und pat41-Kodierregion 1 4.3 Sequenzen und Sequenzvergleich der 3' UTRS, 3' UTR41 und t3' UTR41 1 Sequenzierungen 1 5.1 Sequenzierung des pat47-Konstruktes 1	14 14 17 17 20 20 20 21 22 22 23
F	F1 F2 F3 F4 F4 F4 F4 F4 F4 F5 F5	Anhang 1 Abkürzungsverzeichnis 1 Abbildungsverzeichnis 1 Tabellenverzeichnis 1 Tabellenverzeichnis 1 Sequenzen und Sequenzvergleiche 1 4.1 Sequenzen und Sequenzvergleich des CaMV823 und CaMV534 1 4.2 Sequenzen und Sequenzvergleich der patS- und pat41-Kodierregion 1 4.3 Sequenzen und Sequenzvergleich der 3´ UTRS, 3´ UTR41 und t3´ UTR41 1 5.1 Sequenzierungen 1 5.2 Sequenzierung des pat47-Konstruktes 1 5.2 Sequenzierung des pat48-Konstruktes 1	93 14 <i>14</i> <i>17</i> <i>19</i> <i>20</i> <i>20</i> <i>21</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>22</i> <i>23</i> <i>24</i>
F	F1 F2 F3 F4 F4 F4 F4 F5 F5 F5 F5	Anhang 1 Abkürzungsverzeichnis 1 Abbildungsverzeichnis 1 Tabellenverzeichnis 1 Sequenzen und Sequenzvergleiche 1 4.1 Sequenzen und Sequenzvergleich des CaMV823 und CaMV534 1 4.2 Sequenzen und Sequenzvergleich der patS- und pat41-Kodierregion 1 4.3 Sequenzen und Sequenzvergleich der 3´ UTRS, 3´ UTR41 und t3´ UTR41 1 <i>Sequenzierungen</i> 1 5.1 Sequenzierung des pat47-Konstruktes 1 5.2 Sequenzierung des pat48-Konstruktes 1 5.3 Sequenzierung des Subvektors pGEM-as1Bpil 1	93 14 <i>17</i> <i>19</i> <i>20</i> <i>20</i> <i>20</i> <i>21</i> <i>22</i> <i>23</i> <i>24</i> <i>25</i>
F	F1 F2 F3 F4 F4 F4 F4 F5 F5 F5 F5 F5	Anhang 1 Abkürzungsverzeichnis 1 Abbildungsverzeichnis 1 Tabellenverzeichnis 1 Tabellenverzeichnis 1 Sequenzen und Sequenzvergleiche 1 4.1 Sequenzen und Sequenzvergleich des CaMV823 und CaMV534 1 4.2 Sequenzen und Sequenzvergleich der patS- und pat41-Kodierregion 1 4.3 Sequenzen und Sequenzvergleich der 3´ UTRS, 3´ UTR41 und t3´ UTR41 1 Sequenzierungen 1 5.1 Sequenzierung des pat47-Konstruktes 1 5.2 Sequenzierung des pat48-Konstruktes 1 5.3 Sequenzierung des Subvektors pGEM-as1Bpil 1 5.4 Sequenzierung des Vektors pGEM-s5´ UTR41 1	14 14 17 19 20 21 22 23 23 24 25 26
F	F1 F2 F3 F4 F4 F4 F5 F5 F5 F5 F5 F5 F5	Anhang 1 Abkürzungsverzeichnis 1 Abbildungsverzeichnis 1 Tabellenverzeichnis 1 Tabellenverzeichnis 1 Sequenzen und Sequenzvergleiche 1 4.1 Sequenzen und Sequenzvergleich des CaMV823 und CaMV534 1 4.2 Sequenzen und Sequenzvergleich der patS- und pat41-Kodierregion 1 4.3 Sequenzen und Sequenzvergleich der 3' UTRS, 3' UTR41 und t3' UTR41 1 Sequenzierungen 1 5.1 Sequenzierung des pat47-Konstruktes 1 5.2 Sequenzierung des pat48-Konstruktes 1 5.3 Sequenzierung des Subvektors pGEM-as1Bpil 1 5.4 Sequenzierung des Vektors pGEM-s5' UTR41 1 Sekundärstrukturen 1 1	14 14 17 19 20 21 22 23 23 24 25 26 27
F	F1 F2 F3 F4 F4 F4 F4 F5 F5 F5 F5 F6 F6	Anhang 1 Abkürzungsverzeichnis 1 Abbildungsverzeichnis 1 Tabellenverzeichnis 1 Tabellenverzeichnis 1 Sequenzen und Sequenzvergleiche 1 4.1 Sequenzen und Sequenzvergleich des CaMV823 und CaMV534 1 4.2 Sequenzen und Sequenzvergleich der patS- und pat41-Kodierregion 1 4.3 Sequenzen und Sequenzvergleich der 3' UTRS, 3' UTR41 und t3' UTR41 1 Sequenzierungen 1 5.1 Sequenzierung des pat47-Konstruktes 1 5.2 Sequenzierung des pat48-Konstruktes 1 5.3 Sequenzierung des Subvektors pGEM-as1Bpil 1 5.4 Sequenzierung des Vektors pGEM-s5' UTR41 1 Sekundärstrukturen 1 1 6.1 DNA- und RNA-Sekundärstruktur der 5' UTR41 bei 24°C und 37°C 1 6.2 RNA-Sekundärstruktur der 5' UTR5 bei 24°C und 37°C 1	14 14 17 20 20 21 22 23 23 23 23 23 24 25 26 27 27 27
F	F1 F2 F3 F4 F4 F4 F4 F5 F5 F5 F5 F5 F6 F0 F0 F0	Anhang 1 Abkürzungsverzeichnis 1 Abbildungsverzeichnis 1 Tabellenverzeichnis 1 Tabellenverzeichnis 1 Sequenzen und Sequenzvergleiche 1 4.1 Sequenzen und Sequenzvergleich des CaMV823 und CaMV534 1 4.2 Sequenzen und Sequenzvergleich der patS- und pat41-Kodierregion 1 4.3 Sequenzen und Sequenzvergleich der 3' UTRS, 3' UTR41 und t3' UTR41 1 Sequenzierungen 1 1 5.1 Sequenzierung des pat47-Konstruktes 1 5.2 Sequenzierung des pat48-Konstruktes 1 5.3 Sequenzierung des Vektors pGEM-as1Bpil 1 5.4 Sequenzierung des Vektors pGEM-s5' UTR41 1 Sekundärstrukturen 1 1 6.1 DNA- und RNA-Sekundärstruktur der 5' UTR41 bei 24°C und 37°C 1 6.2 RNA-Sekundärstruktur der 5' UTRS bei 24°C und 37°C 1 6.2 RNA-Sekundärstruktur der 5' UTRS bei 24°C und 37°C 1	93 14 <i>14</i> <i>17</i> <i>19</i> <i>20</i> <i>21</i> <i>22</i> <i>23</i> <i>24</i> <i>25</i> <i>24</i> <i>25</i> <i>26</i> <i>27</i> <i>28</i> <i>28</i> <i>29</i>
F	F1 F2 F3 F4 F4 F4 F4 F4 F4 F5 F5 F5 F5 F6 F1 F1 F1 F1 F1 F4 F4 F4 F4 F4 F4 F4 F4 F4 F4 F4 F4 F4	Anhang 1 Abkürzungsverzeichnis 1 Abbildungsverzeichnis 1 Tabellenverzeichnis 1 Tabellenverzeichnis 1 Sequenzen und Sequenzvergleiche 1 4.1 Sequenzen und Sequenzvergleich des CaMV823 und CaMV534 1 4.2 Sequenzen und Sequenzvergleich der patS- und pat41-Kodierregion 1 4.3 Sequenzen und Sequenzvergleich der 3' UTRS, 3' UTR41 und t3' UTR41 1 Sequenzierungen 1 5.1 Sequenzierung des pat47-Konstruktes 1 5.2 Sequenzierung des pat48-Konstruktes 1 5.3 Sequenzierung des Vektors pGEM-as1Bpil 1 5.4 Sequenzierung des Vektors pGEM-s5' UTR41 1 Sekundärstrukturen 1 1 6.1 DNA- und RNA-Sekundärstruktur der 5' UTR41 bei 24°C und 37°C 1 6.2 RNA-Sekundärstruktur der 5' UTRS bei 24°C und 37°C 1 7 Regenerationsraten 1 7 Dappitometrische Restimmung relativer Transferintionseinheiten 1	93 14 <i>14</i> <i>17</i> <i>19</i> <i>20</i> <i>21</i> <i>22</i> <i>23</i> <i>24</i> <i>25</i> <i>26</i> <i>27</i> <i>27</i> <i>28</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>29</i> <i>39</i> <i>4</i> <i>29</i> <i>4</i> <i>29</i> <i>4</i> <i>4</i> <i>4</i> <i>4</i> <i>4</i> <i>4</i> <i>4</i> <i>4</i>
F	F1 F2 F3 F4 F4 F4 F4 F4 F4 F5 F5 F5 F5 F5 F6 F1 F6 F1 F1 F6 F1 F1 F2 F2 F4 F4 F4 F4 F4 F4 F4 F4 F4 F4 F4 F4 F4	Anhang 1 Abkürzungsverzeichnis 1 Abbildungsverzeichnis 1 Tabellenverzeichnis 1 Tabellenverzeichnis 1 Sequenzen und Sequenzvergleiche 1 4.1 Sequenzen und Sequenzvergleich des CaMV823 und CaMV534 1 4.2 Sequenzen und Sequenzvergleich der patS- und pat41-Kodierregion 1 4.3 Sequenzen und Sequenzvergleich der 3' UTRS, 3' UTR41 und t3' UTR41 1 Sequenzierungen 1 1 5.1 Sequenzierung des pat47-Konstruktes 1 5.2 Sequenzierung des pat48-Konstruktes 1 5.3 Sequenzierung des Vektors pGEM-as1Bpil 1 5.4 Sequenzierung des Vektors pGEM-s5' UTR41 1 Sekundärstrukturen 1 1 6.1 DNA- und RNA-Sekundärstruktur der 5' UTR41 bei 24°C und 37°C 1 6.2 RNA-Sekundärstruktur der 5' UTRS bei 24°C und 37°C 1 7 Regenerationsraten 1 7 Densitometrische Bestimmung relativer Transkriptionseinheiten 1 7 Regenerationsraten 1 7 Regenerationsr	14 14 17 19 20 21 22 23 24 25 26 27 27 27 28 29 32 32 32

F10 Luminometrische Bestimmung relativer Licht Einheiten	. 139
F11 Datenübersicht Molekulare Analyse und Proteinanalytik	143

Zusammenfassung

Die Regulation der Genexpression durch Promotoren, sowie durch untranslatierte Regionen und Terminatoren als Reaktion auf abiotische Stimulationen ist ausführlich bekannt (Floris M. et al. 2009). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kombination einer 5' untranslatierten Region (UTR) und einer Terminatorsequenz unabhängig vom Genprodukt und der Pflanzenspezies die Genexpression während eines moderaten Hitzestresses negativ beeinflussen.

Die Kombination der 5' UTR des Phosphinothricin-N-Acetyltransferase (Pat) Gens (pat41) aus dem Bodenbakterium Streptomyces viridochromogenes (5' UTR41) mit dem Terminationssignal des Nopalinsynthasegens aus A. tumefaciens (3' nos) oder die Kombination der 3' UTR41 mit dem 3' nos vermitteln während eines moderaten Hitzestresses in einigen Herbizid-resistenten Nicotiana (N.) tabacum Pflanzen eine signifikante Reduzierung des Transgen-kodierten Protein steady state Levels. Trotz dieses Verlusts an detoxifizierendem Enzym waren diese Linien weiterhin resistent gegenüber dem Herbizid. Es konnte gezeigt werden, dass der 5' UTR41 und der 3' nos aber nicht die 3' UTR41 oder die verwendeten Promotorvarianten für die Hitze-induzierte Transgeninaktivierung verantwortlich sind. Ein Einfluss der Kopienzahl, der Grundexpression des Transgens oder des spezifischen Transkriptlevels unter Hitze kann nach den vorliegenden Daten ausgeschlossen werden.

Die Kombination der 5' UTR41 und des 3' *nos* mit dem Kodierbereich des Luciferase-Gens (*luc*) führte zu ähnlichen Reaktionen. Während eines moderaten Hitzestresses kam es auch hier in transgenen Tabakpflanzen zu einer signifikanten Abnahme der Transgen-kodierten Enzymaktivität.

Durch die Integration des Phosphinothricin-*N*-Acetyltransferase in *Arabidospis* (A.) *thaliana* (Col-0) ist es gelungen, Herbizid-resistente Pflanzen zu erzeugen. Eine 10tägige Exposition bei 31°C induziert in den Pflanzen einen moderaten Hitzestress mit der Konsequenz einer verzögerten Entwicklung von Blütenständen und Schoten. Trotz der verzögerten Entwicklung waren die Samen keimfähig. Nach 10 Tagen Inkubation der Pflanzen bei 31°C führt die Kombination der 5′ UTR41 mit dem 3′ *nos* auch in den transgenen Arabidopsis Pflanzen zu einer Reduktion des Transgen-kodierten Protein-Gehaltes. Entgegen den Ergebnissen in *N. tabacum* kommt es nur in einem Teil der untersuchten Arabidopsis Linien zu einer Hitze-induzierten Reaktion, so dass sich die molekularen Mechanismen offensichtlich voneinander unterscheiden.

A Einleitung

Mit der Erzeugung transgener Pflanzen durch das Einbringen fremder, chimärer Gene (Transgene) wird in der kommerziellen Landwirtschaft im Wesentlichen die Verbesserung von Nutzpflanzen, z.B. durch die Einführung von Stresstoleranzen, ertragssteigernden Genprodukten, Schädlingsresistenzen oder auch Resistenzen gegenüber Herbiziden angestrebt (Busch U. et al. 2010, PHB; Park J. R. et al. 2011). Weiterhin können transgene Pflanzen eine alternative Produktionsstätte für rekombinante Proteine (Lau O. S. und Sun S. S. M. 2009, Rybicki E. P. 2010) oder zur Herstellung von biologisch abbaubaren Biopolymeren wie Polyhydroxybuttersäure (PHB; Scheller J. und Conrad U. 2005) oder Cyanophycin (Neumann K. et al. 2005, Hühns M. et al. 2008) darstellen. Auch die Nutzung von gentechnisch optimierten Pflanzen als Substrat für Biogasanlagen oder zur Produktion von Treibstoffen pflanzlicher Herkunft sind viel versprechende Anwendungsmöglichkeiten (Karp A. und Shield I. 2008). Neben dem kommerziellen Nutzen sind transgene Pflanzen ein wertvolles Werkzeug in der Grundlagenforschung. Mit deren Hilfe ist es unter anderem möglich die Regulation der Expression von Endogenen und Transgenen zu untersuchen, um diese hochkomplexen Abläufe besser verstehen zu können. Dabei nimmt die Aufklärung von spezifischen Regulationsprozessen unter suboptimalen Umweltbedingungen einen immer größeren Stellenwert ein.

A1 Die Regulation endogener pflanzlicher Gene

Die Expression endogener Gene in Pflanzen kann unter anderem von Substraten oder Produkten von Enzymreaktionen, von Phytohormonen oder Umweltfaktoren wie Lichtstärke, Schwermetallen, Verwundung, Pathogenbefall, Trockenstress, Salzstress, Hitze- oder Kältestress beeinflusst werden (zur Übersicht siehe Bresinsky A. 2008; Hirayama T. und Shinozaki K. 2010)

Mechanismen der Genregulation

Die Regulation der pflanzlichen Genexpression ist hoch komplex und findet auf transkriptionaler und posttranskriptionaler Ebene statt (zur Übersicht siehe Klug W. S. 2007; Campell N. A. 2009). Schon die Chromatinstruktur gibt vor ob verschiedene Transkriptionsfaktoren an spezifische Promotorsequenzen binden und somit die Transkription initiiert wird (Hayes J. J. und Wolffe A. P. 1992). Daneben gibt es noch weitere regulatorische DNA-Sequenzen mit der Bezeichnung Enhancer. Diese treten ebenfalls mit mehreren Proteinen und Transkriptionsfaktoren in Wechselwirkung, können dadurch den Promotor aktivieren und somit die Effizienz der Initiation der Transkription steigern (Antoniou

M. et al. 1988). Aber auch die so produzierten Primärtranskripte sind weiteren posttranskriptionalen Regulationsprozessen unterworfen: Prozessierung der mRNA (Cowling V. H. 2010), Spleißen (Simpson G. G. und Filipowicz W. 1996), Polyadenylierung (Hunt A. G. 2008) und auch der Transport durch die Kernmembran in das Cytoplasma (Kelly S. M. und Corbett A. H. 2009) sind weitere Angriffspunkte bei der Regulation der Genexpression. Sie beeinflussen hauptsächlich die Menge und Halbwertszeit der gebildeten mRNA und können stabilisierend oder auch destabilisierend Einfluss nehmen. Eine weitere Möglichkeit zur Regulation der Genexpression bietet die Translation, die dabei meist auf der Stufe der Initiation greift (Kawaguchi R. und Bailey-Serres J. 2002). Aber auch durch die Beeinflussung der Elongation und Termination der Translation kann die Genexpression reguliert werden (Browning K. S. 1996). Eine letzte Möglichkeit zur Einflussnahme auf die Genexpression ergibt sich nach der Translation, da viele eukaryotische Polypeptide verändert werden müssen, bevor ein Protein seine Funktion ausüben kann: proteolytische Spaltung von Vorläufermolekülen (Matsubayashi Y. 2011), Aktivierung durch chemische Modifikationen und Glykosylierung (Ytterberg A. J. und Jensen O. N. 2010) oder auch der Transport eines Proteins zur Wirkungsstätte. Regulationsmechanismen können auf jeder Stufe der Modifikation oder des Transports eines Proteins auftreten. Schließlich kann auch noch die Proteinstabilität durch selektiven Abbau beeinflusst werden, was sich auf die Zeitspanne auswirkt, in der ein bestimmtes Protein in der Zelle seine Funktion ausüben kann (Smalle J. und Vierstra R. D. 2004).

Posttranskriptionale Regulation der Genexpression über die untranslatierten Regionen

Während die Promotorregion und der Terminator die Transkription eines Gens regulieren, beeinflussen die 5' und 3' untranslatierte Region (5', 3' UTR) die Stabilität und die Translationseffizienz des reifen RNA-Transkripts. So können strukturelle Eigenschaften der 5' UTR auf die Initiation der Translation positiv oder negativ Einfluss nehmen. Die 7-Metyhlguanosin-Kappe am 5' terminalen Ende schützt das Transkript vor dem 5'-3' exonukleolytischen Abbau (Furuichi Y. et al. 1977) und stimuliert deren Translation (Shatkin A. J. 1976). Weiterhin nehmen auch die Sequenz-Umgebung des Translationsstartcodons (Kozak M. 1986) und die Länge der 5' UTR (Kozak M. 1991a, Kozak M. 1991b) einen positiven Einfluss auf die Translation eines Transkripts. Dagegen können spezifische Sequenzelemente, wie die so genannten 'upstream' Startcodons (uAUG; Kozak M. 1989b) und 'upstream open reading frames' (uORF; Meijer H. A. und Thomas A. A. M. 2002) oder auch Sekundärstrukturen, abhängig von ihrer Stabilität und Position in der 5' UTR (Kozak M. 1989a), die Translation eines Transkripts inhibieren. Weiterhin sind in der 5' UTR

3

pflanzlicher Transkripte spezifische Sequenzmotive - 'miRNA-responsive elements' (MREs) - zu finden (Fujii H. et al. 2005, Lu S. F. et al. 2005 Chiou T. J. et al. 2006, Sunkar R. et al. 2007). An die MREs können Sequenz-spezifisch microRNAs (miRNA) binden, die die Expression des Trankripts entweder auf transkriptionaler Ebene ('transcriptional gene silencing', TGS) durch die Inhibierung der Trankriptionsinitiation aufgrund der Methylierung von Cytosinresten in der Promotorregion (Marenkova T. V. und Deineko E. V. 2010, Charon C. et al. 2010) oder auf posttranskriptionaler Ebene ('posttranscriptional gene silencing', PTGS) über den Abbau der mRNA oder Inhibierung der Translation (Chen X. M. 2009, Charon C. et al. 2010) beeinflussen.

In der 3' UTR pflanzlicher RNA-Transkripte können Sequenzmotive vorhanden sein, die das Transkript destabilisieren. AU-reiche Sequenzmotive (AREs) sind die am besten charakterisierten Elemente und beeinflussen die Transkript-Stabilität über die Interaktion mit regulatorischen Proteinen (Ohme-Takagi M. et al. 1993, De Rocher E. J. et al. 1998). Ein weiteres destabilisierendes Sequenzmotiv im 3' UTR pflanzlicher RNA-Transkripte sind die so genannten 'Downstream' (DST) Elemente (Feldbrugge M. et al. 2002). Weiterhin sind auch im 3' UTR pflanzlicher RNA-Transkripte MREs vorhanden (Rhoades M. W. et al. 2002, Sunkar R. und Zhu J. K. 2004) und können somit über die Sequenz-spezifische Bindung von miRNAs in ihrer Expression beeinflusst werden (s. o.).

A2 Expression von Fremdgenen in transgenen Pflanzen

Grundsätzlich unterliegt auch die Expression von Transgenen den in Kapitel A1 beschriebenen endogenen, regulatorischen Mechanismen. Daneben wird eine Vielzahl weiterer Faktoren beschrieben, die die Stabilität der Transgenexpression beeinflussen können. Dazu gehören (i) die Chromatinstruktur und regulatorische Sequenzen in räumlicher Nähe zum Integrationsort der T-DNA (Prols F. und Meyer P. 1992, Iglesias V. A. et al. 1997), (ii) somaklonale Variationen, die unabhängig vom Integrationsort sind und häufig nach Gewebekultur zu Sekundärmutationen führen können (Larkin P. J. und Scowcroft W. R. 1981, Dean C. et al. 1988, Marton L. et al. 1994), (iii) die Struktur der integrierten T-DNA (Jones J. D. G. et al. 1987, Finnegan J. und Mcelroy D. 1994), (iv) die Kopienzahl des Transgens (Co-Suppression) und (v) epigenetische Effekte (TGS uns PTGS).

Einfluss von Umweltfaktoren auf die Stabilität der Transgenexpression

Besonders bei dem Einsatz in der Landwirtschaft unter den verschiedensten, oftmals auch suboptimalen Umweltfaktoren ist es aber dringend erforderlich eine stabile Expression der transgenen Eigenschaft in den Pflanzen zu gewährleisten. Im Folgenden werden Beispiele aufgezählt die jedoch zeigen, dass auch veränderte Umweltbedingungen die Transgen-Stabilität negativ beeinflussen können.

Erstmalig wurde die Inaktivierung von Endogenen und Fremdgenen durch Co-Suppression in transgenen Petunia hybrida Pflanzen beschrieben (Napoli C. et al. 1990). Die Autoren zählten neben endogenen Faktoren auch erhöhte Lichtintensitäten als eine mögliche Ursache auf. In einer anderen Arbeit wurde die Freisetzung transgener Petunien beschrieben, in deren Genom eine Kopie des A1-Gens aus Mais integriert war (Meyer P. et al. 1992). Während der Kultivierungsperiode im Freiland kam es nach einer erhöhten Starklichtperiode und Temperaturen bis 36°C in 60% der Pflanzen zu einer Inaktivierung des Transgens. Jedoch zeigten Kontrollpflanzen im Gewächshaus trotz Temperaturen bis 48°C eine weit geringere Inaktivierungsrate von etwa 5%. Diese Transgeninaktivierung war somit nicht nur mit der erhöhten Temperatur, sondern vermutlich mit weiteren im Freiland herrschenden Bedingungen verbunden. Verantwortlich für die Inaktivierung war die inhibierte Transkription des Transgens, verursacht durch die Hypermethylierung des genutzten Promotorfragmentes. Im gleichen Jahr konnte die Inaktivierung einer Herbizid-Resistenz in Suspensionskulturen von Medicago sativa beobachtet werden, die eindeutig auf die Erhöhung der Umgebungstemperatur zurückzuführen war (Walter C. et al. 1992). Eine zehntägige Hitzebehandlung bei 37°C führte in 95% der Zellen zu einem Verlust der Herbizid-Resistenz. Auch hier war nur eine Kopie des Transgens in der Pflanze vorhanden. In einem weiteren Fall wurde eine Hitze-induzierte Transgeninaktivierung in ganzen Tabakpflanzen (*N. tabacum*) mit dem Luciferase Gen (*luc*) aus *Photinus pyralis* beschrieben (Neumann K. et al. 1997). Eine zehntägige Hitzebehandlung bei 37°C führte unabhängig von dem verwendeten Promotorfragment und der Orientierung des luc-Gens in durchschnittlich 40% der untersuchten Linien zu einer Reduzierung der Luciferase-Aktivität. Weiterhin zeigten 47% der Linien eine Hitze-sensitive Kanamycin-Resistenz. Ein Einfluss der Kopienzahl oder des homo- bzw.- hemizygoten Vorliegens der Transgene in der Pflanze war in keinem Fall nachweisbar, ebenso wenig wie eine Veränderung des Methylierungsgrades der DNA. In zwei weiteren Arbeiten wurde die Inaktivierung der Nitratreduktase (nir) und der Neomycin Phosphotransferase (nptll) in transgenen Tabakpflanzen aufgrund erhöhter Kultivierungstemperaturen postuliert (Palauqui J. C. und Vaucheret H. 1995, Conner A. J. et al. 1998). In einem anderen Fall wurde die Inaktivierung des Aleuron-spezifischen Ltp2-gus Gens in Oryza sativa beschrieben (Morino K. et al. 1999). Verglichen mit der Kultivierung bei 19-25°C, war die Anzahl der Samen ohne bzw. mit einer reduzierten GUS-Färbung des Endosperms von Pflanzen, die bei 25-33°C kultiviert wurden, deutlich erhöht. Meza et al. (2001) beschrieben eine Hitze-induzierte Inaktivierung des nptll-Gens in A. thaliana. In den Nachkommen einiger unabhängiger Linien war die Frequenz der Transgeninaktivierung durch eine Anhebung der Kultivierungstemperatur auf 30°C deutlich erhöht. Erst kürzlich

5

konnte bei der Freisetzung von Kartoffelpflanzen (*Solanum tuberosum*) mit dem Hüllprotein (VP60) des 'Rabbit Haemorrhagic Disease Virus' (RHDV) eine Hitze-induzierte Inaktivierung des Transgens beobachtet werden (Mikschofsky H. et al. 2011). Während der Kultivierungsperiode im Freiland konnte in einer Linie nach einer langen und intensiven Hitze-Periode eine deutliche Abnahme des VP60 Protein-Gehaltes beobachtet werden.

A3 Untersuchung der Hitze-induzierten Transgeninaktivierung in Herbizidresistenten Tabakpflanzen

Die Beispiele angeführten unterstreichen die Notwendigkeit diese komplexen, stressinduzierten Abläufe der Genexpression in der Pflanze zu verstehen, um zum Beispiel bedeutende Nutzpflanzen landwirtschaftlich an die sich stetig erhöhenden Durchschnittstemperaturen anpassen zu können (IPCC 2007). Mit Hilfe transgener Tabakpflanzen (N. tabacum), die eine Resistenz gegenüber dem phytotoxischen Wirkstoff Phosphinothricin aufweisen, wurden erste Analysen gemacht, um die Regulation der Genexpression während eines moderaten Hitzestresses zu untersuchen (Köhne S. et al. 1998).

Die Wirkung von Phosphinothricin

Glufosinat ist der phytotoxische Bestandteil von kommerziell erhältlichen Breitbandherbiziden wie Basta[®] und Liberty[®]. Als Glufosinat wird das Racemat aus D- und L-Phosphinothricin (Pt) bezeichnet, von dem jedoch nur das L-Enantiomer die herbizide Wirkung besitzt. Die Aufnahme erfolgt hauptsächliche über die grünen Pflanzenteile und führt nach einer Wirkzeit von zwei bis fünf Tagen zunächst zu braunen, klar abgegrenzten, pergamentartigen Nekrosen, anschließend setzen Welke- und Absterbeerscheinungen der ganzen Pflanze ein. Der Angriffspunkt von Pt ist die Glutaminsynthetase, ein zentrales Enzym des zellulären Stickstoffhaushaltes (Shapiro B. M. und Stadtman E. R. 1970). Pt wird als Strukturanalogon von Glutamat an dessen Stelle am aktiven Zentrum des Enzyms gebunden und phosphoryliert. Dadurch wird der tetraedische Übergangszustand vorgetäuscht und die Übertragung des Ammoniumions auf die Phosphinicogruppe verhindert; das Enzym wird kompetitiv gehemmt (Logusch E. W. et al. 1991, Abell L. M. und Villafranca J. J. 1991). Die Inhibierung der Glutaminsynthetase führt in der Pflanze zu einer schnellen Akkumulation toxischer Ammoniumionen, damit zu Schädigungen in der Chloroplastenmembran und auch ein Zusammenbruch der photosynthetischen Aktivität wird diskutiert (Wendler C. et al. 1990, Coetzer E. et al. 2001).

Die Erzeugung Phosphinothricin-resistenter Pflanzen

Durch die Erzeugung Pt-resistenter Pflanzen sollte ein gezielter Einsatz und ein größeres Anwendungsspektrum für Glufosinat-haltige Breitbandherbizide in der Landwirtschaft erreicht werden. Die Analyse des Biosyntheseweges des Phosphinothricintripeptids in Streptomyces (S.) hygroscopicus und S. viridochromogenes ermöglichte die Identifizierung einer Acetyltransferase, die den Bakterien über die Acetylierung einer Phosphinothricintripeptid-Vorstufe einen wirksamen Schutz gegen die antibiotische Wirkung der verschiedenen Zwischenprodukte verleiht. Das Substrat Pt wird durch die Acetyltransferase in einer Acetyl-CoA-abhängigen Reaktion an der α -Aminogruppe acetyliert, weshalb das Enzym die Bezeichnung Phosphinothricin-N-Acetyltransferase (Pat) trägt. Die für die Acetyltransferase kodierenden Gene konnten aus S. hygroscopicus (bar für 'bialaphos resistance gene') und aus S. viridochromogenes (pat für Phosphinothricin-N-Acetyltransferase) isoliert werden (Thompson C. J. et al. 1987, Strauch E. et al. 1988). Die beiden 183 Aminosäuren langen Polypeptide zeigen eine Identität von 85% (Wohlleben W. et al. 1988) und sind sich bezüglich ihrer strukturellen und funktionellen Charakteristiken sehr ähnlich (Wehrmann A. et al. 1996). Mit Hilfe dieser Resistenzgene sind eine Reihe Pt-resistenter Kulturpflanzen, wie Raps, Mais, Radicchio und Sojabohne entwickelt worden. Neben dem kommerziellen Nutzen, wird System auch zur Selektion dieses und Untersuchung von Regulationsmechanismen in der pflanzlichen Grundlagenforschung eingesetzt.

Auswirkung eines moderaten Hitzestresses auf die Expression der Phosphinothricin-N-Acetyltransferase in Nicotiana tabacum

Ausgehend vom bakteriellen Kodierbereich des *pat*-Gens wurden zwei Wege für die Erzeugung Pt-resistenter Tabakpflanzen eingeschlagen. Eine Fusion mit Pflanzenspezifischen Transkriptions- und Translationssignalen ermöglichte die erfolgreiche Expression des so modifizierten *pat*41-Gens in *N. tabacum* (Wohlleben W. et al. 1988, Broer I. 1989). Im *pat*41-Konstrukt (Abb. A1) ist der bakterielle Kodierbereich aus *S. viridochromogenes* (*pat*) mit synthetischen 5' und 3' untranslatierten Regionen (5', 3' UTR41) verbunden. Reguliert wird die Expression durch das konstitutiv exprimierende, 823 bp lange Promotorfragment des Cauliflower-Mosaikvirus 35S-RNA Gens (CaMV₈₂₃; Bevan M. et al. 1983) und dem Terminationssignal des Nopalinsynthasegens aus *Agrobakterium* (*A.*) *tumefaciens* (3' *nos*; Dhaese P. et al. 1983). Durch die spezifische Acetylierung zu *N*-acetyl-phosphinothricin wird der herbizide Wirkstoff detoxifiziert, so dass die Pflanzen eine stark ausgeprägte Resistenz aufwiesen (Broer I. 1989). Um eine Anpassung des bakteriellen Resistenzgens an den pflanzlichen GC-Gehalt zu erreichen, wurde anhand der Aminosäuresequenz des bakteriellen *pat*-Gens ein synthetischer Kodierbereich unter Verwendung pflanzentypischer Codons konstruiert (*pat*S; Eckes P. et al. 1989) Der GC-Gehalt des *pat*S-Kodierbereiches ist mit 49% deutlich niedriger als der des *pat*41-Kodierbereiches mit 69%. Weiterhin ist der *pat*S-Kodierbereich mit anderen 5' und 3' untranslatierten Regionen (5', 3' UTRS; Eckes P. et al. 1989) fusioniert, den Terminator des CaMV-35S-RNA-Gens (3' *camv*; Eckes P. et al. 1989) und ein im 5' Bereich um 289 bp verkürztes CaMV-35S-RNA-Promotorfragment (CaMV₅₃₄). Der *pat*S-Kodierbereich dieses modifizierten *pat*OCA-Gens (Abb. A1) kodiert für die gleichen 183 Aminosäuren der Phosphinothricin-*N*-Acetyltransferase, wie das bakterielle *pat*-Gen und verleiht den exprimierenden Pflanzen ebenfalls eine Resistenz gegenüber Pt (Eckes P. et al. 1989).



Abbildung A1: Schematische Darstellung der untersuchten *pat*-Gene und deren Expression bei 24°C und nach einem 10tägigen moderaten Hitzestress.

In transgenen Tabakpflanzen mit dem *pat*41-Gen führte eine 10tägige Kultivierung bei 37°C zu einem Verlust der Herbizid-Resistenz (Abb. A1; Köhne S. et al. 1998). Nach dem Hitzestress konnte in allen untersuchten Pflanzen weder das Pat-Protein noch eine spezifische Enzymaktivität detektiert werden, auch die *pat*41-mRNA war nicht nachzuweisen. Dagegen war die Expression des Pat-Proteins in Hitze-behandelten Tabakpflanzen mit dem synthetischen *pat*S-Gen sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene stabil (Abb. A1) und diese waren auch weiterhin resistent gegenüber BASTA[®] (Köhne S. et al. 1998). Verglichen mit den isogenen Kontrollpflanzen bei den Standard-Kultivierungsbedingungen (24°C) nahm die spezifische Transkript- und Proteinmenge in den gestressten Pflanzen sogar zu (Abb. A1; Köhne S. et al. 1998). Die Temperatur-induzierte Instabilität der *pat*41-Expression

^{+,} Ausprägung der positiven Detektion; A, signifikante Abnahme; n.d., nicht detektiert; n. gt., nicht getestet

korrelierte nicht mit der Kopienzahl des Transgens und wurde auch nicht von Sequenzen auf der T-DNA beeinflusst. Ebenso konnte der Einfluss putativer regulatorischer Elemente am Integrationsort des Transgens im pflanzlichen Genom ausgeschlossen werden (Köhne S. et al. 1998). Diese Beobachtungen waren zu dem damaligen Zeitpunkt mit keinem bekannten pflanzlichen Regulationsmechanismen zu erklären und deuteten darauf hin, dass der Ausgangspunkt für den regulatorischen Mechanismus einzig und allein in der Sequenz des Transgens liegt.

Um die Elemente zu identifizieren, die unter 37°C eine instabile Expression der *pat*-Gene bewirken, wurde anschließend das *pat*43-Gen konstruiert, stabil in *N. tabacum* eingebracht und unter Hitzestress-Bedingungen analysiert (Köhne S. et al. 1998). Das *pat43*-Gen ist bis auf den Kodierbereich, der dem des *pat*OCA-Gens entspricht, und einem verkürzten 3' UTR41 (t3' UTR41) identisch mit dem *pat*41-Gen (Abb. A1). Der Austausch des GC-reichen *pat*41- Kodierbereiches gegen den des *pat*OCA-Gens, der einen intermediären GC-Gehalt aufweist, führte zwar auf RNA-Ebene zu einer Stabilisierung der *pat*-Expression bei 37°C, der Pat-Protein-Gehalt und die spezifische Enzymaktivität waren jedoch ebenso wie beim *pat*41-Gen in keiner der untersuchten Linien nachzuweisen (Abb. A1). Zudem wiesen die gestressten Pflanzen einen sensitiven Phänotyp gegenüber Pt auf. Daraufhin wurde postuliert, dass die Hitze-induzierte Inaktivierung der *pat*-Expression durch die die Kodierregion umgebenden regulatorischen Sequenzen des *pat*41-Gens beeinflusst wird und posttranskriptional ausgeprägt sein muss. (Köhne S. et al. 1998).

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden anschließend das *pat*44-, *pat*45- und *pat*46-Gen konstruiert, die alle den synthetischen Kodierbereich besitzen, sich aber in den umgebenden Elementen unterscheiden (Abb. A1). Ausgehend vom *pat*OCA-Gen waren im *pat*44-, *pat*45- und *pat*46-Gen der 5' UTRS, 3' UTRS oder 3' *camv* gegen den 5' UTR41, 3' UTR41 bzw. 3' *nos* substituiert (Kerbach S. 1999, Walter S. 2001). Im Gegensatz zu den Tabakpflanzen mit dem *pat*41- und *pat*43-Gen, kam es nur in einem Teil der Hitzegestressten Linien mit dem *pat*44- (Kerbach S. 1999), *pat*45- (Walter S. 2001) und *pat*46-Gen (unv. Ergebnisse) zu einer Inaktivierung des Transgens (Abb. A1). Diese war auch geringer ausgeprägt, da sowohl das Pat-Protein als auch die spezifische Enzymaktivität noch nachweisbar waren, wenn auch deutlich geringer verglichen mit den isogenen Linien bei den Standard-Kultivierungsbedingungen. Die gestressten Linien waren auch alle unbeeinträchtigt in ihrer Pt-Resistenz.

Zusammenfassend konnte in den bisherigen Untersuchungen beobachtet werden, dass die Anwesenheit der 5' UTR und des 3' Terminationssignals des *pat*41-Gens während eines moderaten Hitzestresses in allen untersuchten Linien zu einer Inaktivierung des Transgens auf Protein-Ebene, gekoppelt mit dem Verlust des Herbizid-Resistenz führen. Dagegen kommt es in nur in einigen der gestressten transgenen Pflanzen die entweder den 5' UTR41,

9

3' UTR41 oder den 3' *nos* besitzen zu einer Reduzierung des Pat steady state Levels. Diese Pflanzen waren auch weiterhin resistent gegenüber dem Herbizid.

A4 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es deshalb zu untersuchen, ob die oben genannten regulatorischen Elemente des *pat*41-Gens nur in Kombination zu der Hitze-induzierten Inaktivierung des *pat*-Gens führen, auf welcher Ebene diese vollzogen wird und welcher regulatorische Mechanismus ihr zugrunde liegt. Weiterhin soll untersucht werden, ob die Hitze-induzierte Inaktivierung unabhängig vom Genprodukt ist und auch in anderen Pflanzenspezies auftritt. Mit dieser Arbeit soll das Verständnis über die Regulation von Endogenen und Transgenen in der Pflanze während der Anpassung an erhöhte Temperaturen verbessert werden.

B Material und Methoden

B1 Material

B1.1 Verwendete Gene, Plasmide und Bakterienstämme

B1.1.1 Plasmide

Bezeichnung	Eigenschaften	Herkunft
pLH9000	Sm ^r /Sp ^r , Km ^r CaMV- <i>npt</i> II-3 <i>´camv</i>	(Hausmann L. und Töpfer R. 1999)
pROK1	lc, Km ^r CaMV-3´ <i>nos</i>	(Baulcombe D. C. et al. 1986)
pSK16.43	pROK1-Derivat, Km ^r CaMV-5´UTR41- <i>pat</i> S-t3´UTR41-3´ <i>nos</i>	(Köhne S. et al. 1998)
pIB16.41	pROK1-Derivat, Km ^r CaMV-5´UTR41- <i>pat</i> 41-3´UTR41-3´ <i>nos</i>	(Broer I. 1989)
pLH44	Sm ^r /Sp ^r , Km ^r CaMV-5´UTR41 <i>-pat</i> S-3´UTRS-3´ <i>camv</i>	(Kerbach S. 1999)
pDH45	Amp ^r CaMV-5´UTRS- <i>pat</i> S-3´UTR41-3´ camv	(Walter S. 2001)
pDH46	Amp ^r CaMV-5´UTRS- <i>pat</i> S-3´UTRS-3´ nos	(Walter S. 2001)
pDH48	Amp ^r CaMV-5´UTRS- <i>pat</i> S-3´UTR41-3´ nos	diese Arbeit
pTLpat47	Sm ^r /Sp ^r , Km ^r CaMV-5´UTR41- <i>pat</i> S-3´UTR41-3´ <i>camv</i>	diese Arbeit
pTLpat48	Sm ^r /Sp ^r , Km ^r CaMV-5´UTRS- <i>pat</i> S-3´UTR41-3´ <i>nos</i>	diese Arbeit
p57as1Bpil	pUC18-Derivat, Amp ^r <i>Bpil-as-1-Bpi</i> l	(Kegler C. 2001)
pGEM-as1Bpil	pGEM®-T Easy-Derivat, Amp ^r <i>Bpil-as-1-Bpi</i> l	diese Arbeit
pGEM-s5´ UTR41	pGEM®-T Easy-Derivat, Amp ^r <i>Bpi</i> I-s5´ UTR41 <i>-Bpi</i> I	diese Arbeit
pDO432	pUC-derivat, Amp ^r CaMV- <i>luc-3´ nos</i>	(Ow D. W. et al. 1986)
pGEM-LucSall	pGEM®-T Easy-Derivat, Amp ^r Sall-Iuc-SalI	diese Arbeit
pAQ2	pBIN19-Derivat, Km ^r CaMV- <i>luc</i> -3´ <i>nos</i>	(Quandt H-J. 1989)
pLuc43	pROK1-Derivat, Km ^r CaMV-5´UTR41- <i>luc</i> -t3´UTR41-3´ <i>nos</i>	diese Arbeit

B1.1.2 Bakterienstämme

Stamm	Eigenschaften	Herkunft
Escherichia coli TG1	lacZ ⁻ , keine Ausbildung von F-Pili, kein Wachstum auf Minimalmedium	Sambrock et al. 1989
TG1/LH9000	TG1, pLH9000	diese Arbeit
TG1/ROK1	TG1, pROK1	(Baulcombe, D. C. et al. 1986)
TG1/SK16.43	TG1, pSK16.43	(Köhne S. et al. 1998)
TG1/IB16.41	TG1, pIB16.41	(Broer I. 1989)
TG1/LH44	TG1, pLH44	(Kerbach S. 1999)
TG1/DH45	TG1, pDH45	(Walter S. 2001)
TG1/DH46	TG1, pDH46	(Walter S. 2001)

TG1/DH48	TG1, pDH48	diese Arbeit
TG1/TLpat47	TG1, pTLpat47	diese Arbeit
TG1/TLpat48	TG1, pTLpat48	diese Arbeit
TG1/57as1Bpil	TG1, p57as1Bpil	diese Arbeit
TG1/GEM-as1Bpil	TG1, pGEM-as1Bpil	diese Arbeit
TG1/GEM-s5' UTR41	TG1, pGEM-s5´ UTR41	diese Arbeit
TG1/DO432	TG1, pDO432	diese Arbeit
TG1/GEM-LucSall	TG1, pGEM-LucSall	diese Arbeit
TG1/AQ2	TG1, pAQ2	(Quandt H-J. 1989)
TG1/Luc43	TG1, pLuc43	diese Arbeit

Tabelle B3: Bezeichnung, Eigenschaften und Herkunft der verwendeten A. tumefaciens - Stämme

Stamm	Eigenschaften	Herkunft
A. tumefaciens LBA4404	vir⁺, T-DNA, Sm ^r	(Hoekema, A. et al. 1983)
LBA4404/LH9000	LBA4404, pLH9000	diese Arbeit
LBA4404/ROK1	LBA4404, pROK1	diese Arbeit
LBA4404/SK16.43	LBA4404, pSK16.43	(Köhne S. et al. 1998)
LBA4404/TLpat47	LBA4404, pTLpat47	diese Arbeit
LBA4404/TLpat48	LBA4404, pTLpat48	diese Arbeit
LBA4404/AQ2	LBA4404, pAQ2	diese Arbeit
LBA4404/Luc43	LBA4404, pLuc43	diese Arbeit
A. tumefaciens GV3101 (pMP90)	pMP90 Helferplasmid, Gem ^r	(Koncz C. und Schell J. 1986)
GV3101(pMP90)/IB16.41	LBA4404, pIB16.41	diese Arbeit
GV3101(pMP90)/SK16.43	LBA4404, pSK16.43	diese Arbeit

B1.1.3 Verwendete Pflanzenspezies und erzeugte transgene Pflanzen

niV	N. tabacum Petit Havanna SR1	(Maliga O. P. et al. 1973)
SRI/9000	N. tabacum transformiert durch LBA4404/LH9000	diese Arbeit
SRI/ROK1	N. tabacum transformiert durch LBA4404/ROK1	diese Arbeit
SRI/43	N. tabacum transformiert durch LBA4404/SK16.43	(Köhne S. et al 1998)
SRI/47	N. tabacum transformiert durch LBA4404/TLpat47	diese Arbeit
SRI/48	N. tabacum transformiert durch LBA4404/TLpat48	diese Arbeit
SRI/AQ2	N. tabacum transformiert durch LBA4404/AQ2	diese Arbeit
SRI/Luc43	N. tabacum transformiert durch LBA4404/Luc43	diese Arbeit
Col-0/wt	A. thaliana Columbia-0	
Col-0/41	A. thaliana transformiert durch GV3101 (pMP90)/IB16.4	41 diese Arbeit
Col-0/43	A. thaliana transformiert durch GV3101 (pMP90)/SK16	.43 diese Arbeit

B1.2 Medien

B1.2.1 Bakterienmedien

LB (Luberia Broth) Medium (Miller J. H. 1972):

1% (w/v) Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 85 mM NaCl; pH 7,1

Y-Medium (Herstellung kompetenter Zellen):

2,5% (w/v) Tryptophan (oder Pepton); 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 0,2 mM MgSO₄; 10 mM KCl; pH 7,0

Alle Medien wurden, wenn nicht anders angegeben, nach dem Mischen autoklaviert. Festmedien wurde 1,2% (w/v) Agar zugesetzt.

B1.2.2 Pflanzenmedien

Nicotiana tabacum

LS-Medium (Linsemaier E. M. und Skoog F. 1965):

0,45% (w/v) LS-Medium (mit Vitaminen) (Duchefa, Fertigmischung); 88 mM Saccharose; 0,7% (w/v) Agar; pH 5,7 und autoklavieren

B5-Infektionsmedium:

0,32% (w/v) Gamborg B5-Medium (Duchefa; Fertigmischung); 3 M Ammoniumnitrat; 2,6 M MES; 88 mM Saccharose; pH 5,7 und autoklavieren

ACB-Medium:

0,45% (w/v) MS-Medium (Duchefa; Fertigmischung); 88 mM Saccharose; 0,7% (w/v) Agar; pH 5,7 und autoklavieren; direkt vor dem Gebrauch Zugabe von 2,6 M MES; 0,01% (w/v) B5-Vitamine; 0,0001% (w/v) 6-Benzylaminopurin 0,00001% (w/v) 1-Naphthylessigsäure als steril filtrierte Lösungen

Arabidospis thaliana

Infiltrationsmedium:

0,5% (w/v) Gamborg B5-Medium (Duchefa; Fertigmischung), 0,15 M Saccharose

B1.2.3 Antibiotika- und Herbizid Zusätze

Tabelle B4: Antibiotika-	- und Herbizid Zusätze zu	u Bakterien- und Pflanzenmedien

Antibiotikum	Konzentration der verwendeten Antibiotika in mg/L				
Antibiotikum	E. coli	A. tumefaciens	N. tabacum		
Ampicillin	100	-	-		
Gentamycin	-	20	-		
Spectinomycin	50	100	-		
Streptomycin	20	300	-		
Cefotaxim	-	-	500		
Kanamycin	100	100	100		
L-Phosphinothricin	-	-	10		

B1.3 Puffer und Lösungen

B1.3.1 Puffer und Lösungen für die Isolierung und Analyse von DNA

B1.3.1.1 Puffer und Lösur	ngen für die DNA Isolierung			
TE-Puffer	: 10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA und autoklavieren			
CTAB-Puffer (2x)	: 2% (w/v) CTAB; 1,4 M NaCl; 100 mM Tris/HCL; 20 mM			
	EDTA; pH 8,0 und steril filtrieren			
Lysepuffer	: 0,05 M NaOH; 0,25% (w/v) SDS			
Extraktionspuffer	: 100 mM Tris/HCl; 25 mM EDTA; 1,5 M NaCl; pH 8,0 und			
	autoklavieren; direkt vor dem Gebrauch Zugabe von 0,2%			
	(v/v) β - Mercaptoethanol und 1% (w/v)			
	Polyvenylpyrolidon			
Hoch-Salz TE	: 1 M NaCl; 10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0 und			
	autoklavieren			

B1.3.1.2 Puffer und Lösungen für die elektrophoretische Auftrennung von DNA

TB-Puffer	: 60 mM Tris/HCI; 80 mM Borsäure; 3 mM EDTA; pH 8,2
	und autoklavieren
TA-Puffer (50x)	: 40 mM Tris ; 10 mM Natriumacetat ; 2,5 mM EDTA ;
	pH 7,8 (Eisessig) und autoklavieren
Loading Dye (6x)	: 0,2% (w/v) Bromphenolblau; 0,2% (w/v) Xylencyanol;
	60% (v/v) Glycerin; 60 mM EDTA
Bromphenolblau (BPB)	: 50% (v/v) Glycerin; 50% (v/v) Elektrophoresepuffer;
	einige Körner Bromphenolblau

B1.3.2 Puffer und Lösungen für die Isolierung und Analyse von RNA

B1.3.2.1 Puffer und Lösur	ngen für die RNA Isolierung		
Z6-Puffer	: 8 M Guanidinhydrochlorid; 20 mM MES; 20 mM EDTA;		
	pH 7,0 und autoklavieren; direkt vor dem Gebrauch		
	Zugabe von 50 mM β-Mercaptoethanol		
Natriumacetat Puffer	: 3 M Natriumacetat; pH 5,2 (Essigsäure)		
Triazolpuffer	: 38% (v/v) Phenol (Sigma-Aldrich, P4682); 0,8 M		
	Guanidinthiocyanat; 0,4 M Ammoniumthiocyanat; 3,5% (v/v)		
	Natriumacetat Puffer; 5% (v/v) Glycerin		
Hoch-Salz Puffer	: 1,2 M NaCl; 0,8 M tri-Natriumcitrat und autoklavieren		

B1.3.2.2 Puffer und Lösungen für die elektrophoretische Auftrennung von RNA

Loading Dye (6x)	: 0,2% (w/v) Bromphenolblau; 0,2% (w/v) Xylencyanol; 60%				
	(v/v) Glycerin; 60 mM EDTA				
MOPS (10x)	: 0,2 M MOPS; 50 mM Natriumacetat; 10 mM EDTA;				
	pH 7,0 und autoklavieren				
Denaturierungspuffer	: 56% (v/v) Formamid; 18% (v/v) Formaldehyd; 1 x				
	MOPS; 13,4% (v/v) Glycerin				

B1.3.3 Puffer und Lösungen für Southern- und Northern-Kapillarblot

Denaturierungslösung	: 1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH; direkt vor dem Gebrauch ansetzen
Neutralisierungspuffer	: 1,5 M NaCl; 0,5 M Tris/HCL (pH 7,2); 1 mM EDTA und autoklavieren
SSC (20x)	: 3 M NaCl; 0,3 M tri-Natriumcitrat; pH 7,0 und autoklavieren
MOPS (10x)	: 0,2 M MOPS; 50 mM Natriumacetat; 10 mM EDTA; pH 7,0 und autoklavieren
Blocking Reagenz (SL)	: 10% (w/v) Blocking Reagenz in Puffer 1 lösen (68°C); autoklavieren und Lagerung bei -20°C
(Vor-) Hybridisierungslsg.	: 7% (w/v) SDS; 50 mM Natriumphosphatpuffer; 2% (w/v) Blocking Reagenz; 50% (v/v) Formamid; 5 x SSC; 0,1% (w/v) N-Lauroylsarcosin
Puffer 1	: 0,1 M Maleinsäure; 0,1 M NaCl; pH 7,5 und autoklavieren
Puffer 2	: 1% (w/v) Blocking Reagenz (Blocking Reagenz (SL) in Puffer 1 1:10 verdünnen)
Waschpuffer	: Puffer 1; 0,3% (v/v) Tween20
Puffer 3	: 0,1 M Tris/HCL (pH 9,5); 0,1 M NaCl und autoklavieren

B1.3.4 Puffer und Lösungen für die Isolierung und Analyse von Proteinen

B1.3.4.1 Puffer für die Iso	olierung von Proteinen aus Blattmaterial
Proteinextraktionspuffer	: 50 mM Tris/HCI (pH 7,5); 100 mM NaCI; 5 mM EDTA
	(pH 8,0); 1% (v/v) Triton; 1 mM DTT; 2 mM PMSF; 30

μM LeupeptinPat-Extraktionspuffer: 0,5 M Tris/HCl; 0,4 mM EDTA; 0,3 mg/ml BSA; 0,1 mMPMSF; 0,2 mM DTT

B1.3.4.2 Puffer u	nd Lösungen für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese			
Laufpuffer (5x)	: 0,1 M Tris/HCl; 1,25 M Glycin; 0,5% (w/v) SDS			
Trenngel-Puffer	enngel-Puffer : 1,5 M Tris/HCl; pH 8,8 und autoklavieren			
Sammelgel-Puffer	: 1,0 M Tris/HCl; pH 6,8 und autoklavieren			
Acrylamid-Mix	: 30% (w/v) Acrylamid; 0,8% (w/v) Bis-Acrylamid			
Ladepuffer (4x)	: 0,4% (v/v) Glycerin; 2,4 mM Tris/HCl; 0,02% (w/v) SDS;			
	pH 6,8 einstellen und 5 µL 0,1% (w/v) BPB dazugeben;			
	direkt vor dem Gebrauch Zugabe von 20% (v/v)			
	β-Mercaptoethanol			
B1.3.4.3 Puffer fü	ir den Proteintransfer auf Membranen			
Transferpuffer	: 40 mM Tris/HCl; 40 mM Glycin; 0,01% (w/v) SDS;			
	20% (v/v) Methanol			
B1.3.4.4 Lösunge	en für die Coomassie Färbung elektrophoretisch aufgetrennter			
Proteine				
Fixierer	: 50% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsaure; 40% H ₂ O _{dest.}			
Färbelösung	: 50% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure; 40%			
	H ₂ O _{dest} ; 0,5 g Brilliant Blue R250 (lila Farbstoff) oder			
	Serva Blue G (blauer Farbstoff)			
Entfärber	: 20% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure; 70% (v/v)			
	H ₂ O _{dest}			
B1.3.4.5 Puffer u	ınd Lösungen für die Waschung und Hybridisierung von Western			
Blots				
TBS (1x)	: 15 mM Tris/HCl; 0,1 M NaCl; pH 7,6			
TBSTween (1x)	: 15 mM Tris/HCl; 0,1 M NaCl; 0,01% (v/v) Tween 20; pH 7,6			
B1.3.4.6 Puffer u	nd Lösungen zum Nachweis der Luciferase-Aktivität			
Luciferinlösungen	I: 1 mM Luciferin in 25 mM Glycylglycin, pH 5,0			
	II:1 mM Luciferin in 25 mM Glycylglycin, pH 7,5			
	III:1 mM Luciferin in 25 mM Glycylglycin, 20% (v/v)			
	DMSO, pH 7,5			

B1.3.4.7 Antikörper für den Nachweis der Phosphinothricin-N-Acetyltransferase

Anti-Pat 65D ₁₄	: polyklonaler Antikörper gegen die Phosphinothricin-		
	N- Acetyltransferase (Vinnemeier J. et al. 1995)		
Anti-Rabbit-IgG	: sekundärer Kaninchen-Antikörper, mit alkalischer		
	Phosphatase (Sigma-Aldrich)		

B1.3.5	Puffer	und	Lösungen	für	die	Isolierung	und	Analyse	von	nativen
	Kernpro	oteine	xtrakten							

1A Puffer	: 1 M Hexylenglykol; 0,25 M Saccharose; 20 mM TAPS			
	(pH 8,5) 10 mM MgCl ₂ ; 0,15 mM Spermin; 0,5 mM			
	Spermidin; 0,6% (v/v) Nonidet P-40; direkt vor dem			
	Gebrauch Zugabe von 20 mM ß-Mercaptoethanol			
0,5A Puffer	: 1 M Hexylenglykol; 0,25 M Saccharose; 20 mM TAPS			
	(pH 8,5) 10 mM MgCl ₂ ; 0,15 mM Spermin; 0,5 mM			
	Spermidin; 0,6% (v/v) Nonidet P-40; direkt vor dem			
	Gebrauch Zugabe von 20 mM ß-Mercaptoethanol			
Lysispuffer	: 110 mM KCl; 15 mM HEPES (pH 7,6); 5 mM MgCl ₂ ;			
	direkt vor dem Gebrauch Zugabe von 1 mM DTT und 0,1			
	mM PMSF			
Dialysepuffer	: 100 mM KCl; 20 mM HEPES (pH 7,6); 0,2 mM EDTA			
	(pH 8,0); 10% (v/v) Glycerin; direkt vor dem Gebrauch			
	Zugabe von 0,5 mM DTT, 0,2 mM PMSF und			
	Protease Inhibitor Mix (Sigma-Aldrich)			
Bindepuffer (5x)	: 50% (v/v) Glycerin; 125 mM HEPES (pH 7,5); 50 mM			
	MgCl ₂ ; 1 mM CaCl ₂ , 10 mM DTT			
Auftragspuffer	: wie 1 x Bindepuffer, aber mit 87,5% (v/v) Glycerin			

B1.3.6	Weitere	Puffer	und	Lösungen
--------	---------	--------	-----	----------

TJB1-Puffer	: 100 mM RbCl; 50 mM MnCl ₂ ; 30 mM Kaliumacetat;
	10mM CaCl ₂ ; 15% (v/v) Glycerin; pH 8,0; steril filtrieren
	und bei 4°C lagern
TJB2-Puffer	: 10 mM MOPS; 10 mM RbCl; 75 mM CaCl ₂ ; 15% (v/v)
	Glycerin; pH 7,0; steril filtrieren und bei 4°C lagern

Bei den genutzten Puffer und Lösungen die hier nicht aufgeführt sind, handelt es sich um Fertigpuffer und -lösungen von den jeweiligen Firmen und sind dementsprechend gekennzeichnet.

B1.4 Primer und Oligonukleotide

Bezeichnung der Primer / Oligo	Sequenz	Verwendung
18S rRNA-fw	5´GGTCGCAAGGCTGAAACTT 3´	Amplifikation einer Sonde
18S rRNA-rv	5´TTATTGCCTCAAACTTCC 3´	rRNA
kpat41-fw1	5´AGACGAGCACGGTCAACTTC 3´	Nachweis der pat41-
kpat41-rv2	5´TTCAGCAGGTGGGTGTAGAG 3´	Kodierregion
kpatS-fw1	5´CGGAGAGGAGACCAGTTGAG 3´	Nachweis der patS-
kpatS-rv2	5´CTAACTGGCCTTGGAGGAGC 3´	Kodierregion
LucS-fw	5´TATCGGAGTTGCAGTTGCGCCCG 3´	Nachweis der luc- mRNA
LucS-rv	5´GCGAGAATCTGACGCAGGCAG 3´	mit RT-PCR
LucSall-fw	5´ACGCGTCGACATGGAAGACGCCAAAAACATAAA 3´	Amplifizierung des <i>luc</i> - Kodierbereiches mit
LucSall-rv	5´ACGCGTCGACTTACAATTTGGACTTTCCGCCCTTC 3´	Restriktionsschnittstellen
Nb-Actin-fw	5´ GCAACTGGGATGATATGGAGAA 3´	Nachweis der Aktin (N.
Nb-Actin-rv	5´ GTGCCTTTGCAATCCACATCTG 3´	RT- und qRT-PCR
p35Stnos-fw	5´ CCACTATCCTTCGCAAGACC 3´	Nachweis des pat43- und
p35Stnos-rv	5´ CAAGACCGGCAACAGGATTC 3´	<i>pat</i> 48-Gens
p57as1-fw	5´ CACACAGGAAACAGCTATGACC 3´	Amplifizierung einer mod.
p57as1-rv	5´ AACGACGGCCAGTGAATTCGAG 3´	Bpil-Kassette
patS-fw	5´ CCAGTTGAGATTAGGCCAGC 3´	Nachweis der patS- Kodierregion/Amplifikation einer Sonde für den
patS-rv	5´ TGGAGGAGCTGGCAACTCAA 3´	mRNA/Nachweis der pats- mRNA/Nachweis der patS- mRNA mit RT- und qRT- PCR
p35St35S-fw	5´ TCCTTCGCAAGACCCTTCCT 3´	
p35St35S-rv	5´ GACTGGTGATTTCAGCGGCA 3´	Nachweis des pat47- Gens
3'UTR41-rv	5´ TACCCTCACTGGAAACTGCG 3´	

Tabelle B5: Bezeichnung, Sequenz und Verwendung der PCR-Primer

B2 Methoden

B2.1 Kulturbedingungen

B2.1.1 Kultivierung von Bakterienstämmen

Escherichia coli	: LB-Medium; 37°C; 16-24 h
Agrobakterium tumefaciens	: LB-Medium; 22°C; 24 h (für Pflanzeninfektion)
	LB-Medium; 28°C; 48 h (Erhaltung)

B2.1.2	Kultivierung von	Pflanzen	unter optin	malen Te	mperaturen
--------	------------------	----------	-------------	----------	------------

Nicotiana tabacum	: in Erde; Licht-Dunkelrhythmus 16/8 h
	im Gewächshaus; 200 µmol m ⁻² s ⁻ 1; 24°C
Nicotiana tabacum (Sterilkultur)	: LS-Medium; Licht-Dunkelrhythmus 16/8 h
	im Klimaschrank; 200 µmol m ⁻² s ⁻ 1; 24°C

Arabidospis thaliana

: in Erde; Licht-Dunkelrhythmus 10/14 h, 12/12h oder 14/10h in Phytokammer; 120 μmol m⁻² s⁻1 bei 22°C

B2.1.3 Induzierung eines moderaten Hitzestresses

Nicotiana tabacum

Von der zu testenden Linie werden zwei Klone für ca. 2 Wochen in getrennten Pflanzencontainern bei 24°C und Licht-Dunkelrhythmus 16/8 h für ca. 3 Wochen angezogen; für die Induzierung eines moderaten Hitzestresses wird ein Klon 10 Tage lang bei 37°C in einer Hitzekammer inkubiert; der andere Klon wird weiter bei 24°C angezogen

Arabidospis thaliana

Anzucht der Nachkommen einer Linie bei 22°C und Licht-Dunkelrhythmus 12/12 h für ca. 8 Wochen, für die Induzierung eines moderaten Hitzestresses wird eine Hälfte der Geschwister 10 Tage lang bei 31°C in einer Hitzekammer inkubiert; die andere Hälfte wird weiter bei 22°C angezogen

B2.2 Sterilisation von Tabaksamen

Samen in 2 mL-Reaktionsgefäß (max. Füllhöhe bis 0,5 mL) geben; auf 1 mL mit $H_2O_{dest.}$ auffüllen; + 1 µL Triton X-100 (25%ig); 5 min lang kräftig mischen; + 1 mL gesättigter Calciumchloridlösung; vorsichtig mischen; Inkubation 5 min; Überstand verwerfen; fünf bis sechsmaliges Waschen mit jeweils 1 mL sterilem $H_2O_{dest.}$; Samen auf LS-Medium auslegen

B2.3 DNA-Transfer Methoden

B2.3.1 Transformation von Escherichia coli

Erzeugung kompetenter E. coli-Bakterien:

100 mL Y-Medium mit 1 mL *E. coli* Zellen einer Übernachtkultur beimpfen; Inkubation bei 37°C bis OD₅₅₀ von ca. 0,5; Inkubation der Zellen für 10 min auf Eis; Zentrifugation: 3.000 x g; 4°C; 5 min; Zellen in 30 mL eiskaltem TJB1 resuspendieren; Zentrifugation: 3.000 x g; 4°C; 5 min; Zellen in 4 mL eiskaltem TJB2 resuspendieren und 100 μ L-Aliquots anlegen; Lagerung bei -80°C

Hitzeschocktransformation von E. coli:

100 µL kompetente *E. coli* Zellen mit 5 µL Plasmid-DNA mischen; Inkubation für 30 min auf Eis; Hitzeschock: 2 min bei 42°C; Inkubation für 7 min bei RT 1 mL steriles

LB-Flüssigmedium zugeben; Inkubation für 1 h bei 37°C unter schütteln; auf Selektionsplatten ausstreichen

B2.3.2 Transformation und Identifikation von Agrobacterium tumefaciens

Gefrierschocktransformation:

500 µL Agrobakterien in log-Phase (14 - 18 h) + 5 - 10 µg DNA; 5 min auf Eis; 5 min in flüssigen Stickstoff; 5 min 37°C + 1 mL LB-Medium (flüssig); 4 h Inkubation bei RT; 10 µL auf LB-Medium (Titerbestimmung); auf Selektionsmedium ausplattieren; Inkubation 2 Tage bei 28°C

ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR) zur Identifizierung von Agrobakterienstämmen:

ERIC-Elemente sind repetitive Sequenzelemente im bakteriellen Genom, mit denen Bakterienarten spezifiziert werden können (Fingerabdruck).

Agrobakterienklon in 50 μ L Lysispuffer resuspendieren und für 15 min bei 100°C inkubieren; Ansatz sofort auf Eis und mit 450 μ L H₂O versetzen; Zentrifugation: 15.000 x g; RT; 5 min; 0,5 μ L des Überstandes für PCR einsetzen

B2.3.3 Transformation von Pflanzen

Nicotiana tabacum

Die Integration der Transgene in *N. tabacum* erfolgte über die Blattscheiben Transformation (modifiziert nach Horsch R. B. et al. 1985) mit dem Agrobakterien-Stamm *A. tumefaciens* LBA4404. Ein Stamm, der sich bisher für Tabaktransformationen als geeignet erwies (Hoekema A. et al. 1983).

Tabakblatt mit Rasierklinge von Mittelrippe befreien in ca. 1,5 cm² große Explantate schneiden; Explantate auf Blattoberseite mit Pinzette vorsichtig verletzen und je 18 Stück in 10 mL B5-Infektionsmedium mit 20 μ L einer Agrobaktierenübernachtkultur (OD₆₀₀ ca. 0,6) geben; Inkubation bei RT für zwei bis drei Tage bei schwachem Licht; Blätter gründlich in sterilem H₂O_{dest.} spülen; fünf bis sieben Explantate auf ACB-Selektionsmedium legen; nach vier bis sechs Wochen entwickeln sich Kallus- und anschließend Sprosse; Sprosse für Wurzelbildung auf LS-Selektionsmedium überführen

Arabidopsis thaliana

Die Integration der Transgene in *A. thaliana* erfolgte über die Blütentauchmethode (Clough S. J. und Bent A. F. 1998) mit dem Agrobakterien-Stamm *A. tumefaciens* GV3101(pMP90). Ein hoch virulenter Agrobakterien-Stamm aufgrund von

zusätzlichen Virulenzgenen auf dem Helferplasmid pMP90 (Koncz C. und Schell J. 1986).

Anzucht von A. thaliana zur Infiltration:

Samen von *A. thaliana* auf Erde ausgelegen; im Zwei- bis Vierblattstadium vereinzeln; die ersten Infloreszenzen abschneiden, um die Bildung von nachfolgenden Infloreszenzen zu fördern; nach ca. einer Woche ausreichend junge Infloreszenzen ausgebildet, um transformiert zu werden

Anzucht von A. tumefaciens zur Infiltration:

200 mL LB-Flüssigmedium mit 20 μ L *A. tumefaciens* GV3101 (pMP90) Zellen einer Übernachtkultur beimpfen; Inkubation bei 22°C bis zu einem OD₆₀₀ zwischen 1,2 und 1,8; Zentrifugation: 2500 x g; RT; 15 min; Überstand verwerfen; Pellet in Infiltrationsmedium resuspendieren bis OD₆₀₀ von ca. 0,8

Transformation von A. thaliana mit A. tumefaciens:

Unmittelbar vor der Infiltration die Agrobakterienkultur im Verhältnis 1:2000 mit Silwet L-77 versetzen und gut mischen; Blüten 10-20 s in die Infiltrationslösung tauchen; zum Abtrocknen die Töpfe einen Tag waagerecht im Dunkeln lagern

Anzucht und Selektion der Transformanden:

Transformierten Pflanzen zum Zeitpunkt des Abreifens der ersten Schoten in Tüten einhüllen, um die Samen zu sammeln; nach Abreife der Pflanzen Triebe abschneiden; Samen trocknen und sieben; Samen auf Erde auslegen, Zur Selektion besprühen der Keimlinge ab Sechsblattstadium mit 10 mg/L L-Pt

B2.4 Isolierung von Plasmid-DNA

DNA-Isolation aus *E. coli* Bakterien mit dem GFX™ Micro Plasmid Prep Kit (Pharmacia):

Schnelle und einfache Isolation reiner Plasmid-DNA für den Nachweis spezifischer DNA-Abschnitte über spezifische Sequenzierungen, Restriktions- und PCR-Analsyen.

Überführung von 1-1,5 mL Übernachtkulutur in Eppendorf Reaktionsgefäß; Zentrifugation: 13.000 x g; RT; 30 s; Überstand vorsichtig abnehmen; Pellet in 150 μ L Lösung I resuspendieren und gut durchmischen; Zugabe von 150 μ L Lösung II und Reaktionsgefäß 10-15 mal invertieren; sofortige Zugabe von 300 μ L Lösung III Reaktionsgefäß 10-20 mal invertieren; Zentrifugation: 13.000 x g; RT; 5 min; Überführung des Überstandes auf GFX-Reaktionssäule und 1 min bei RT inkubieren; Zentrifugation: 13.000 x g; RT; 30 s; Durchfluss verwerfen; Zugabe von 400 μ L Waschpuffer; Zentrifugation: 13.000 x g; RT; 60 s; Überführung der GFX- Reaktionssäule auf eine neues Reaktionsgefäß; Zugabe von 100 μ L TE-Puffer direkt auf die Matrix in der der GFX-Reaktionssäule; Inkubation für 1 min bei RT; Zentrifugation: 13.000 x g; RT; 1 min

DNA-Isolation aus E. coli Bakterien mit dem Qiagen Plasmid Midi Kit (Qiagen):

Isolation großer Mengen reiner Plasmid-DNA zur Restriktion spezifischer DNA-Fragmente und deren Elution aus Agarosegelen.

Inokulation einer Vorkultur in 5 mL LB-Medium; Kultivierung der Vorkultur für ca. 8 h bei 37°C auf einem Schüttler; Inokulation der Hauptkultur mit einer 1:500 Verdünnung der Vorkultur in 25 mL LB-Medium; Kultivierung der Hauptkultur für ca. 12-16 h bei 37°C auf einem Schüttler; Ernten der Bakterienzellen durch Zentrifugation: 6.000 x g; 4°C; 15 min; Zellpellet in 4 mL Puffer P1 resuspendieren; Zugabe von 4 mL Puffer P2 und Reaktionsgefäß 4-5 mal invertieren; Inkubation für 5 min bei RT; Zugabe von 4 mL Puffer P3 und Reaktionsgefäß 4-6 mal invertieren; Inkubation für 15 min auf Eis; Zentrifugation: ≥20.000 x g; 4°C; 30 min; sofortige Überführung des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß; Zentrifugation: ≥20.000 x g; 4°C; 30 min; sofortige Überführung des Überstandes in eine zuvor equilibrierte Quigen-tip 100; nach Durchfluss des Überstandes Quigen-tip 100 durch Zugabe von 2 x 10 mL Puffer QC waschen; Elution der DNA durch Zugabe von 5 mL Puffer QF; Ausfällung der DNA durch Zugabe von 0,7 Vol Isopropanol zu der eluierten DNA; Zentrifugation: ≥15.000 x g; 4°C; 30 min; Überstand vorsichtig abnehmen und verwerfen; DNA-Pellet durch Zugabe von 2 mL 70%igem Ethanol waschen; Zentrifugation: ≥15.000 x g; RT; 30 min; Überstand vorsichtig abnehmen und verwerfen; DNA-Pellet trocknen und in 100 µL TE-Puffer eluieren

B2.5 Isolierung von Pflanzen Gesamt-DNA

Schnell-DNA-Isolation:

Schnelle und einfache Isolierung pflanzlicher Gesamt-DNA aus geringen Mengen Probenmaterial für den Nachweis der *pat*-Gene über spezifische PCR-Analysen. Nicht geeignet für den Nachweis des *npt*II- und *luc*-Gens.

2 cm² Blattgewebe in flüssigem Stickstoff zerreiben und in 400 µl Lysepuffer aufnehmen; Inkubation für 10 min bei 100°C unter Schütteln; Zentrifugation: 13.000 x g; RT; 5 min; 5 µL des Überstandes in H₂O_{dest.} (1:4) verdünnen; 1 µl der Verdünnung in der PCR-Reaktion einsetzen

CTAB-DNA-Isolation (modifiziert nach Murray M. G. und Thompson W. F. 1980):

Schnelle Isolierung großer Mengen genomischer DNA für den Nachweis des *npt*II- und *luc*-Gens über spezifische PCR-Analysen.

200 mg Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff mörsern und mit 800 μ L CTAB-Puffer (2x) versetzen; Inkubation für 30 min bei 68°C; gelegentlich mischen; Zugabe von 20 μ L RNase (10 mg/mL); Inkubation für 30 min bei 37°C; Ansatz mit 1 Vol (700 μ L) Chloroform versetzen und gut vermischen; Zentrifugation: 13.000 x g; RT; 5 min; Überstand abnehmen; Zugabe von 1 Vol Isopropanol und gut vermischen; Inkubation für 15 min auf Eis; Zentrifugation: 13.000 x g ; 4°C; 15 min; Pellet mit 70%igem Ethanol (-20°C) waschen und nach Trocknung in 20 μ L H₂O_{dest.} Lösen

PVP-DNA-Isolation (modifiziert nach Khanuja S. P. S. et al. 1999):

Isolierung großer Mengen genomischer DNA und Entfernung von Sekundärmetaboliten (Polysacchariden, Polyphenole) für den Nachweis des *pat*47- und *pat*48-Gens über das Southern-Blot Verfahren.

3 g Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff mörsern und mit 3 mL Extraktionspuffer versetzen; Inkubation für 1-2 h bei 60°C; gelegentlich mischen; Zugabe von 3 mL Chloroform:Isoamylalkohl (24:1) und gut vermischen; Zentrifugation: 4600 x g ; RT, 10 min; Überstand abnehmen; Zugabe von 0,5 Vol 5 M NaCl und gut vermischen; 0,6 Vol Isopropanol zugeben und langsam vermischen; Zentrifugation: 4600 x g ; RT; 10 min; Überstand verwerfen; Pellet mit 500 μ L 80%igem Ethanol (-20°C) waschen; Zentrifugation: 4600 x g ; RT; 10 min; Überstand verwerfen; Pellet mit 500 μ L RNase (10 mg/mL); Inkubation für 30 min bei 37°C; 1 Vol Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) zugeben und gut vermischen; Zentrifugation: 4600 x g ; RT; 10 min; Überstand abnehmen; Zugabe von 2 Vol 96%igem Ethanol (-20°C) und gut vermischen; Zentrifugation: 4600 x g ; RT; 10 min; Überstand abnehmen; Zugabe von 2 Vol 96%igem Ethanol (-20°C) und gut vermischen; Zentrifugation: 4600 x g ; RT; 10 min; Überstand abnehmen; Zugabe von 2 Vol 96%igem Ethanol (-20°C) und gut vermischen; Zentrifugation: 4600 x g ; RT; 10 min; Überstand verwerfen; Pellet trocknen und in 200 μ L H₂O_{dest} lösen

B2.6 Isolierung und Behandlung von Pflanzen Gesamt-RNA

RNA-Isolierung (modifiziert nach Logemann J. et al. 1987):

Isolierung von Gesamt-RNA aus Tabak für den spezifischen Nachweis der *pat*S- und AktinmRNA über das Northern-Blot Verfahren. Nicht geeignet für die Gesamt-RNA-Isolation aus Arabidopsis.

100 mg Blattmaterial in flüssigem Stickstoff mörsern; Probe in 100 µL Z6-Puffer aufnehmen und gut vermischen; Inkubation im Schüttler für 5 min bei RT; Zugabe von

0,5 Vol Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und gut vermischen; Zentrifugation: 13.000 x g; RT; 5 min; Überstand abnehmen; 0,2 Vol 1 M Essigsäure und 0,7 Vol 96%igem (-20°C) Ethanol zugeben; Fällung bei -80°C für 2 h oder über Nacht; Zentrifugation: 13.000 x g; 4°C; 20 min; Überstand verwerfen; Pellet in 400 μ L 3 M Natriumacetat (pH 5,2) waschen; Zentrifugation: 13.000 x g; 4°C; 5 min; Überstand verwerfen; Pellet in 400 μ L 70%igem Ethanol (-20°C) waschen; Zentrifugation: 13.000 x g; 4°C; 5 min; Überstand verwerfen; Pellet trocknen und in 30 μ L H₂O_{dest.} Lösen

RNA-Isolierung mit dem RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen):

Isolierung von reiner Gesamt-RNA aus Tabak für die cDNA-Synthese. Nicht geeignet für die Gesamt-RNA-Isolation aus Arabidopsis.

100 mg Blattmaterial in flüssigem Stickstoff mörsern; Probe in 450 µL Puffer RLT aufnehmen; Überführung der Probe auf eine 'QlAshredder' Reaktionssäule; Zentrifugation: 13.000 x g; RT; 2 min; Überstand des Durchflusses vorsichtig abnehmen und in ein neues Reaktionsgefäß überführen; Zugabe von 0,5 Vol 96%igem Ethanol und vorsichtig durchmischen; Überführung der Probe auf eine 'RNeasy' Reaktionssäule; Zentrifugation: \geq 8.000 x g; RT; 15 s; Durchfluss verwerfen; Zugabe von 700 µL Puffer RW1; Zentrifugation: \geq 8.000 x g; RT; 15 s; Durchfluss verwerfen; Zugabe von 500 µL Puffer RPE; Zentrifugation: \geq 8.000 x g; RT; 2 min; Überführung der 'RNeasy' Reaktionssäule auf ein neues Reaktionsgefäß; Zugabe von 50 µL RNase-freies H₂O direkt auf die Membran in der 'RNeasy' Reaktionssäule; Zentrifugation: \geq 8.000 x g; RT; 1 min

RNA-Isolierung mit Triazol:

Isolierung von Gesamt-RNA aus Arabidopsis (und Tabak) für die cDNA-Synthese.

100 mg Blattmaterial in flüssigem Stickstoff mörsern; Probe in 1300 μ L Triazolpuffer aufnehmen; Inkubation im Schüttler für 10 min bei RT; Zugabe von 260 μ L Chloroform; Inkubation im Schüttler für 10 min bei RT; Zentrifugation: 13.000 x g; 4°C; 30 min; Überstand abnehmen; Zugabe von 325 μ L Hoch-Salz Puffer und gut vermischen; Zugaben von 325 μ L Isopropanol und gut vermischen; Inkubation für 10 min bei RT; Zentrifugation: 13.000 x g; 4°C; 15 min; Überstand vorsichtig verwerfen; Pellet trocknen und in 30 μ L H₂O_{dest.} lösen; Inkubation für 10 min bei 65°C; danach sofort in flüssigem Stickstoff schock gefrieren DNase-Behandlung von RNA-Proben (Fermentas):

20 µL Ansatz: 2 µg RNA + 2 µL DNase Puffer + 2 µL DNasel (0,5 U); Inkubation für 30 min bei 37°C; 2 µL 50 mM EDTA zum Ansatz geben; Inaktivierung bei 65°C für 5 min

Reverse Transkriptase-Behandlung von RNA Proben mit dem RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas):

Synthese komplementärer DNA (cDNA) für den spezifischen Nachweis der *pat*S-, *pat*41- und Aktin-mRNA über RT- bzw. qRT-PCR-Analysen.

Zugabe von 1 µL oligo(dT)₁₈Primer zu 11 µL des DNase-behandelten RNA-Ansatzes (s.o.); Inkubation für 5 min bei 70°C; anschließend Reaktionsansatz auf RT abkühlen; Zugabe von 4 µL Reaktionspuffer (5x), 1 µL RiboLock™RNase Inhibitor und 2 µL dNTP Mix (10 mM); Inkubation für 5 min bei 37°C; Zugabe von 1 µL M-MuLV Reverse Transkriptase (200 u/µL); Inkubation für 60 min bei 42°C; anschließend Reaktion bei 70°C 5 min lang abstoppen; 2 µL des Reaktionsansatzes direkt für PCR eingesetzt

B2.7 Elektrophorese

Mit Hilfe der Elektrophorese werden RNA-, DNA- und Protein-Gemische in einem elektrischen Feld entsprechend ihrer Molekülgröße oder denaturierenden oder nativen Bedingungen aufgetrennt.

DNA-Agarosegelelektrophorese (modifiziert nach Sambrook J. et al. 1989):

Agarose wird 0,8-2%ig (je nach Fragmentgröße) in TA- bzw. TB-Elektrophoresepuffer (1x) angesetzt und aufgekocht; mit Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 20 µg auf 100 mL versetzen; nach Abkühlen der Agarose auf 60°C blasenfrei in Gelkammer gießen; DNA-Proben je nach Volumen mit Bromphenolblau versetzen; Laufbedingungen: 80 - 120 V für 30 min bis 2 h (je nach Fragmentgröße) in TA- bzw. TB-Elektrophoresepuffer; Photodokumentation mit Vilber Lourmat Modell IB-010, SD Version 10

RNA-Agarosegelelektrophorese:

1,4% (w/v) Agarose in MOPS mit 5% (v/v) Formaldehyd; RNA-Proben werden im Denaturierungspuffer für 30 min bei 68°C inkubiert; Laufbedingungen: 80 - 100 V für 2 - 3 h

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (modifiziert nach Laemmli U. K. 1970):

15% iges Trenngel (63,2% (v/v) H₂O, 8,2% (v/v) Trenngel-Puffer, 27,8% (v/v) Acyrlamid-Mix, 0,4% (v/v) TEMED, 0,4% (v/v) APS (100 mg/mL)) ansetzen, in eine Gelkassette gießen und ca. 60 min auspolymerisieren lassen; Sammelgel (24,9% (v/v) H₂O, 24,9% (v/v) Sammelgel-Puffer, 50% (v/v) Acrylamid-Mix, 0,1% (v/v) TEMED, 0,1% (v/v) APS (100 mg/mL)) ansetzten, Gelkassette auffüllen, Probenkamm einsetzen und auspolymerisieren lassen; Gelkassette in Elektrophoresekammer (Hoefer, SE6000 Series) einsetzen. Kammer mit Laufpuffer befüllen, Probenkamm ziehen und die Taschen mit einer Spritze und Laufpuffer spülen; 4 Vol des Proteingemisches mit 1 Vol Ladepuffer (4x) mischen, 5 min bei 100°C inkubieren und direkt auf das Gel auftragen; Laufbedingungen: Sammelgel 100 V, Trenngel 150 V bis BPB Bande aus dem Gel gelaufen ist.

B2.8 DNA-, RNA- und Protein-Blot-Nachweisverfahren

Northern-Blot Verfahren:

Diese Methode dient dem Transfer von Gesamt-RNA auf eine Nylonmembran (Pall) und dem Nachweis der *pat*S- und Aktin-mRNA über die Interaktion mit einer Transkript-spezifischen Digoxigenin (Roche) markierten DNA-Sonde. Die DIG-markierte DNA-Sonde kann durch einen hochaffinen, alkalische Phosphatase-gekoppelten Antikörper (Anti-DIG-AP) gebunden werden. Durch die AP-katalysierte Umsetzung des Chemilumineszens-Substrats CDP-Star (Roche) kann das Transkript indirekt detektiert werden.

Blotvorgang erfolgt als Kapillarblot über Nacht in SSC (10x) (drei Lagen Filterpapier \rightarrow \rightarrow Gel \rightarrow Nylonmembran \rightarrow sechs Lagen Blotpapier \rightarrow rund 8 cm Papiertuchstapel und einem Gewicht von ca. 500 g). Anschließend Membran in SSC (2x) waschen und für 3 min mit UV-Licht fixieren. Alle folgenden Schritte erfolgen im Hybridisierungsofen:

Vorhybridisierung	: für 2 - 3 h in Church-Puffer bei 51°C
Hybridisierung	: mit 10 bis 15 µL DIG-DNA-Sonde in 10 mL Church-Puffer über Nacht
	bei 51°C
Waschungen	: 2 x 15 min bei RT mit 2 x SSC + 0,1% (w/v) SDS sowie 2 x 20 min
	bei 68°C mit 0,1 x SSC + 0,1% (w/v) SDS (stringent)
Detektion	: 2 - 4 min in Puffer 1 bei RT inkubieren; 1 h mit 2% (w/v) Blocking
	Reagenz bei RT inkubieren; 30 min in 2% (w/v) Blockierungslösung +
	Anti-DIG-Antikörper bei RT; anschließend 2 x 20 min bei RT mit
	Waschpuffer inkubieren; 4 min Detektionspuffer bei RT; Membran mit
	CDP-Star-Lösung für 5 min inkubieren und anschließend Röntgenfilm
	(Sigma-Aldrich) auflegen; Exposition liegt zwischen 5 min und über
	Nacht.; Entwicklung: 30 s in Entwicklerlösung; kurz in H ₂ O spülen;

dann kurz in Fixierlösung anschließend erneut in H_2O spülen; über Nacht trocknen

Southern-Blot Verfahren (modifiziert nach Southern E. M. 1975):

Diese Methode dient dem Transfer von genomischer DNA auf eine Nylonmembran (Pall) und dem Nachweis des *pat*47- und *pat*48-Gens über die Interaktion mit einer Sequenz-spezifischen Digoxigenin (Roche) markierten DNA-Sonde (s. o.).

DNA-Agarosegel (1%ig in TBE) wird nach elektrophoretischer Auftrennung für 15 min in 0,25 M HCl sowie für 30 min in Denaturierungslösung inkubiert; Neutralisierung erfolgt für 2 x 15 min im Neutralisierungspuffer; anschließende Inkubation des Gels für 10 min in SSC (20x); Durchführung der Hybridisierungen, Waschungen und Detektion der Membran erfolgt homolog zum Northern-Blot Verfahren; Hybridisierungstemperatur beträgt 42°C

Restriktion von genomischer DNA:

25 µL Ansatz: 25-50 µg DNA+ 2-3 µL hochkonzentriertes Restriktionsenzym (50-100 U/µL) + 2 µL Restriktionspuffer (10fach); Inkubation für 1-2 h entsprechend dem Temperaturoptimum des Enzyms; Zugabe von 1-1,5 µL des hochkonzentrierten Restriktionsenzyms; Inkubation für 1-2 h entsprechend dem Temperaturoptimum des Enzyms

Western-Blot Verfahren

Diese Methode dient dem Transfer von Geamt-Protein auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P 0.45µm, Millipore) und dem Nachweis des Pat-Proteins über die Interaktion mit einem Anti-Antigen-Antikörper (Primärantikörper). Der Nachweis des spezifisch gebundenen Primärantikörpers erfolgt über die Interaktion mit einem Phosphatase-gekoppelten Sekundärantikörper. Mit Hilfe einer Phosphatase katalysierten Substratumsetzung (NBT/BCIP) kann das spezifische Protein indirekt detektiert werden.

Blotvorgang erfolgt als Semi-Dry-Blot zwischen zwei Graphitplatten im elektrischen Feld (Trans-Blot[®] SD Cell, Bio-Rad) vom Gel auf die Membran (⁻Pol→ drei Lagen Filterpapier→ Gel→Membran→drei Lagen Filterpapier-→⁺Pol); Filterpapier in Transferpuffer tränken, Membran in Methanol aktivieren, Transfer mit 1-2 mA/cm² für ca. 45 min, zur Kontrolle des Transfers wurde die Membran 1 min in Ponceau-S-Lösung gefärbt; entfärben der Membran mit TBS (1fach)

Hybridisierung: Membran 2h in TBSTween20 (1x) mit 2% (w/v) Magermilchpulver blocken; Hybridisierung ü. N. mit primären AK (1:2000) in TBSTween20 (1x) mit 2% (w/v) Magermilchpulver; Membran 10' in TBSTween20 spülen, Waschritt zweimal wiederholen; Hybridisierung für 2h mit sekundären AK (1:3000) in TBSTween20 (1x) mit 2% (w/v) Magermilchpulver; Membran 5' in TBS spülen, Waschritt viermal wiederholen

Detektion
 Direkt vor der Detektion Zugabe von 60 µL NBT und 30 µL BCIP zu 20 mL
 Detektionspuffer P3; Membran zur NBT/BCIP-Detektionslösung geben und je
 nach Signalstärke 1-60 min inkubieren.

B2.9 DNA-Klonierungstechniken

Restriktion von Plasmid-DNA:

10 µL Ansatz: 8 µL DNA + 1 µL Restriktionsenzym (je nach DNA-Konzentration 0,1-2 U/µL) + 1 µL Restriktionspuffer (10fach); ggfs. Zugabe von 0,1 µL BSA (100fach); Inkubation für 60 min bis über Nacht entsprechend dem Temperaturoptimum des Enzyms

Aufreinigung von DNA-Fragmenten (Gelchromatographie, modifiziert nach Broer I. 1989):

1 mL Sephadex G50-Suspension (in TE gequollen; autoklaviert) wird in deckellose 1,5 mL Eppendorfgefäße pipettiert, die mit etwas autoklavierter Watte gefüllt sind und eine kleine Ausflussöffnung besitzen; ein zweites Eppendorfgefäß dient als Auffanggefäß; Zentrifugation: 13.000 x g; RT und 1 min; erneut 0,5 mL Sephadex G50-Suspension auf Säule geben; Zentrifugation: 13.000 x g; RT und 2 min; erzeugte Sephadex-Säule auf neues Eppendorfgefäß setzen und DNA-Probe auf Säule auftragen; Zentrifugation: 13.000 x g; RT; 4 min; ggfs. wiederholen; DNA-Eluat für nachfolgende Reinigung- und Konzentrationsmethode einsetzen

Phenol/Chloroformreinigung von DNA-Fragmenten:

DNA mit 1 Vol Phenol/Chloroform versetzen; gut durchmischen; Zentrifugation: 13.000 x g; RT; 5 min; Überstand abnehmen; Zugabe von 2,5 Vol 96% igem Ethanol und 1/10 Vol 3M Natriumacetat (pH 4,6 - 5,2); Inkubation für 1 h bei -20°C; Zentrifugation: 13.000 x g; 4°C; 30 min; Pellet mit 70% igem Ethanol (-20°C) waschen; trockenes DNA-Pellet in H_2O_{dest} . Aufnehmen

Reinigung von PCR-Fragmenten mit dem QIAquick® Purification Kit (Qiagen):

Reinigung der Digoxigenin markierten DNA-Sonden.

Zugabe von 5 Vol Puffer PB zum PCR-Ansatz; Überführung des gesamten Ansatzes auf eine 'QIAquick' Reaktionssäule; Zentrifugation: \geq 10.000 x g; RT; 1 min; Durchfluss verwerfen; Zugabe von 750 µL Puffer PE auf die 'QIAquick' Reaktionssäule; Zentrifugation: \geq 10.000 x g; RT; 1 min; Durchfluss verwerfen; Überführung der 'QIAquick' Reaktionssäule auf ein neues Reaktionsgefäß; Zugabe von 50 µL Puffer EB direkt auf die Membran in der ´QIAquick´ Reaktionssäule; Zentrifugation: ≥10.000 x g; RT; 1 min

Phosphatasebehandlung (Fermentas; nach DNA-Restriktion):

DNA-Pellet nach Reinigung in 34 μ L H₂O_{dest.} lösen und 4 μ L 10fach Puffer (SAP) und 2 μ L SAP (shrimp alkaline phosphatase) zufügen; Inkubation für 1 h bei 37°C

Isolierung von DNA-Fragmenten mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen):

Isolation von DNA-Fragmenten (< 500 bp) aus Agarosegelen.

DNA-Fragment aus dem Agarose Gel ausschneiden und Volumen bestimmen (100 mg ~ 100 µl); Zugabe von 3 Vol Puffer QG; Inkubation für 10 min bei 50°C; Zugabe von 1 Vol Isopropanol; Überführung des gesamten Ansatzes auf eine 'QlAquick' Reaktionssäule; Zentrifugation: \geq 10.000 x g; RT; 1 min; Durchfluss verwerfen; Zugabe von 750 µL Puffer PE auf die 'QlAquick' Reaktionssäule; Zentrifugation: \geq 10.000 x g; RT; 1 min; Durchfluss verwerfen; Überführung der 'QlAquick' Reaktionssäule auf ein neues Reaktionsgefäß; Zugabe von 50 µL Puffer EB direkt auf die Membran in der 'QlAquick' Reaktionssäule; Zentrifugation: \geq 10.000 x g; RT; 1 min

<u>Isolierung von DNA-Fragmenten mit dem EasyPure DNA Purification Kit (Biozym)</u>: Isolation von DNA-Fragmenten (≥ 500 bp) aus Agarosegelen.

DNA-Fragment aus dem Agarose Gel ausschneiden und Volumen bestimmen (100 mg ~ 100 μ l); Zugabe von 3 Vol Puffer SALT; Inkubation für 5 min bei 55°C; Zugabe von 5 μ l + 1 μ l/ μ g der erwarteten DNA-Ausbeute; Inkubation für 5 min bei RT; Zentrifugation: 13.000 x g; RT; 5 s; Überstand vorsichtig abnehmen und verwerfen; Pellet in 1 mL WASH Gebrauchslösung vorsichtig resuspendieren; Zentrifugation: 13.000 x g; RT; 5 s; Überstand vorsichtig abnehmen und verwerfen; Pellet in 20 μ l TE-Puffer resuspendieren und für 5 min bei RT inkubieren; Zentrifugation: 13.000 x g; RT; 1 min; Überstand sofort vorsichtig abnehmen und als gereinigte Probe in ein neues Reaktionsgefäß überführen

Hybridisierung von Oligonukleotiden (Broer I. 1989):

Hybridisierung der synthetisierten Oligos s5'UTR41fw und s5' UTR41rv für die Erzeugung einer spezifischen Gelshift-Sonde.

Oligo-forward und Oligo-reverse werden in gleichen Volumina zusammengeben und mit 1/10 Vol 1M NaCl vermischt; Inkubation über Nacht im Kühlschrank; langsam von 85°C auf 4°C abkühlen lassen

Ligation von DNA-Fragmenten (modifiziert nach Sambrook J. et al. 1989):

DNA (Vektor-Fragment und DNA-Fragmente); T4-Ligase und 10fach Ligationspuffer zusammengeben und mischen; Inkubation über Nacht von 22°C auf 4°C langsam abkühlen

B2.10 Polymeraseketten-Reaktion (PCR)

|--|

Ansat	z der Fragment-PCR:		PCR-Reaktion	on:				
	Fermentas Mastermix (2-fach)	50 µL		5 min	95°C			
	Primer A (sense)	10 µL	(10 pmol)	1 min	95°C	٦		
	Primer B (antisense)	10 µL	(10 pmol)	1 min	58°C	<pre>}</pre>	37 Zykle	en
	Template-DNA	5 µL		2 min	72°C	J		
	H ₂ O _{dest.}	25 µL		10 min	72°C			
				~	8°C			

B) PCR Nachweis von DNA-Fragmenten:

Ansatz der Fragment-PCR:	PCR-Reak	tion:		
Fermentas Mastermix (2-fach)	5 µL	5 min	95°C	
Primer A (sense)	1 µL (10 pmol)	1 min	95°C)
Primer B (antisense)	1 µL (10 pmol)	1 min	58°C	> 37 Zyklen
Template-DNA	1 µL	1 min	72°C	J
H ₂ O _{dest.}	2 µL	10 min	72°C	
		~	8°C	

C) PCR für die Erzeugung Digoxigenin (DIG) markierter DNA-Sonden:

Ansatz der Fragment-PCR:	PCR-Reak			
Fermentas Mastermix (2-fach)	2,5 µL	5 min	95°C	
dNTPs (DIG-11-dNTP)	2,5 µL (2 mM)	30 sec	95°C)
Primer A (sense)	1,5 µL (10 pmol)	30 sec	60°C	> 9 Zyklen
Primer B (antisense)	1,5 µL (10 pmol)	40 sec	72°C	J
Template-DNA	1 µL	30 sec	95°C)
H ₂ O _{dest.}	16,3 µL	30 sec	60°C	> 31 Zyklen
	40 :	sec (+20)	72°C	J
		7 min ∞	72°C 8°C	
D) Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR) für den Nachweis der patS- und Aktin-mRNA:

Ansatz der Fragment-PCR:		PCR-Reaktion:				
	Fermentas Mastermix (2-fach)	5 µL	5 min	95°C		
	Primer A (sense)	1 μL	1 min	95°C	٦	
	Primer B (antisense)	1 µL (10 pmol)	1 min	58°C	F	9 Zyklen
	Template-cDNA	2 µL(10 pmol)	2 min	72°C	J	
	H ₂ O _{dest.}	1 μL	1 min	95°C	٦	
			1 min	58°C	ł	x Zyklen
			2 min (+20)	72°C	J	
			∞	8°C		

E) Real-Time PCR (qRT-PCR) für die Quantifizierung der patS- und Aktin-mRNA:

Ansatz der Fragment-PCR:	PCR-Reaktion		
IQ SYBR Green Supermix (2-fach)	10 µL	15 min 95°C	
Primer A (sense)	0,6 µL (10 pmol)	30 sec 95°C]
Primer B (antisense)	0,6 µL (10 pmol)	60 sec 58°C	36 Zyklen
Template-cDNA	5 µL	90 sec 72°C	
H ₂ O _{dest.}	3,8 µL	∞ 8°C	

Bei der PCR für die Generierung von Sonden erfolgte eine Erweiterung der Verlängerungsreaktion (72°C auf bis zu 7 min (in einem 20 s Intervall). Die Anlagerungstemperaturen der Primer variierten je nach Länge und AT/CG-Gehalt zwischen 54°C und 60°C. Bei der ERIC-PCR (modifiziert nach Ansatz A), beträgt die Anlagerungstemperatur 52°C. Die Dauer der Polymeraseverlängerungsreaktion bei 72°C wurde auf 8 min ausgedehnt. Die Zyklenzahl des zweiten Loop bei der RT-PCR (Ansatz D) war abhängig von der Template-cDNA und der verwendeten Primer. Für jede in dieser Arbeit durchgeführte PCR erfolgte die Verwendung entsprechender Positivkontrollen, wie z. B. Plasmid-DNA.

B2.11 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde durch die Firma GeneArt GmbH in Regensburg (www.geneart.de) durchgeführt. Hierfür wurde die DNA in einer Konzentration von mindestens 1 µg und die spezifischen Primer in einer Konzentration von 20 pmol vorbereitet und verschickt.

B2.12 Proteinanalytik

B2.12.1 Isolierung von Gesamt-Protein aus pflanzlichen Gewebe

200 μ g Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff mörsern und mit 200 μ L Proteinextraktionspuffer versetzen; Zentrifugation: 13.000 x g; 4°C; 3 min; Überstand für Proteinanalysen einsetzen

B2.12.2 Isolierung und Analyse nativer Kernproteinextrakte

Diese Methode dient zum Nachweis einer spezifischen DNA-Protein Interaktion am 5' UTR41 und dem 'as-1 Element' in vitro. Der Nachweis basiert auf dem unterschiedlichen gelelektrophoretischen Laufverhalten eines freien- und eines Protein-gebundenen DNA-Fragmentes. Zur Ausbildung einer spezifischen Protein-DNA Interaktion muss das Protein im biologisch aktiven (nativen) Zustand vorliegen. Die Detektion erfolgt radioaktiv.

Isolierung von nativen Kernproteinextrakten:

Die Methoden von Niggeweg (1999) und Prat et al. (1989) wurden wie folgt modifiziert. Alle Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt.

6-10 g Blattmaterial in flüssigem Stickstoff mit einem elektrischen Schermixer zermahlen; Probe in 40 mL 1A Puffer aufnehmen und gut vermischen; Filtration der Probe durch zwei Lagen Miracloth (CALBIOCHEM); Zentrifugation: 119 x g; 4°C; 2 min 40 s; Überstand abnehmen; für die Pelletierung der Zellkerne Zentrifugation: 478 x g; 4°C; 3 min 30 s; Überstand verwerfen; Pellet in 8 mL 0,5A Puffer aufnehmen und vorsichtig mit feinem Haarpinsel resuspendieren; Zentrifugation: 487 x g; 4°C; 5 min; Überstand verwerfen; Waschschritt noch zweimal wiederholen; Pellet in 4 mL Lysispuffer aufnehmen und chromosomale DNA im Homogenisator scheren; tropfenweise Zugabe von 1/10 Vol 4 M Ammoniumsulfat und 1 h langsam Rühren; Zentrifugation: 32.000 x g; 4°C; 5 min; Überstand abnehmen; Zugabe von 0,37 g/mL Ammoniumsulfat und über Nacht langsam Rühren; Zentrifugation: 32.000 x g; 4°C; 30 min; Überstand (schwimmt auf) mit Pasteurpipette vorsichtig abnehmen und dialysieren

³²P-Markierung der 5' Enden von Gelshiftsonden:

Markierungsansatz:

Template (Bpll geschnitten)	4 µL
Puffer (grün von Fermentas)	2 µL
H ₂ O _{dest.}	0,2 μL
Klenow-Polymerase, exo ⁻	0,8 µL
[α-32P] ATP	5 µL

Inkubation des Ansatzes für 2 h bei 37°C. Zur Abtrennung nicht eingebauter, radioaktiver Nukleotide wurde eine 'Micro SpinTMG25 Column' der Firma Amersham-Pharmacia entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Die weitere Aufarbeitung des Gelshiftfragmentes erfolgte mittels eines 5%igen Polyacrylamidgeles, bei dem der gesamte Spaltungsansatz eingesetzt wurde. Das gewünschte Fragment wurde durch Exposition des Gels auf einem Röntgenfilm lokalisiert und ausgeschnitten. Die Sonde wurde aus dem Polyacrylamidgel durch Zugabe von 400 μ L TE-Puffer eluiert (14-18 h). Die Strahlung der Sonde im Überstand wurde im Szintillationsmeßgerät quantifiziert. Ein μ L der präparierten Sondenlösung enthielt 1,3 bis 1,6 fmol markiertes Fragment.

Gelshift/Electrophoretic mobility shift assay (EMSA):

Bindungsansatz:

Kernproteinextrakt (nativ)	2 µL
Bindepuffer (5-fach)	6 µL
poly dI:dC (1 µg/µL)	3 µL
H ₂ O _{dest.}	19 µL

Inkubation des Ansatzes für 10 min auf Eis. Danach Zugabe von 4 µL der radioaktiv markierten Sonde und Inkubation für 10 min bei RT. Die Elektrophorese erfolgte über einen Zeitraum von 12-16 h in einem Polyacrylamidgel (5%) unter nativen Bedingungen mit 1x TBE als Laufpuffer. Die Gele wurden bei 80°C auf dem Geltrockner getrocknet und die radioaktiven Signale unter Verwendung eines IPScreens detektiert. Das Einlesen der Screens erfolgte am Phosphoimager (Bioimager BAS-1000) mit dem Programm PCBAS® 2.0 (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH)

- B2.12.3 Bestimmung der Gesamt-Proteinkonzentration (nach Bradford, M. M. 1976)
 Vorlegen von 200 μL Bradfordreagenz (Sigma) in jedes Well einer 96-Mikrotiterplatte;
 Zugabe von 50 μL jedes BSA Konzentrations-Standards bzw. einer 1:100 verdünnten
 Proteinprobe; Inkubation für 5 min bei RT; Bestimmung der Extinktion (595 nm) im
 Mikrotiterplatten-Luminometer Synergy HT (BioTek); anhand der Standard-Eichkurve
 kann die Konzentration der Proteinproben ermittelt werden
- B2.12.4 Bestimmung der Gesamt-Proteinkonzentration mit dem BCA[™] Protein Assay Kit (Pierce)

Mit dieser Methode kann die Konzentration von Proteinproben bestimmt werden, die mit Hilfe des Luciferase Assay Systems isoliert werden.

Vorlegen von 25 µl jedes Konzentrations-Standards bzw. der Proteinproben in eine 96-Mikrotiterplatte; Zugabe von 200 µL WR zu jedem Well; Mischen der 96-Mikrotiterplatte auf einem Platten-Schüttler für ca. 30 s; Inkubation der abgedeckten 96-Mikrotiterplatte für 30 min bei 37°C; nach dem abkühlen der 96-Mikrotiterplatte auf RT Bestimmung der Extinktion (562 nm) im Mikrotiterplatten-Luminometer Synergy HT (BioTek); anhand der Standard-Eichkurve kann die Konzentration der Proteinproben ermittelt werden

B2.12.5 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Die Coomassie-Färbung wurde genutzt, um eine gleichmäßige Beladung der Polyacrylamid-Gele mit den Proteinproben zu kontrollieren.

Polyacrylamidgel mit Fixierer überschichten und für 30 min inkubieren; anschließend das Gel für 30 min im Coomassie -Farbbad anfärben; dann das angefärbte Gel mit Entfärber überschichten und für 30 min waschen; anschließend das gewaschene Gel in frischer Entfärber-Lösung bei RT ü. N. entfärben

B2.12.6 Quantifizierung des Pat-Gehaltes mit dem Pat-ELISA (Steffens Biotechnische Analyse GmbH)

Aufarbeitung des Pflanzenmaterials entsprechend B2.12.1; Vorlegen von 100 μ I/Well der Konzentrations-Standards bzw. der Proteinproben in die präparierte 96-Mikrotiterplatte; Inkubation für 30 min bei RT auf einem Schüttler (900 rpm); Waschen der Mikrotiterplatte durch Zugabe von 5 x 350 μ I Waschpuffer/Well; anschließend sofortige Zugabe von 100 μ I/Well Konjugat-Lösung; Inkubation für 30 min bei RT auf einem Schüttler (900 rpm); Waschen der Mikrotiterplatte durch Zugabe von 5 x 350 μ I Waschpuffer/Well; anschließend sofortige Zugabe von 100 μ I/Well Konjugat-Lösung; Inkubation für 30 min bei RT auf einem Schüttler (900 rpm); Waschen der Mikrotiterplatte durch Zugabe von 5 x 350 μ I Waschpuffer/Well; anschließend sofortige Zugabe von 100 μ I/Well Substrat-Lösung; Inkubation für 30 min bei RT auf einem Schüttler (900 rpm); anschließend sofortige Zugabe von 100 μ I/Well Stopp-Lösung und Mikrotiterplatte bei RT für 20 s auf einem Schüttler (900 rpm) inkubieren; Bestimmung der Extinktion (650 nm) im Mikrotiterplatten-Luminometer Synergy HT (BioTek)

B2.12.7 Nachweis der Pat-Enzymaktivität (modifiziert nach Strauch E. et al. 1988)
40-60 mg Blattmaterial in flüssigem Stickstoff mörsern; Probe in 50 μL Pat-Extraktionspuffer aufnehmen und gut vermischen; Zentrifugation: 13.000 x g ;4°C; 10 min; Überstand abnehmen; Zugabe von 5 mM Acetyl-CoA und 3,4-[14C]-D/L-Phosphinothricin (550 Bq/μL); Inkubation für 40 min bei 32°C; anschließend Reaktion für 5 min bei 100°C abstoppen; Zentrifugation: 13.000 x g ;4°C; 5 min; 4 μL des Überstandes auf Chromatographie-Platten (DC-Fertigplatten Sil G-25; MachereyNagel) auftragen; Platten in Laufkammer mit Isopropanol/Eisessig/H₂O_{dest.} (2:1:1) inkubieren; Platte trocknen und radioaktive Signale durch 10tägige Exposition auf KodakBioMax MR-Film (Sigma-Aldrich) detektieren

B2.12.8 In vivo Luciferasetest von ganzen Pflanzen, Blättern und Bakterien

- Pflanze: Die Pflanzen werden je nach Größe für 2-3h mit oder ohne Wurzeln in Luciferinlösung II bzw. III gestellt. Steril kultivierte Pflanzen müssen gegen zu starke Austrocknung geschützt werden.
- Blätter :Einzelne Blätter werden in gekippten Petrischalen mit 3 mLLuciferinlösung II bzw. III für 2-3 h inkubiert.
- Bakterien: Die Übernacht Strichkultur des zu testenden Stammes wird auf einen Nitrocellulosefilter übertragen. 1 mL der Luciferinlösung I auf eine Glasplatte auftropfen und den Nitrocellulosefilter auflegen. Inkubation für 1,5 h (Wood und DeLuca 1987).

Die Exposition erfolgt dann zwischen zwei Kopierfolien auf einem BioMax Light Film für 24-48 h (Sigma-Aldrich).

B2.12.9 Nachweis der Luciferase-Aktivität mit dem Luciferase Assay System (Promega)

200 mg Blattmaterial in flüssigem Stickstoff mörsern; Probe in 500 μ L CCLR Puffer (RT) aufnehmen und gut vermischen; Zentrifugation: 13.000 x g; 4°C; 10 min; Überstand abnehmen und 10 μ L direkt für die Messung in eine gekühlte Mikrotiterplatte gegeben; Injektion von 50 μ L Luciferase Assay Reagent (RT) im Mikrotiterplatten-Luminometer Synergy HT (BioTek); Messung der Probe über einen Zeitraum von 10 s nach einer 2 s Verzögerung

C Ergebnisse

C1 Untersuchung des Einflusses spezifischer Kombinationen regulatorischer Sequenzen aus dem *pat*41-Gen auf die Transgenexpression während eines moderaten Hitzestresses.

Zur Untersuchung, ob für die Hitze-induzierte Inaktivierung der Phosphinothricin-N-Acetyltransferase zwei regulatorische Elemente aus dem pat41-Gen vorhanden sein müssen, wurde das pat47- und das pat48-Gen erzeugt (Abb. C1 B). Hierfür wurden die regulatorischen Elemente des pat41-Gens mit der patS-Kodierregion kombiniert. Die Elemente sind wie folgt definiert. Der 5' UTR beginnt am Transkriptionsstartpunkt +1 und endet stromauf des Translationsstarts ATG der Kodierregion. Für die Untersuchungen wurden der 5' UTR41 und der 5' UTRS verwendet (Abb. C1 C). Die 3' regulatorische Region setzt sich aus zwei Bereichen zusammen. Einem kurzen synthetischen Bereich, direkt hinter dem Translationsstop und einem längeren Fragment, das direkt an dem synthetischen Bereich anschließt und mit der 'cleavage site' des jeweils verwendeten Terminators endet. Dieser Bereich wird im Folgenden als 3' Terminationssignal bezeichnet. Für die Analysen wurden das 3' Terminationssignal der Nopalinsynthetase aus Agrobacterium (A) tumefaciens (3' nos) und des Cauliflower-Mosaikvirus 35S-RNA Gens (3' camv) verwendet (Abb. C1 D). Der synthetische Bereich beginnt stromab des Translationsstops TGA der Kodierregion und reicht bis zum Beginn des Terminationssignals der Transkription. Dieser Bereich wird im Folgenden als 3' UTR bezeichnet. In dieser Arbeit wurde der 3' UTR41 genutzt (Abb. C1 C). Mit dem *pat*47-Gen und *pat*48-Gen konnte untersucht werden, ob neben der Kombination der 5' UTR41 mit dem 3' nos im pat43-Gen (Köhne S. et al. 1998) auch eine Kombination der 5´ UTR41 bzw. des 3´ nos mit der 3´ UTR41 zu einer Integrationsort unabhängigen Inaktivierung des pat-Gens unter erhöhten Kultivierungstemperaturen führen kann (Kap. A3). Zudem konnte mit diesen Konstrukten auch die noch offene Frage beantwortet werden, ob die 3' UTR41 allein oder in Kombination mit weiteren regulatorischen Elementen überhaupt zu einer Hitze-spezifischen Reaktion führen kann.

Die *pat*-Konstrukte wurden stabil in das Genom von *N. tabacum* überführt und die erzeugten Transformanden molekularbiologisch charakterisiert. Neben der qualitativen und quantitativen Bestimmung des Pat-Proteins wurde auch die Aktivität der Phosphinothricin-*N*-Acetyltransferase gemessen. Weiterhin wurde in ausgewählten Events der spezifische Transkript-Gehalt und die Kopienzahl des *pat*S-Gens in bestimmt.

C Ergebnisse



Abbildung C1: Darstellung der erstellten pat-Konstrukte und Vergleich der regulatorischen Sequenzen

A Schematische Darstellung eines eukaryotischen Gens **B** Schematische Darstellung des *pat*47- und *pat*48-Gens **C** Unterschiede in den 5' und 3' untranslatierten Regionen der verschiedenen *pat*-Gene **D** Sequenzvergleich des 3' *nos* und 3' *camv*. Regulatorische Bereiche des 3' *nos* und 3' *camv* wurden durch Bevan et al. (1983) bzw. durch Sanfaçon et al. (1991) charakterisiert. 'AATAAA-like' Motive sind eingerahmt, T-/TG reiche Regionen sind unterstrichen. Gefüllte und offene Pfeile über der dritten TG-reichen Region im 3' *camv* Fragment zeigen die perfekten und imperfekten Wiederholungen der Sequenz TTTGTA. Dicke vertikale Pfeile zeigen die genutzte 'cleavage site'. Dünne vertikale Pfeile zeigen putative 'cleavage sites' im 3' *camv* Fragment. +1, Transkriptionsstart; CaMV_{823/534}, 823 bp und 524 bp langer funktioneller Promotorbereich des Cauliflower-Mosaikvirus 35S-RNA Gens; *pat*41, 5'-3' modifiziertes Phosphinothricin-*N*-Acetyltransferase Gen aus *S. viridochromogenes* (Broer I. 1989); 3' *nos*, Terminationssignal der Transkription des Nopalinsynthasegens aus *A. tumefaciens* (Dhaese P. et al. 1983); *pat*S, Kodierbereich des synthetischen Phosphinothricin-*N*-Acetyltransferase Gens (Eckes P. et al. 1989); 3' *camv*, Terminationssignal der Transkription des Cauliflower-Mosaikvirus 35S-RNA Gens (Eckes P. et al. 1989).

C1.1 Klonierung des pat47- und pat48-Gens

C1.1.1 Klonierung des binären Transformationsvektors pTLpat47

Um die 5' UTR41 mit dem 3' nos zu kombinieren, musste basierend auf dem *pat*44-Gen für das *pat*47-Gen die 3' UTRS gegen die 3' UTR41 substituiert werden (Abb. C2). Zunächst wurde durch eine *Bg/II/KpnI* Doppelrestriktion des *pat*44-Gens im Zielvektor pLH44 die 3' UTRS mit dem 3' *camv* entfernt und das geöffnete *pat*44-Gen aufgereinigt [B2.9]. Durch die *Bg/II/KpnI* Doppelrestriktion des *pat*45-Gens im Subvektor pDH45 konnte ein 251 bp großes Fragment mit der 3' UTR41 und dem 3' *camv* nach dessen Aufreinigung gerichtet in das zuvor geöffnete *pat*44-Gen integriert werden. Anschließend wurde das *pat*47-Gen im neu erstellten Vektor pTLpat47 in *Escherichia* (*E.*) *coli* TG1 überführt und die erhaltenen Klone auf Kanamycin selektioniert. Mit Hilfe einer spezifischen PCR [B2.10] konnte das *pat*47-Gen

in den erhaltenen Klonen nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Im Klon TG1/TLpat47.5 wurde die korrekte Sequenz des veränderten Bereiches im *pat*47-Konstrukt durch zwei unabhängige Sequenzierungen [B2.11] bestätigt (Anhang Kap. F5.1).



Abbildung C2: Klonierschema des binären Transformationsvektors pTLpat47

A *Bglll/Kpnl* Doppelrestriktion des *pat*44-Gens im Zielvektor pLH44 **B** Entfernung des 3' UTR41-3' *camv* Fragmentes aus dem *pat*45-Gen durch eine *Bg/ll/Kpnl* Doppelrestriktion **C** Kombination der 5' UTR41 mit dem 3' UTR41 im *pat*47-Gen durch die gerichtete Integration des *Bg/ll-3'* UTR41-3' *camv-Kpnl* Fragments in das geöffnete *pat*44-Gen

Der Zielvektor pLH44 ist ein Derivat des binären Transformationsvektors pLH9000 und somit konnte der pTLpat47 direkt für die Tabaktransformation eingesetzt werden. Hierfür wurde der Vektor aus dem Klon TG1/TLpat47.5 isoliert [B2.4] und mit Hilfe der Gefrierschocktransformation [B2.3.2] in A. tumefaciens LBA4404 überführt. Die Selektion der transformierten Agrobakterien erfolgte auf Spectinomycin und Streptomycin. Wie in Abbildung C3 B dargestellt, konnte im Klon LBA4404/TLpat47.1 mit Hilfe einer spezifischen PCR das pat47-Gen nachgewiesen werden. Zudem wurde mit Hilfe der ERIC-PCR [B2.3.2] dessen Zugehörigkeit zum Agrobakterien-Stamm LBA4404 bestätigt (Abb. C3 C).





A Bindestellen der Primer für die spezifische Amplifikation im *pat*47-Gen. Das korrekte Amplifikat besitzt eine Größe von ca. 657 bp. **B** Gelelektrophoretische Auftrennung der spezifischen Amplifikation vom Klon LBA4404/TLpat47.1 (1). Als positive Kontrolle diente der Subvektor pDH45 (P). Ein religierter Klon aus der Transformation diente als negative Kontrolle (R). Ein Ansatz ohne Template diente als Kontrolle der verwendeten Komponenten für die PCR (K). **C** Gelelektrophoretische Auftrennung der ERIC-PCR vom Klon LBA4404/TLpat47.1 (4). Als Kontrolle wurden folgende Wildtyp Bakterienstämme mitgeführt: *E. coli* TG1 (1), *A. tumefaciens* HV C58/C1 (2) und *A. tumefaciens* LBA 4404 (3) Als Größenstandart wurde der 100 bp Ladder Mix von Fermentas mitgeführt (M).

C1.1.2 Klonierung des binären Transformationsvektors pTLpat48

Um die 3' UTR41 mit dem 3' *nos* zu kombinieren, musste basierend auf dem *pat*45-Gen für das *pat*48-Gen der 3' *camv* gegen den 3' *nos* substituiert werden (Abb. C4). Zunächst wurde aus dem *pat*45-Gen im Subvektor pDH45 der 3' *camv* durch eine *SphI/SacI* Doppelrestriktion entfernt und der geöffnete Zielvektor aufgereinigt. Durch die *SphI/SacI* Doppelrestriktion des *pat*46-Gens im Subvektor pDH46 konnte der ca. 260 bp große 3' *nos* nach dessen Aufreinigung gerichtet in das zuvor geöffnete *pat*45-Gen integriert werden.



Abbildung C4: Klonierschema des binären Transformationsvektors pTLpat48

A Sphl/Sacl Doppelrestriktion des pat45-Gens im Zielvektor pDH45 B Erhalt des 3' nos aus dem pat46-Gen im Subvektor pDH46 durch Sphl/Sacl Doppelrestriktion C Kombination des 3' UTR41 mit dem 3' nos im pat48-Gen durch die gerichtete Integration des Sphl-3' nos-Sacl Fragments in das geöffnete pat45-Gen D Restriktion des pat48-Gens aus dem Subvektor pDH48 E Öffnung des binären Pflanzentransformationsvektor pLH9000 mit EcoRI F Ungerichtete Integration des EcoRI-pat48-EcoRI Fragmentes in den geöffneten pLH9000

Nach der Überführung des neuen Subvektors pDH48 mit dem *pat*48-Gen in *E. coli* TG1 wurden die erhaltenen Klone auf Kanamycin selektioniert. Wie in Abb. C5 B dargestellt wurde mit einer spezifischen PCR im Klon TG1/DH48.1 das *pat*48-Gen nachgewiesen und anschließend die Sequenz des veränderten Bereiches durch zwei unabhängige Sequenzierungen bestätigt (Anhang Kap. F5.2).

Um das *pat*48-Gen stabil in das pflanzliche Genom integrieren zu können, wurde dieses mit *EcoR*I aus dem Subvektor pDH48 ausgeschnitten und in den ebenfalls mit *EcoR*I geöffneten pLH9000 integriert. Anschließend wurde der neu erstellte Pflanzentransformationsvektor pTLpat48 in *E. coli* TG1 überführt, die erhaltenen Klone auf Kanamycin selektioniert und das *pat*48-Gen über eine spezifische PCR im Klon TG1/TLpat48.1 nachgewiesen (Ergebnisse nicht gezeigt).

Nach der Isolation des korrekten pTLpat48 aus dem Klon TG1/TLpat48.1 wurde dieser über eine Gefrierschocktransformation in *A. tumefaciens* LBA4404 überführt und die erhaltenen Klone auf Streptomycin und Spectinomycin selektioniert. Wie in Abbildung C5 C und D dargestellt, konnte anschließend im Klon LBA4404/TLpat48.1 mit Hilfe einer spezifischen PCR das *pat*48-Gen nachgewiesen und die Zugehörigkeit zum Agrobakterienstamm LBA4404 mit Hilfe der ERIC-PCR bestätigt werden.





A Bindestellen der Primer für die spezifische Amplifikation im *pat*48-Gen. Das korrekte Amplifikat besitzt eine Größe von ca. 736 bp. **B** Gelelektrophoretische Auftrennung der spezifischen Amplifikation vom Klon TG1/DH48.1 (1). **C** Gelelektrophoretische Auftrennung der spezifischen Amplifikation vom Klon LBA4404/TLpat48.1 (1). Als positive Kontrolle diente der Subvektor pDH46 (P). Ein Ansatz ohne Template diente als Kontrolle der verwendeten Komponenten für die PCR (K). **D** Gelelektrophoretische Auftrennung der ERIC-PCR vom Klon LBA4404/TLpat48.1 (4). Als Kontrolle wurden folgende Wildtyp Bakterienstämme mitgeführt: *E. coli* TG1 (1), *A. tumefaciens* HV C58/C1 (2) und *A. tumefaciens* LBA 4404 (3). Als Größenstandart wurde der 100 bp Ladder Mix von Fermentas mitgeführt (M).

C1.2 Nachweis der *pat*-Gene und ihrer Expression *in planta*

C1.2.1 Stabile Integration des pat47- und pat48-Gens in Nicotiana tabacum

Die Integration der *pat*-Konstrukte erfolgte in den Modellorganismus *N. tabacum* Petit Havana. Hierbei handelt es sich um eine Pflanze, die einfach zu kultivieren ist und hohe Transformationsraten aufweist. Weiterhin kann man den Tabak sehr gut klonieren. Die stabile Integration in das Tabakgenom erfolgte mit Hilfe der Blattscheiben Transformation [B2.3.3] nach Horsch et al. (1985) und ist in Abb. C6 einmal schematisch dargestellt. Für die Transformation wurden die in Kap. C1.1.1 und C1.1.2 erzeugten Agrobakterien mit dem *pat*47- bzw. *pat*48-Gen verwendet. Um einen Einfluss der Transgene auf die Regeneration des Tabaks untersuchen zu können, wurde auch der binäre Transformationsvektor pLH9000 ohne das Zielgen (Leervektor) transformiert.



Abbildung C6: Schematische Darstellung der Blattscheibentransformation von N. tabacum

A Kokultivierung der Blattexplantate mit *A. tumefaciens* **B** Kultivierung der Explantate auf Regenerationsmedium. Bildung von Kallusgewebe und Sprossen **C** Kultivierung der erhaltenen Regeneranten auf Selektionsmedium.

Insgesamt wurden 13 unabhängige Transformationen durchgeführt. Davon waren aufgrund mikrobieller Kontaminationen für das *pat*47- und *pat*48-Konstrukt acht bzw. 12 Transformationen auswertbar. Um die Regenrationsraten der einzelnen Transformationen zu bestimmen, wurde für jede eingebrachte T-DNA die Anzahl der Sprosse pro Explantat ermittelt (Anhang Tab. F1). In Tab. C1 sind exemplarisch die Regenerationsraten von drei Transformationen dargestellt und die Raten aller auswertbaren Transformationen im Mittel zusammengefasst.

Tabelle C1: Darstellung der Regenerationsdaten der *pat*-Gene und des Leervektors in *N. tabacum* Die Anzahl der gebildeten Kalli und Sprosse wurden nach 6 Wochen Inkubation von den Explantaten auf ACB-Medium mit 100 mg/L Kanamycin bonitiert und die Anzahl der Sprosse pro Explantat bestimmt. Die Regenerationsdaten wurden im Mittel für jede T-DNA von den auswertbaren Transformationen zusammengefasst.

Transformation	T-DNA	Explantate	Kalli	Kalli/Explantat	Sprosse	Sprosse/Explantat
2	LH9000	19	75	3,95	51	2,68
	TLpat47	25	77	3,08	45	1,80
	TLpat48	20	67	3,35	41	2,05
4	LH9000	25	55	2,20	43	1,72
	TLpat47	25	57	2,28	34	1,36
	TLpat48	30	73	2,43	40	1,33
13	LH9000	30	109	3,63	36	1,20
	TLpat47	30	96	3,20	37	1,23
	TLpat48	30	100	3,33	20	0,67
Gesamt	LH9000	13	1,00 ± 0,81			
	TLpat47	8	0,87 ± 0,61			
	TLpat48	12	1,22 ± 0,57			

Für das *pat*47- und *pat*48-Konstrukt lagen die Regenerationsraten im Mittel bei 0,87 \pm 0,61 bzw. 1,22 \pm 0,57 Sprosse/Explantat. Wie zu erwarten, kam es innerhalb eines Konstruktes zu den für Tabak üblichen Schwankungen (Hühns M. et al. 2008). Im direkten Vergleich konnte kein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden eingebrachten Konstrukten gezeigt werden. Für den Leervektor lagen die Regenerationsraten im Mittel bei 1,00 \pm 0,81 Sprosse/Explantat. Auch hier kam es zu den für Tabak bekannten Schwankungen. Die Raten des Leervektors lagen innerhalb der Schwankungsbreiten von dem *pat*47- und *pat*48-Konstrukt und somit konnte kein spezifischer Einfluss der eingebrachten Zielgene auf die Regeneration beobachtet werden.

Bei den Sprossen eines Kallus handelt es sich möglicherweise um dasselbe Transformationsevent, so dass von jedem Kallus nur ein Spross abgenommen wurde. Insgesamt wurden für das *pat*47-Konstrukt 98 Sprosse umgesetzt, von denen 49 auf dem Selektionsmedium bewurzelten und regenerierten. Für das *pat*48-Konstrukt konnten 209 Sprosse umgesetzt werden, von denen 94 regenerierten. Wie in Abb. C7 exemplarisch für einige Linien dargestellt, konnte anschließend mit Hilfe einer spezifischen PCR in 35 Linien das *pat*47-Gen und in 63 Linien das *pat*48-Gen nachgewiesen werden.



Abbildung C7: Nachweis der pat-Konstrukte in planta

A Bindestellen der Primer für die spezifische Amplifikation im *pat*47- und *pat*48-Gen. Das korrekte Amplifikat besitzt eine Größe von ca. 680 bp bzw. ca. 735 bp. B Gelelektrophoretische Auftrennung der spezifischen Amplifikation von den Linien SRI/47-18, -51, -54, SRI/48-30, -39,- 95 und -97. Als positive Kontrolle diente Plasmid-DNA aus dem Klon TG1/TLpat47.5 bzw. TG1/TLpat48.1 (P). Ein Ansatz ohne Template diente als Kontrolle der verwendeten Komponenten für die PCR (K). Als Größenstandart wurde der 100 bp Ladder Mix von Fermentas mitgeführt (M)

Die transgenen Pflanzen wurden sowohl *in vitro* in einer Klimakammer als auch in Erde im Gewächshaus für die weiteren Untersuchungen unter den Standard-Kultivierungsbedingungen angezogen [B2.1.2]. Wie in Abb. C8 exemplarisch für einige Linien

dargestellt, waren die transgenen Pflanzen unabhängig von der Kultivierungsform phänotypisch nicht von den Pflanzen mit dem Leervektor und der nah isogenen Variante zu unterscheiden. Somit konnte phänotypisch kein Einfluss der eingebrachten Transgene auf die Entwicklung der Pflanzen beobachtet werden. Für eine bessere Zuordnung wurden die Tabakpflanzen mit dem *pat*47- und dem *pat*48-Gen als SRI/47 bzw. SRI/48 bezeichnet. Die Pflanzen mit dem Leervektor wurden als SRI/9000 gekennzeichnet.



Abbildung C8: Darstellung ausgewählter Tabakpflanzen mit dem *pat*47- und *pat*48-Gen Exemplarisch für die erzeugten transgenen Tabakpflanzen sind die Linien SRI/47-18, -51, SRI/48-30 und -95 dargestellt. Unabhängig von der Kultivierungsform unterscheiden sich diese in ihrem Phänotyp nicht von den Pflanzen mit dem Leervektor und der nah isogenen Variante (niV).

C1.2.1.1 Phänotypischer Nachweis der Acetyltransferase Aktivität in den transgenen Tabakpflanzen

Um die Funktionalität der Phosphinothricin-N-Acetyltransferase in den neu erzeugten Pflanzen untersuchen zu können, wurden diese *in vitro* mit dem Breitbandherbizid BASTA® der Firma Bayer behandelt. Die Pflanzen wurden 10 Tage lang jeden zweiten Tag mit einer verdünnten und sterilfiltrierten BASTA-Lösung besprüht. Die Verdünnung wurde entsprechend Köhne et al. (1998) so gewählt, dass die Endkonzentration des toxischen Wirkstoffes L-Phosphinothricin (L-Pt) in der Sprühlösung 10 mg/L betrug. Als Kontrollen wurden die nah isogene Variante und eine Herbizid-resistente Tabakpflanze mit dem *pat*43-Gen (SRI/43) unter den gleichen Bedingungen mitgeführt.

Die Applikation der BASTA-Lösung auf die nah isogene Variante führte zum Tod der Pflanze (Abb. C9 niV). Schon nach der ersten Behandlung waren diese deutlich geschädigt. Wie zu erwarten zeigten die SRI/43 Pflanzen über den gesamten Versuchszeitraum keine sichtbaren Schädigungen (Abb. C9 SRI/43). Im Gegensatz zur nah isogenen Variante waren diese in der Lage das toxische L-Pt zu acetylieren. Wie in Abb. C9 exemplarisch für einige

Linien dargestellt, wurde auch bei keiner der untersuchten SRI/47 und SRI/48 Pflanzen über den gesamten Versuchszeitraum sichtbare Schädigungen beobachtet. Somit konnte durch die stabile Integration des *pat*47- bzw. *pat*48-Gens Herbizid-resistente Tabakpflanzen erzeugt werden.



Abbildung C9: Phänotypischer Resistenztest ausgewählter Tabakpflanzen mit dem pat47- und pat48-Gen Exemplarisch für die untersuchten Tabakpflanzen sind die Linien SRI/47-18, -51, SRI/48-30 und -95 dargestellt. Sowohl bei der Herbizid-resistenten Linie SRI/43 als auch bei den transgenen Linien konnte trotz mehrfacher Herbizidapplikation über einen Zeitraum von 10 Tagen keine sichtbaren Schädigungen beobachtet werden. Die Behandlung der nah isogenen Variante (niV) führte dagegen schon nach kurzer Zeit zu deutlichen Schädigungen.

C1.2.2 Inkubation der Tabakpflanzen unter erhöhten Temperaturbedingungen

Um die Auswirkung des moderaten Hitzestresses auf das Resistenzverhalten der neuen transgenen Pflanzen untersuchen zu können, wurden diese dem Hitzestress unterzogen [B2.1.3] und jeden zweiten Tag mit 10 mg/L L-Pt behandelt. Um die Versuchsbedingungen kontrollieren zu können, wurden die nah isogene Variante und Herbizid-resistente SRI/43 Pflanzen mitgeführt.

Im Gegensatz zu den isogenen Kontrollen bei 24°C, bildeten die Pflanzen unter Hitze eine verdickte Kutikula aus. Zudem konnte bei einigen dieser Pflanzen auch vereinzelt Lanzettartige Blätter beobachtet werden (Abb. C10, SRI/48-30). Diese morphologischen Veränderungen wurden sowohl bei den transgenen Pflanzen als auch bei der nah isogenen Variante beobachtet.

Wie zu erwarten, führte die Erhöhung der Kultivierungstemperatur auf 37°C bei den SRI/43 Pflanzen zum Verlust der Herbizid-Resistenz (Abb. C10 SRI/43). Ähnlich wie bei der nah isogenen Variante, kam es schon nach der ersten Herbizidbehandlung zu deutlichen Schädigungen der Pflanzen (Abb. C10 niV). Wie in Abb. C10 exemplarisch für einige Linien dargestellt, konnte dagegen bei keiner der untersuchten SRI/47 und SRI/48 Pflanzen sichtbare Schädigungen unter Hitze beobachtet werden. Trotz der mehrfachen Applikation mit dem toxischen L-Pt, führte die Erhöhung der Kultivierungstemperatur von 24°C auf 37°C nicht zum Verlust der Herbizid-Resistenz.



Abbildung C10: Phänotypischer Resistenztest gegenüber BASTA® ausgewählter SRI/47 und SRI/48 Linien nach einem moderatem Hitzestress.

A Darstellung eines Hitzestressversuches. (1) Getrennte Anzucht von Klonen bei 24°C. (2) 10 tägige Kultivierung eines Klons bei 37°C in einer Hitzekammer. (3) Anzucht des zweiten Klons parallel bei 24°C als Kontrolle **B** Exemplarisch für die untersuchten Pflanzen sind die Linien SRI/47-18, -51, SRI/48-30 und -95 dargestellt. Bei keiner dieser Pflanzen führte die Inkubation bei 37°C zum Verlust der Herbizid-Resistenz. Dagegen waren bei den SRI/43 Pflanzen ähnlich wie bei der nah isogenen Variante (niV) schon nach kurzer Zeit deutliche Schädigungen zu beobachten.

C1.2.3 Nachweis des Pat-Proteins und Bestimmung der Phosphinothricin-*N*-Acetyltransferase Aktivität in den transgenen Pflanzen

Unabhängig von der Kultivierungstemperatur konnte bei den untersuchten SRI/47 und SRI/48 Pflanzen ein Herbizid-resistenter Phänotyp gezeigt werden. Untersuchungen von Tabakpflanzen mit dem *pat*44- (Kerbach S. 1999) und *pat*44-Gen (unv. Ergebnisse) zeigten aber, dass auch geringste Mengen an Pat-Protein für die Aufrechterhaltung der Herbizid-Resistenz ausreichend sind. Daher wurde untersucht, ob die Temperaturerhöhung einen Einfluss auf die Menge und Aktivität des Pat-Proteins in den SR/47 und SRI/48 Pflanzen hat. Die Pflanzen wurden zunächst dem 10tägigen Hitzestress unterzogen, direkt im Anschluss beprobt und das gesamtlösliche Protein aus dem Blattmaterial isoliert [B2.12.1]. Um eine höchst mögliche Vergleichbarkeit gewährleisten zu können, wurde darauf geachtet für die Beprobung stets Blätter in annähernd gleichen Entwicklungsstadien zu ernten. Zudem wurde darauf geachtet, dass es sich um keine sehr jungen, noch nicht voll entfalteten bzw. schon seneszenten Blätter handelt, da Vorversuche gezeigt haben, dass das Pat steady state Level in diesen Blättern stark schwanken kann (Ergebnisse nicht gezeigt). Das Pat-Protein wurde wie in B2.8 beschrieben über einen polyklonalen Antikörper nachgewiesen. Die ungefähre

Aktivität der Phosphinothricin-*N*-Acetyltransferase konnte mit dem Pat-Test abgeschätzt werden [B2.12.7]. Um einen möglichen Einfluss der Kultivierungstemperatur auf das Pat steady state Level in den transgenen Pflanzen zeigen zu können, wurden der Gehalt und die Aktivität des Pat-Proteins in den Pflanzen unter Hitze bestimmt und mit den Klonen bei 24°C verglichen. Als Kontrolle wurden die nah isogene Variante und Hitze-sensitive SRI/43 Pflanzen mitgeführt. Es wurden jeweils fünfzehn SRI/47 und SRI/48 Linien untersucht und die im Folgenden dargestellten Ergebnisse konnten in mindestens drei unabhängigen Hitzestressversuchen reproduziert werden.



Abbildung C11: Nachweis des Pat-Proteins und der Enzymaktivität in ausgewählten SRI/47 Linien unter Hitze.

A Das Pat-Protein (20 kDa) wurde nach der Auftrennung in einer SDS-PAGE mit einem polyklonalen Antikörper hybridisiert und durch einen enzymatischen Farbumschlag visualisiert. **B** Durch die Zugabe von [14C] L-Pt zu einem Proteingemisch, konnte nach der Auftrennung der Metabolite in einer Dünnschichtchromatographie das umgesetzte L-*N*-ac-Pt detektiert und somit indirekt die Aktivität der Phosphinothricin-*N*-Acetyltransferase abgeschätzt werden.

Exemplarisch für die Hitze-sensitiven Pflanzen sind die Ergebnisse der Linien -23, -46 und -49 dargestellt. Verglichen mit den isogenen 24°C Kontrollen, konnte in den Klonen bei 37°C eine deutliche Reduktion der Pat-Proteinmengen und der spezifischen Substratumsetzung beobachtet werden. In den Hitze-stabilen Linien -54 und -77 waren die Pat-Proteinmengen und Substratumsetzungen unter Hitze annähernd gleich mit denen der isogenen 24°C Kontrollen.

niV, nah isogene Variante; Pat, Phosphinothricin-*N*-Acetyltransferase (23 kDa); L-Pt, L-Phosphinothricin; L-*N*-ac-Pt, L-*N*-acetyl-phosphinothricin; MPP, 3-methyl-phosphinico-Propansäure

Wie zu erwarten, konnte in der Kontrolllinie SRI/43 unter Hitze kein Pat-Protein und somit auch keine Substratumsetzung detektiert werden (Abb. C11 A/B). In 14 der 15 bei 24°C getesteten Linien mit dem *pat*47-Gen konnte das Pat-Protein unterschiedlich stark nachgewiesen werden. Diese Pflanzen waren auch alle in der Lage unterschiedlich viel Substrat umzusetzen. Verglichen dazu führte in 4 Linien die Inkubation der Klone bei 37°C zu einer deutlichen Reduktion der Substratumsetzung (Hitze-Sensitiv, Abb. C11 A). Darüber hinaus konnte in diesen Pflanzen auch eine deutliche Abnahme des Pat-Proteins detektiert werden (Abb. C11 B). Zudem wurde unabhängig von der Umgebungstemperatur in der Linie -18 weder das Pat-Protein noch eine Substratumsetzung beobachtet, obwohl diese in den

vorhergegangenen Untersuchungen sowohl bei 24°C als auch bei 37°C einen Herbizidresistenten Phänotyp aufwiesen (Abb. C10 B). Verglichen mit den 24°C Kontrollen, konnte in den Klonen der übrigen 10 Linien unter Hitze annähernd gleiche Pat-Proteinmengen und spezifische Enzymaktivitäten nachgewiesen werden (Hitze-Stabil).

In allen bei 24°C getesteten SRI/48 Linien konnten unterschiedliche Mengen des Pat-Proteins und verschieden starke Substratumsetzungen detektiert werden. Verglichen mit den isogenen 24°C Kontrollen, wurden in den Klonen von 12 Linien auch unter Hitze annähernd gleiche Mengen und Aktivitäten des Pat-Proteins nachgewiesen. Dagegen konnte in den Klonen von 3 Linien ein Unterschied durch die Hitzebehandlung beobachtet werden (Abb. C12). In der Linie -5 kam es zu einer deutlichen Abnahme des Pat-Proteins bei gleichzeitiger Reduktion der Enzymaktivität. Bei den Linien -30 und -39 konnte keine Pat-Aktivität mehr detektiert werden. Zudem wurde in der Linie -39 auch kein Pat-Protein mehr detektiert. Dagegen kam es in der Linie -30 zu einer deutlichen Abnahme des Pat-Proteins. Dennoch waren auch diese Linien unter Hitze resistent gegenüber dem Herbizid (Abb. C10 B).

Verglichen mit den SRI/43 Pflanzen konnte zusammenfassend gezeigt werden, dass es in keiner der untersuchten Linien zu einem Hitze-induzierten Verlust des Pat-Proteins bzw. der Pat-Aktivität und einem sich daraus resultierenden Resistenzverlust kommt. Wie auch in den SRI/44 und SRI/46 Pflanzen nachgewiesen, führte die Erhöhung der Temperatur von 24°C auf 37°C nur in einigen Linien zu einer Abnahme des Pat steady state Levels.





Exemplarisch für die Hitze-stabilen Pflanzen sind die Ergebnisse der Linien -95 und -97 dargestellt. In den Klonen unter Kontrollbedingungen und bei 37°C wurden annähernd gleiche Pat-Proteinmengen (A) und Enzymaktivitäten (B) detektiert. In den Hitze-sensitiven Linien -5, -30 und -39 kam es in den Klonen unter Hitze zu deutlichen Reduktionen des Pat steady state Levels.

niV, nah isogene Variante; Pat, Phosphinothricin-*N*-Acetyltransferase (23 kDa); L-Pt, L-Phosphinothricin; L-*N*-ac-Pt, L-*N*-acetyl-phosphinothricin; MPP, 3-methyl-phosphinico-Propansäure

C1.2.4 Quantifizierung des Pat-Proteins in ausgewählten Linien

Der Nachweis des Pat-Proteins im Western-Blot-Verfahren lässt keine Rückschlüsse auf die absolute Menge des Proteins in den Pflanzen zu. Um zu untersuchen, ob es eine Korrelation zwischen der Ausgangsmenge des Proteins in den Pflanzen bei 24°C (Grundexpression) und der Reduktion unter Hitze gibt, wurde das Pat-Protein mit einem spezifischen ELISA quantifiziert [B2.12.6]. Von den in Kap. C1.2.3 untersuchten Linien wurden einzelne Hitze-stabile und -sensitive Linien jedes Transformationsevent ausgewählt und unter den Standard-Kultivierungsbedingungen angezogen. In drei Klonen von jeder Linie wurde der Pat-Gehalt bei 24°C bestimmt und auf einen Milligramm des gesamtlöslichen Proteins (GLP) bezogen. Alle durchgeführten Messungen sind in Tab. C2 dargestellt.

Der Pat-Gehalt in den sechs untersuchten SRI/47 Linien lag im Mittel bei 20,85 ± 9,63 ng Pat / mg GLP. Die Grundexpression in den untersuchten Hitze-sensitiven Linien -23 und -26 lag mit 29,43 ± 6,23 bzw. 15,83 ± 4,40 ng Pat/ mg GLP im mittleren und oberen Bereich, so dass keine Korrelation zu der Reduktion unter Hitze aufgezeigt werden konnte. In der Linie -18, in der weder bei 37°C noch unter den Kontrollbedingungen das Pat-Protein oder eine Enzymaktivität detektiert wurde, konnte in einem Klon ein Pat-Gehalt von 8,16 ng Pat / mg GLP bestimmt werden. In den anderen Klonen war kein Pat-Protein zu quantifizieren. Da aber die getesteten Klone dieser Linie immer einen resistenten Phänotyp aufwiesen (Abb. C10 B), muss der Pat-Gehalt in diesen Klonen unterhalb der Nachweisgrenze des ELISA gelegen haben.

In den neun untersuchten SRI/48 Linien lag der Pat-Gehalt im Mittel bei 23,59 ± 11,93 ng Pat / mg GLP. Verglichen mit dem Mittelwert der SRI/47 Linien bestand aufgrund der großen Schwankungsbreiten kein wesentlicher Unterschied zwischen beiden Transformationsevents. In der Hitze-sensitiven Linie -30 konnte nur in einem Klon ein Pat-Gehalt von 1,04 ng Pat / mg GLP bestimmt werden. Wie schon in der Linie SRI/47-18 beobachtet, muss der Pat-Gehalt in den restlichen Klonen dieser Linie unterhalb der Nachweisgrenze des ELISA gelegen haben, da auch diese resistent gegenüber BASTA® waren (Abb. C10 B). Wie in Abb. C12 dargestellt, könnte in der Linie -30 die Hitze-induzierte Reduktion des Pat-Proteins und der Enzymaktivität mit der geringen Grundexpression erklärt werden. Dagegen lag der Pat-Gehalt in der Hitze-sensitiven Linie -5 aber mit 32,86 ± 9,00 ng Pat / mg GLP im oberen Bereich aller untersuchten SRI/48 Linien und auch über den Gehalt einiger Hitze-stabilen Linien.

Grundsätzlich konnte mit den Untersuchungen gezeigt werden, dass keine Korrelation zwischen der Grundexpression des Pat-Proteins und dessen Reduktion unter Hitze auftritt. Weiter konnte gezeigt werden, dass es bei den Messungen zwischen den Klonen einer Linie zu unterschiedlich starken Schwankungen kommt. Da stets versucht wurde annähernd

48

gleiche Kultivierungs- und Versuchsbedingungen einzuhalten, scheint der allgemeine physiologische Zustand der Klone Einfluss auf die Grundexpression zu nehmen.

Tabelle C2: Quantifizierung des Pat-Proteins in ausgewählten SRI/47 und SRI/48 Pflanzen bei 24°C

Mit Hilfe eines spezifischen ELISA wurde das Pat-Protein in ausgewählten Hitze-stabilen und -sensitiven Linien beider Konstrukte gemessen und der Gehalt auf einen Milligramm des gesamtlöslichen Proteins (GLP) bezogen. Von jedem Event wurden drei voneinander unabhängige Klone vermessen und der Pat-Gehalt gemittelt. n.d., nicht detektiert

ng Pat/mg GLP

Konstrukt	Linie	Pat-Protein bei 37 °C	Klon I	Klon II	Klon III	statistisches Mittel	
pat47	- 6	unverändert	31,38	36,61	20,40	29,46 ± 8,27	
	- 8	unverändert	18,20	14,31	11,90	14,80 ± 3,18	
	- 18	n. d.	n. d.	8,16	n. d.		
	- 22	unverändert	19,39	31,31	6,15	18,95 ± 12,59	
	- 23	reduziert	35,90	28,93	23,47	29,43±6,23	
	- 26	reduziert	16,87	19,61	11,00	15,83 ± 4,40	
pat48	- 5	reduziert	43,21	26,91	28,42	32,86 ± 9,00	
	- 6	unverändert	34,60	38,80	22,58	31,99 ± 8,42	
	- 14	unverändert	42,24	31,07	27,81	33,71 ± 7,57	
	- 19	unverändert	42,32	40,01	27,81	36,71 ± 7,80	
	- 20	unverändert	15,62	14,93	10,15	13,57 ± 2,98	
	- 21	unverändert	13,11	14,57	8,46	12,05 ± 3,19	
	- 22	unverändert	26,17	17,85	17,29	20,44 ± 4,97	
	- 24	unverändert	16,29	17,92	10,61	14,94 ± 3,84	
	- 30	reduziert	1,04	n. d.	n. d.	-	

C1.2.5 Etablierung einer effizienten Methode für die Quantifizierung der patS-mRNA

Um zu untersuchen, ob es eine Korrelation zwischen der Hitze-induzierten Reduktion des Transgens auf Protein-Ebene und der spezifischen Transkriptmenge gibt, sollte diese in den Pflanzen unter Hitze bestimmt und mit denen der isogenen 24°C Kontrollen verglichen werden.

Zunächst wurde versucht mit Hilfe von Northern-Blot Analysen [B2.8] die *pat*S-mRNA in den transgenen Pflanzen nachzuweisen. Nach einem Hitzestressversuch wurde direkt im Anschluss die Pflanzen beprobt, die Gesamt-RNA isoliert [B2.6] und gelelektrophoretisch aufgetrennt [B2.7]. Um eine höchst mögliche Vergleichbarkeit gewährleisten zu können, wurde wieder darauf geachtet für die Beprobung stets Blätter in annähernd gleichen

Entwicklungsstadien zu ernten. Anschließend wurde die RNA auf eine Nylonmembran übertragen. Der Nachweis der *pat*S-mRNA erfolgte über eine 503 bp lange Sequenz-spezifische, Digoxigenin-markierten [B2.10] DNA-Sonde. Zusätzlich wurde die Aktin-mRNA als interner Mengenstandard mit einer 836 bp lange Digoxigenin-markierten Sonde nachgewiesen. Aktin ist auch unter verschiedeneren Stressbedingungen ein eher stabil expremierendes Endogen (Schmidt G. W. und Delaney S. K. 2010) und somit speziell für die Untersuchungen der Hitze-behandelten Linien und für den Vergleich mit den jeweiligen isogenen 24°C Kontrollen geeignet.

Nach den ersten Versuchen stellte sich heraus, dass sich das Northern-Blot Verfahren nicht für diese Untersuchungen eignete. Wie in Abb. C13 exemplarisch dargestellt, lag der *pat*S-Transkript-Gehalt in einigen der untersuchten Linien unter der Nachweisgrenze dieser Detektionsmethode. Zudem konnten die Ergebnisse auch nur bedingt in einigen Linien reproduziert werden. Weiterhin war aufgrund der unspezifischen Hintergrundsignale keine densitometrische Messung der spezifischen Signale möglich, um so den *pat*S-Transkript-Gehalt bestimmen zu können.



Abbildung C13: Nachweis der spezifischen *pat*S- und Aktin-mRNA in transgenen Tabakpflanzen Exemplarisch für die durchgeführten Northern-Blot Analysen sind die Untersuchungen der Linien SRI/47-6, -8, -22, -35, SRI/48-20, -22, -30 und -33 bei 24°C und unter Hitze dargestellt. niV, nah isogene Variante; M, RNA Molecular Weight Marker III (Roche)

Mit Hilfe der Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR) sollten diese Probleme vermieden und eine quantitative Auswertung möglich werden. Da eine relativ genaue Bestimmung des Transkript-Gehaltes nur im linearen Bereich der PCR möglich ist, mussten zunächst die optimalen Amplifikationsbedingungen für die *pat*S- und Aktin-cDNA bestimmt werden. Die Etablierung erfolgte mit mRNA Extrakten der Hitze-stabilen Linie SRI/48-22, da der gemittelte Pat-Gehalt mit 20,44 ± 4,97 ng Pat / mg GLP im Durchschnitt aller untersuchten Linien liegt (Kap. C1.2.4). Die spezifischen Amplifizierungen der cDNA [B2.6] erfolgten mit den Primerpaaren patS-fw/patS-rv für das *pat*S-Gen und *Nb*-Aktin-fw/*Nb*-Aktin-rv für das Aktin-Gen. Die Amplifikationen von *pat*S- bzw. Aktin fanden in getrennten Ansätzen statt. Vorversuche haben gezeigt, dass keine gleichzeitige Amplifikation in einer Multiplex-PCR möglich war (Ergebnisse nicht gezeigt). Die cDNA wurde jeweils in einer 1:10, 1:100 und

1:500 Verdünnung eingesetzt und die spezifischen Amplifikationen umfassten mindestens 20 und maximal 40 Zyklen. In Abb. C14 sind repräsentative Ergebnisse der Etablierung dargestellt.



Abbildung C14: Etablierung der Amplifikationsbedingungen für die RT-PCR

Die Amplifikation von *pat*S und Aktin fand in getrennten Ansätzen statt. Es wurden jeweils drei verschiedene Verdünnungen der cDNA eingesetzt: 1:10, 1:100 und 1:500. Für jede Verdünnung wurden verschieden lange Amplifikationen von 20 bis 40 Zyklen (ZA) durchgeführt.

Die 1:10 Verdünnungen der cDNA erwiesen sich sowohl für die Amplifikation von *pat*S als auch von Aktin am geeignetsten. Weiterhin zeigte sich, dass nach 28 Zyklen mit beiden Primerpaaren ein deutliches Signal detektiert werden konnte und die Amplifikation sich noch im linearen Bereich befand. Die Ergebnisse konnten in drei unabhängigen Wiederholungen reproduziert werden, so dass für die anschließenden RT-PCR Versuche die jeweilige cDNA in einer 1:10 Verdünnung eingesetzt und die Amplifikation 28 Zyklen umfasste.

Um die Transkript-Gehalte quantifizieren zu können, wurden die Amplifikationen nach der gelelektrophoretischen Auftrennung mit der Software PCBAS[®] 2.0 densitometrisch ermittelt. Anschließend wurden die *pat*S-mRNA Gehalte anhand der Aktin-mRNA Gehalte normalisiert, um die Werte innerhalb eines Probenpaares (24°C vs. 37°C) mit einander vergleichen zu können. Die so ermittelten Transkript-Gehalte von den isogenen 24°C Kontrollen dienten als Referenz. Um mögliche Veränderungen durch die Hitzebehandlung aufzeigen zu können, wurden relativ dazu die Gehalte der Klone bei 37°C verrechnet.

Für die Untersuchungen wurden die Hitze-sensitiven und einige Hitze-stabile Linien beider Konstrukte ausgewählt. Um die Reproduzierbarkeit dieser Messmethode beurteilen zu können, erfolgte in jeder Linie eine Doppelbestimmung des Transkript-Gehaltes. Zusätzlich wurde in einigen Linien der Transkript-Gehalt aus einem weiteren unabhängigen Hitzestressversuch bestimmt. Die Ergebnisse sind im Anhang (Kap. F8) aufgeführt und in Abb. C15 zusammengefasst.

Die Doppelbestimmungen haben gezeigt, dass die Werte innerhalb einer Linie stark schwanken können. So wurden für die Linien SRI/47-49 und SRI/48-95 Werte von 2,77 und 0,2 bzw. 1,63 und 0,45 bestimmt. Dagegen stimmten die ermittelten Werte weiterer Linien in sich überein. So konnten für die Linien SRI/47-23 und SRI/48-5 Werte von 0,61 und 0,57 bzw. 0,32 und 0,25 ermittelt werden. Auch die Werte einer Linie aus zwei unabhängigen

51

Hitzestressversuchen wichen im Mittel unterschiedlich stark voneinander ab. So konnten für die Linien SRI/47-77 und SRI/48-39 gemittelte Werte von 0,73 und 0,78 bzw. 0,16 und 1,26 bestimmt werden. Wobei auch hier wieder starke Schwankungen in den einzelnen Doppelbestimmungen zu beobachten waren.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass es mit dieser Messmethode zu relativ großen Schwankungen in den Werten kommen kann und sie somit auch nicht geeignet war, reproduzierbare Aussagen über den *pat*S-Transkript-Gehalt in den Pflanzen unter Hitze im Verhältnis zu den isogenen 24°C Kontrollen treffen zu können.



Abbildung C15: Bestimmung des relativen *pat*S-Transkript-Gehaltes in transgenen Tabakpflanzen Für die Untersuchungen wurden Hitze-stabile und -sensitive Linien beider Konstrukte ausgewählt. Die Transkript-Gehalte der isogenen 24°C Kontrollen dienten als Referenz (schwarz). Relativ dazu wurden die Transkript-Gehalte der Klone bei 37°C verrechnet (grau). Zusätzlich wurde in einigen Linien der Transkript-Gehalt von einem weiteren, unabhängigen Hitzestressversuch bestimmt (weiß).

C1.2.5.1 Quantifizierung der *pat*S-mRNA mit Hilfe der qRT-PCR

Aufgrund der zuvor beschriebenen Probleme und den großen Schwankungsbreiten der relativen Transkript-Gehalte innerhalb von Doppelbestimmungen und auch zwischen zwei unabhängigen Hitzestressversuchen, wurde dieser mit Hilfe der hoch sensitiven quantitativen Real Time PCR (qRT-PCR) bestimmt. Wie schon für die RT-PCR, wurde auch für die qRT-PCR die cDNA in einer 1:10 Verdünnung eingesetzt und für die Amplifizierung der *pat*S- und Aktin-cDNA dieselben Primerpaare genutzt. Anschließend konnte mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode (Livak K. J. und Schmittgen T. D. 2001) die relative *pat*S-Transkriptmenge anhand von Aktin normalisiert und die ermittelten Werte der Klone unter Hitze im Verhältnis zu den isogenen 24°C Kontrollen bestimmt werden. Werte ≤ 0.5 deuteten auf eine Reduktion des *pat*S-Transkript-Gehaltes hin, wohingegen Werte ≥ 2.0 eine Erhöhung zeigten. Werte im Bereich von 0.6 bis 1.9 wiesen auf keine Veränderung des *pat*S-Transkript-Gehaltes hin.

Es wurden die Hitze-sensitiven und einige Hitze-stabile Linien beider Konstrukte ausgewählt und die relative *pat*S-Transkriptmenge jeder Linie in einer Doppelbestimmung ermittelt. Zusätzlich wurde diese von einigen Linien aus einem weiteren, unabhängigen Hitzestressversuch bestimmt. Die Ergebnisse sind im Anhang (F9) aufgeführt und in Abb. C16 zusammengefasst.

Zunächst haben die Untersuchungen gezeigt, dass die ermittelten relativen Transkriptmengen mit der qRT-PCR im Vergleich zu denen aus der densitometrischen Bestimmung (s. o.) sowohl innerhalb einer Doppelbestimmung als auch zwischen den unabhängigen Hitzestressversuchen deutlich geringer schwankten und somit eine geeignete Methode darstellte.

Wie in Abb. C16 dargestellt, war dieser in den vier untersuchten Hitze-sensitiven SRI/47 Linien unter Hitze reduziert. Aber auch in der Hitze-stabilen Linie SRI/47-54 nahm der spezifische Transkript-Gehalt unter Hitze eindeutig ab. Weiter konnte gezeigt werden, dass dieser sowohl in der Hitze-sensitiven Linie SRI/48-39 als auch in der Hitze-stabilen Linie SRI/48-97 unter Hitze eindeutig reduziert war. Dagegen konnte in der Hitze-sensitiven Linie SRI/48-30 und Hitze-stabilen Linie SRI/48-95 keine Veränderung beobachtet werden.

Zusammenfassend konnte mit diesen Untersuchungen gezeigt werden, dass es in den untersuchten SRI/47 und SRI/48 Linien zu keiner generellen Korrelation zwischen dem spezifischen Transkript-Gehalt und der Reduktion des Pat-Proteins unter Hitze kommt.





C1.2.6 Bestimmung der Kopienzahl der pat-Gene in ausgewählten Linien

Die Inaktivierung von Transgenen durch Co-Suppression kann mit der Kopienzahl des Genes korrelieren. Um zu untersuchen, ob die Kopienzahl des pat47- bzw. pat48-Gens verantwortlich für die Hitze-induzierte Reduktion des Transgens auf Protein-Ebene ist, wurde die spezifische Kopienzahl mit Hilfe von Southern-Blot Analysen [B2.8] in ausgewählten Hitze-stabilen und -sensitiven Linien beider Konstrukte bestimmt. Die genomischen DNA der SRI/47 Pflanzen wurde mit EcoRI und Ncol und der SRI/48 Pflanzen mit Sacl und Xhol geschnitten. Die spezifische Hybridisierung erfolgte über eine 503 bp lange Sequenzspezifische, Digoxigenin-markierten DNA-Sonde. Die Ergebnisse sind in Tab. C3 zusammengefasst.

Die untersuchten Linien hatten nur ein oder zwei Kopien des jeweiligen pat-Gens. Einzig in der Linie SRI/48-39 konnten drei Kopien des pat48-Gens nachgewiesen werden. In beiden Events konnten sowohl Hitze-stabile als auch Hitze-sensitive Linien mit ein oder mehr Kopien des jeweiligen pat-Gens detektiert werden. Es konnte somit keine Korrelation zwischen der patS-Kopienzahl und der Reduktion des Transgens auf Protein-Ebene unter Hitze gezeigt werden.

Konstrukt	Linie	Pat-Protein bei 37 °C	<i>pat</i> S Kopienzahl	Konstrukt	Linie	Pat-Protein bei 37 °C	<i>pat</i> S Kopienzahl
pat47	- 23	reduziert	1	pat47	- 57	unverändert	1
	- 46	reduziert	2		- 60	unverändert	2
	- 49	reduziert	1		- 62	unverändert	1
	- 54	unverändert	1		- 63	unverändert	1
	- 55	unverändert	1		- 77	unverändert	1
pat48	- 30	reduziert	1	pat48	- 86	unverändert	2
	- 39	reduziert	з		- 95	unverändert	2
	- 42	reduziert	1		- 101	unverändert	1

Tabelle C3: Bestimmung der patS-Kopienzahl in ausgewählten transgenen Events

50 µg der genomischen DNA wurden mit den entsprechenden Enzymen geschnitten, gelelektrophoretisch aufgetrennt und nach der Übertragung auf eine Nylonmembran mit einer Digoxigenin-markierten patS-Sonde hybridisiert. Für die Untersuchungen wurden einzelne Hitze-stabile und -sensitive Linien beider Konstrukte ausgewählt.

C2 Nachweis einer Hitze-induzierten DNA-Protein Interaktion

Die Untersuchungen der Tabakpflanzen mit dem pat47- und pat48-Konstrukt haben gezeigt, dass dessen Kultivierung bei 37°C nur in einigen Linien zu einer Reduzierung des Pat steady state Levels führt. Diese Linien waren auch weiterhin resistent gegenüber dem Herbizid. Dagegen wurde in allen untersuchten SRI/43 Linien unter Hitze weder das Pat-Protein noch eine spezifischen Enzymaktivität nachgewiesen (Köhne S. et al. 1998). Zudem waren diese alle sensitiv gegenüber dem Herbizid. Unabhängig von dem Grad der Inaktivierung geht in beiden Fällen die negative Regulation unter Hitze mit der Anwesenheit der 5' UTR41 und dem 3' *nos* einher. Möglicherweise findet die Regulation auf DNA-Ebene über die Bindung eines oder mehrerer Hitze-induzierter Proteine an diese regulatorischen Elemente statt. Der 'Electromobility Gel Shift Assay' (EMSA) ist eine Möglichkeit solche DNA-Protein Interaktionen nachzuweisen. Für die Gelshift-Analysen wurde der 28 bp lange 5' UTR41 genutzt, da der 290 bp 3' *nos* ein wichtiger Bestandteil innerhalb der Genregulation ist und somit Bindemotive für eine Vielzahl von regulatorischen Proteinen besitzt. Zudem ist diese Sequenz zu lang um sie für detaillierte Analysen im EMSA zu nutzen.

C2.1 Klonierung einer spezifischen Sonde für den EMSA

Um die Gelshift-Analysen visualisieren und auswerten zu können, wurde die Sequenz der 5' UTR41 zunächst mit [³²P] markierten Adenin (A) Nukleotiden radioaktiv markiert. Für die 5' endständige Markierung wurde ein 4 Thymidin (T) -Überhang benötigt. Der Vektor p57as1Bpil (Arbeitsgruppe Gatz C., Göttingen) besitzt eine ca. 90 bp große Kassette, die jeweils von einer *Bpi*l-Restriktionsschnittstelle flankiert wird (*Bpi*l-Kassette). In dieser Kassette liegt die `*activation sequence-1*` (*as-1*) vor, ein *cis*-Element, an das die in Tabak konstitutiv exprimierten TGA-Transkriptionsfaktoren binden können (Lam E. und Lam Y. K. P. 1995, Niggeweg R. 1999). Aufgrund der Restriktionscharakteristik des Enzyms (GAAGAC 2/6) und der umliegenden Sequenz des Vektors erhält man nach der Restriktion mit *Bpi*l eine ca. 90 bp große Kassette mit 5' endständigen 4 T-Überhängen. In dieser *Bpi*l-Kassette befindet sich eine *Xba*l-Kassette, in der der 5' UTR41 gegen das *as-1* Element substituiert werden kann. Hierfür wurde ein Fragment mit der Sequenz der 5' UTR41 synthetisiert (s5' UTR41), dass kompatibel zu den *Xba*l-geöffneten Bereichen ist (Kasten Abb. C17).

Im Verlaufe der Klonierungen stellte sich jedoch heraus, dass zusätzlich zu den zwei *Xbal*-Restriktionsschnittstellen in der *Bpi*l-Kassette noch eine weitere im Vektor vorhanden ist und die ursprüngliche Klonierungsstrategie nicht mehr durchführbar war. Die *Bpi*l-Kassette sollte aber erhalten bleiben, da das *as-1* Element eine optimale Kontrolle für die Gelshift-Analysen darstellte. Daraufhin wurde die zusätzliche *Xba*l-Restriktionsschnittstelle durch eine Punktmutation eliminiert. Wie in Abb. C17 schematisch dargestellt, wurden hierfür zunächst zwei spezifische Primer (p57as1-fw und -rv) von dem Ausgangsvektor p57as1Bpil so abgeleitet, dass das erzeugte Amplifikat die Bpil-Kassette mit der zusätzlichen *Xba*l-Restriktionsschnittstelle beinhaltet (Abb. C17 A). Die Sequenz des reversen Primer wurde so gewählt, dass dieser komplementär zu der störenden *Xba*l-Restriktionsschnittstelle war. Ein spezifischer Basenaustausch von Thymin zu Guanin in der homologen Primersequenz führte nach der Amplifikation zu einer Punktmutation innerhalb der Erkennungssequenz (TCTAGA \rightarrow GCTAGA) und somit zu dessen Eliminierung.

55



Abbildung C17: Schematische Darstellung der Klonierung und Markierung der 5' UTR1-EMSA Sonde

A Amplifikation der *Bpi*l-Kassette und Eliminierung der *Xba*l-Restriktionsschnittstelle (blau) durch eine Punktmutation. **B** Integration der *Bpi*l-Kassette in das pGEM®-T Easy Vector System (Promega). **C** Entfernung des *as-1* Elements aus dem Zielvektor pGEM-as1Bpil durch eine *Xba*l Restriktion **D** Gerichtete Integration der synthetisierten 5' UTR41 (s5' UTR41) in den zuvor geöffneten Zielvektor. **E** Restriktion der Sonde mit *Bpi*l aus pGEM-s5' UTR41 und Markierung der 5' Endständigen 4 T-Überhänge mit ³²P markierten A Nukleotiden.

Das Amplifikat mit der *Bpi*l-Kassette wurde in das pGEM®-T Easy Vector System von Promega eingefügt, in *E. coli* TG1 überführt und mit Hilfe von Restriktionsanalysen in dem Klon pGEM-as1Bpi1.1 nachgewiesen (Abb. C18). Die korrekte Sequenz der *Bpi*l-Kassette und die Eliminierung der zusätzlichen *Xba*l-Restriktionsschnittstelle konnte durch zwei unabhängige Sequenzierungen bestätigt werden (Anhang Kap. F5.3). Anschließend wurde das as-1 Element gegen die synthetisierte 5' UTR41 in der *Xba*l-Kassette substituiert. Mit Hilfe von Restriktionsanalysen konnte in dem Klon pGEM-s5' UTR41.7 die Substitution beider DNA-Fragmente nachgewiesen (Abb. C18) und die korrekte Sequenz der s5' UTR41 in zwei unabhängigen Sequenzierungen bestätigt (Anhang Kap. F5.4) werden. Nach dessen Restriktion mit *Bpi*l wurde die erhaltende Sonde mit der 5' UTR41 wie in B2.12.2 beschrieben radioaktiv markiert.



Abbildung C18: Nachweis der korrekten Klonierung der Vektoren pGEM-as1Bpil und pGEM-s5' UTR41 Gelelektrophoretische Auftrennung der Restriktionen von TG1/57as1Bpil.1, TG1/GEM-as1Bpil.1 und TG1/GEM-s5' UTR41.7. Die korrekten Fragmentgrößen sind unter den Restriktionsenzymen aufgeführt. Zur Kontrolle wurden jeweils 3 µg der Plasmid-DNA mitgeführt (-). Als Größenstandart wurde der 100 bp Ladder Mix von Fermentas mitgeführt (M). k.R., keine Restriktionsschnittstelle

C2.2 Isolation nativer Kernproteinextrakte

Um eine spezifische DNA-Protein Interaktion nachweisen zu können, sollten die Gelshift-Analysen mit nativen Kernproteinextrakten durchgeführt werden. Für die Isolation eines nativen Proteins ist es wichtig eine für das Protein stabile Umgebung zu schaffen. Für unbekannte Proteine ist dieses jedoch relativ schwierig abzuschätzen, so dass für die ersten Untersuchungen das Protokoll von Kegler (Kegler C. 2001), der die Bindung von TGA-Transkriptionsfaktoren an das *`as-1* Element' in Tabak untersucht hat, als Basis genommen wurde. Für die Gelshift-Analysen wurde die nah isogene Variante zunächst dem 10tägigen Hitzestress unterzogen, direkt im Anschluss beprobt und die nativen Kernproteinextrakte der gestressten und isogenen 24°C Kontrollen wie in B2.12.2 ausführlich beschrieben isoliert.



Abbildung C19: DAPI Färbung von Zellkernfraktionen aus N. tabacum SRI kultiviert unter 24°C und 37°C

Wie in Abb. C19 dargestellt, konnte durch die Anfärbung der Zellkernfraktionen mit 4', 6-Diamidin-2-phenylindiol (DAPI) noch während der Isolation gezeigt werden, das ausreichend und intakte Zellkerne isoliert wurden. Die Verbindung lagert sich bevorzugt an AT-reiche Regionen in der kleinen Furche der DNA an. Bei Anregung mit ultraviolettem Licht fluoresziert DAPI im sichtbaren Bereich mit blauer bis cyaner Farbe.

C2.3 Gelshift-Analysen mit der 5' UTR41 und dem as-1 Element

Um die Extraktion der nativen Kernproteine und die Gelshift-Analysen kontrollieren zu können, wurden neben der 5' UTR41 auch Analysen mit dem *as-1* Element durchgeführt. Nach der radioaktiven Markierung [B2.12.2] beider Elemente, wurden diese mit jeweils 2 µg und 10 µg der nativen Kernproteinextrakte inkubiert und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt [B2.12.2]. Aufgrund des unterschiedlichen gelelektrophoretischen Laufverhaltens von freien bzw. Protein gebundenen DNA-Fragmenten, kann eine DNA-Protein Interaktion durch einen 'Shift' aufgezeigt werden. Für die Reproduzierbarkeit wurden die Proteinextrakte aus zwei voneinander unabhängigen Hitzestressversuchen untersucht.



Abbildung C20: Gelshift-Analyse nativer Kernproteinextrakte aus N. tabacum nach einem Hitzestressversuch

Exemplarische Darstellung einer Gelshift-Analyse mit dem *as-1* Element und der 5' UTR41. Um das elektrophoretische Laufverhalten der Sonde ohne eine Proteinbindung zeigen zu können (gelber Pfeil), ist ein Ansatz ohne nativen Kernproteinextrakt mitgeführt (-). Sowohl bei 24°C als auch bei 37°C konnte eine Einzel- und Doppelbesetzung des *as-1* Elementes gezeigt werden (blaue Pfeile). Mit der 5' UTR4 1 konnte weder bei 24°C noch unter Hitze eine spezifische Protein-DNA Interaktion nachgewiesen werden. Die Bedingungen der einzelnen Experimente waren identisch.

Wie in Abb. C20 für eine Gelshift-Analyse dargestellt, konnte unabhängig von der eingesetzten Proteinmenge bei 24°C und 37°C die erwartete Einzel- und Doppelbesetzung des *as-1* Elements mit TGA2.2-Dimeren gezeigt werden. Dies wurde auch durch weitere

Gelshift-Analysen mit Proteinextrakten aus weiteren, unabhängigen Hitzestressversuchen bestätigt. Somit konnte gezeigt werden, dass die verwendeten Protokolle für die Isolation der nativen Kernproteinextrakte und die Gelshift-Analysen funktionierten. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Hitzebehandlung keinen Einfluss auf die Interaktion der Transkriptionsfaktoren mit dem as-1 Element zu nehmen scheint. Dagegen konnte in keiner der Gelshift-Analysen mit der 5' UTR41 weder bei 24°C noch unter Hitze eine spezifische Interaktion nachgewiesen werden. Möglicherweise sind in den max. eingesetzten 10 µg des Proteinextraktes zu wenig des gesuchten Proteins vorhanden, um eine Interaktion mit der 5 UTR41 aufzeigen zu können. Weiterhin ist es vorstellbar, dass mit dem verwendeten Isolationsprotokoll nicht das gesuchte Protein unter nativen Bedingungen isoliert werden konnte.

C3 Untersuchung des Einflusses regulatorischen Regionen des *pat*41-Gens auf die Expression der Luciferase während eines moderaten Hitzestresses.

Um zu untersuchen, ob die Inaktivierung nur von den regulatorischen Sequenzen, also unabhängig vom Genprodukt ist, wurde ein weiterer Kodierbereich analysiert. Die Luciferase (luc) aus Photinus pyralis ist ein in der Molekularbiologie häufig verwendetes und ökonomisch effizientes Reportergen-System und wird zudem auch bei höheren Temperaturen noch stabil exprimiert. Neumann (1997) konnte bereits beobachten, dass die Kultivierung transgener Tabakpflanzen bei 37°C zu einem reversiblen Verlust der Luciferase-Aktivität in einem Teil der untersuchten Linien führen kann. Wie das pat46-Gen (Walter S. unv. Ergebnisse) besitzt das von Neumann genutzte AQ2-Konstrukt den 3' nos als Terminationssignal. Die bisher erzielten Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der 3' nos eine entscheidende Rolle in der Hitze-induzierten Inaktivierung des Pat steady state Levels einnimmt und es sich somit bei dem von Neumann beobachteten Phänomen um den gleichen Regulationsmechanismus handeln könnte. Für die vergleichenden Analysen zum pat-Gen wurde der luc-Kodierbereich im Kontext des pat43-Konstruktes eingebracht, da dieses im Gegensatz zu den pat44-, pat45-, pat46-, pat47- und pat48-Konstrukten nicht zu den Intermediäreffekten in Tabak unter Hitze führte. Nach der stabilen Integration in N. tabacum, wurden die transgenen Pflanzen dem 10tägigen Hitzestress ausgesetzt und die Aktivität der Luciferase bestimmt.

C3.1 Klonierung des binären Transformationsvektors pLuc43

Um den Einfluss der Temperatur auf die Luciferase zu untersuchen, wurde im pat43-Gen über Sall der patS-Kodierbereich gegen den luc-Kodierbereich substituiert (Abb. C21). Zunächst wurde *luc*-Kodierbereich entsprechenden der mit den Sall-Restriktionsschnittstellen modifiziert. Hierfür wurde dieser mit spezifischen Primern (LucSallfw und-rv) aus dem Subvektor pDO432 amplifiziert, in das pGEM®-T Easy Vector System eingefügt und der erzeugte Subvektor pGEM-LucSall anschließend in E. coli TG1 überführt. Nach deren Selektion konnte der luc-Kodierbereich über eine spezifische PCR im Klon TG1/GEM-LucSall.1 nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Die korrekte Sequenz des amplifizierten luc-Kodierbereiches wurde durch zwei unabhängige Sequenzierungen bestätigt (Ergebnisse nicht gezeigt). Durch eine Sall-Restriktion des isolierten Subvektors aus dem Klon TG1/GEM-LucSall.1 wurde der luc-Kodierbereich ausgeschnitten und nach dessen Aufreinigung in den ebenfalls mit Sall geöffneten Zielvektor pSK16.43 eingebracht. Der neu erzeugte Pflanzentransformationsvektor pLuc43 wurde anschließend in E. coli TG1 überführt und auf Kanamycin selektioniert.



Abbildung C21: Klonierschema des Pflanzentransformationsvektor pLuc43

A Amplifikation des *luc*-Kodierbereiches mit *Sall*-Restriktionsschnittstellen am 5' und 3' Ende. **B** Integration des modifizierten *luc*-Kodierbereiches in das pGEM®-T Easy Vector System (Promega). **C** *Sall*-Restriktion des Subvektors pGEM-LucSall und Aufreinigung des *luc*-Kodierbereiches. **D** *Sall*-Restriktion des *pat*43-Gens und Aufreinigung des Zielvektors pSK16.43 **E** Ungerichtete Integration des *luc*-Kodierbereiches. 5' nos, Promotor des Nopalinsynthasegens aus *A. tumefaciens*; \\, Sequenzdeletion; t3' UTR41, verkürzter 3' UTR41

In dem Klon TG1/Luc43.5 konnte über eine spezifische PCR das luc43-Gen nachgewiesen werden. Wie in Abb. C22 B dargestellt, wurde daraufhin durch die Restriktion der Plasmid-DNA mit EcoRI, Sall und Xbal/HindIII die benötigte 'sense' Orientierung des luc-Kodierbereiches in diesem Klon bestätigt. Weiterhin konnte auch die Luciferase-Aktivität in einem qualitativen Nachweissystem detektiert werden (Kap. C3.1.1). Für eine stabile Integration des luc43-Gens in das pflanzliche Genom wurde der Vektor aus dem Klon TG1/Luc43.1 isoliert, in Α. tumefaciens LBA4404 überführt und auf Spectinomycin/Streptomycin selektioniert. Wie in Abbildung C22 C und D dargestellt, konnte in dem Klon LBA4404/Luc43.1 das luc43-Gen nachgewiesen und dessen Zugehörigkeit zum Agrobakterien-Stamm LBA4404 bestätigt werden.





A Bindestellen der Primer für die spezifische Amplifikation im luc43-Gen und Darstellung der genutzten Restriktionsendonukleasen. B Gelelektrophoretische Auftrennung der Restriktionen von TG1/Luc43.5. Die korrekten Fragmentgrößen sind unter den Restriktionsenzymen aufgeführt. Zur Kontrolle wurden 3 µg der Plasmid DNA mitgeführt (-) C Gelelektrophoretische Auftrennung der spezifischen Amplifikation von LBA4404/Luc43.1 (2). Das korrekte Amplifikat besitzt eine Größe von ca. 1600 bp. Als positive Kontrolle diente der Subvektor pGEM-LusSall (P). Ein Ansatz ohne Template diente als Kontrolle der verwendeten Komponenten für die PCR (K). D Gelelektrophoretische Auftrennung der ERIC-PCR von LBA4404/Luc43.1 (4). Als Kontrolle wurden folgende Wildtyp Bakterienstämme mitgeführt: A. tumefaciens LBA 4404 (1), A. tumefaciens HV C58/C1 (2) und E. coli TG1 (3). Als Größenstandart wurde der 100 bp Ladder Mix von Fermentas mitgeführt (M)

C3.1.1 Qualitativer Nachweis der Luciferase-Aktivität in Bakterien

Um die Expression des *luc*43-Gens schnell und einfach zu überprüfen, wurde die Luciferase-Aktivität in den Bakterien nachgewiesen [B2.12.8]. Der von Wood und DeLuca (1987) entwickelte Test beruht darauf, dass Luciferin in die Bakterienzellen diffundiert und von der dort vorhandenen Luciferase oxidiert wird. Das dabei emittierte Licht ermöglicht den Nachweis der Luciferase.

Die Expression des *luc*43-Gens wurde im Verlauf der Klonierung des *luc*43-Konstruktes in dem Klon TG1/Luc43.5 und nach der Überführung in *A. tumefaciens* in dem Klon LBA4404/Luc43.1 nachgewiesen. Die von Neumann genutzten Bakterienstämme TG1/AQ2

und LBA4404/AQ2 dienten dabei als Positivkontrolle. Die Autoluminogramme aller getesteten Bakterienstämme sind in Abb. C23 dargestellt.

In den Kontrollstämmen TG1/AQ2 und LBA4404/AQ2 konnten nach einer 1,5 stündigen Inkubation mit Luciferinlösung I unterschiedlich starke Lichtemissionen und somit unterschiedlich starke Expressionen der Luciferase in den Bakterien detektiert werden. Wie zu erwarten wurde in den Kontrollstämmen ohne das *luc*43-Konstrukt keine Lichtemissionen gezeigt. In zwei unabhängigen Versuchen konnte in den Klonen TG1/Luc43.5 und LBA4404/Luc43.1 unterschiedlich starke Expositionen detektiert und somit die *luc*-Expression nachgewiesen werden.



Abbildung C23: Autoluminogramme der mit dem Luciferasereportergen transformierten Bakterienstämme Nachweis der Luciferase-Aktivität in ü. N. Strichkulturen (weiß umkreist) der Klone TG1/Luc43.1 und LBA4404/Luc43.5. Bakterienstämme mit dem Pflanzentransformationsvektor ROK1 ohne das Zielgen dienten als Negativkontrolle. Als Positivkontrolle wurden die Bakterienstämme TG1/AQ2 und LBA4404/AQ2 mitgeführt.

C3.2 Nachweis des *luc*43-Gens und deren Expression *in planta*

C3.2.1 Stabile Integration des *luc*43-Gens in *N. tabacum*

Die Integration des *luc*43-Konstruktes erfolgte in *N. tabacum* Petit Havanna, um diese mit den SRI/43 Pflanzen vergleichen zu können. Für die Transformation [B 2.3.3] wurde der in Kap. C3.1 erzeugte Agrobakterien-Stamm mit dem *luc*43-Gen verwendet. Um einen Einfluss des Transgens auf die Regeneration des Tabaks zu untersuchen, wurde auch der binäre

Transformationsvektor ROK1 ohne das Zielgen (Leervektor) transformiert. Weiterhin wurde das AQ2-Konstrukt von Neumann in Tabak eingebracht, um dessen Einfluss mit dem *luc*43-Konstrukt vergleichen zu können

Insgesamt wurden 11 unabhängige Transformationen durchgeführt. Davon waren aufgrund mikrobieller Kontaminationen für das *luc*43-Konstrukt acht, für das *AQ2*-Konstrukt 10 und für den Leervektor neun Transformationen auswertbar. Von diesen wurden nach sechs Wochen die jeweiligen Regenerationsdaten bestimmt (Anhang Tab. F2). In Tab. C4 sind exemplarisch die Regenerationsraten von drei Transformationen dargestellt und die Raten aller auswertbaren Transformationen im Mittel zusammengefasst.

Tabelle C4: Darstellung der Regenerationsdaten des luc43-, AQ2-Gens und des Leervektors in N. tabacum

Die Anzahl der gebildeten Kalli und Sprosse wurden nach 6 Wochen Inkubation von den Explantaten auf ACB-Medium mit 100 mg/L Kanamycin bonitiert und die Anzahl der Sprosse pro Explantat bestimmt. Die Regenerationsdaten wurden im Mittel für jede T-DNA von den auswertbaren Transformationen zusammengefasst.

Transformation	T-DNA	Explantate	Kalli	Kalli/Explantat	Sprosse	Sprosse/Explantat	
3	AQ2	30	72	2,40	8	0,27	
	ROK1	18	85	4,72	24	0,50	
	Luc43	18	63	3,50	9	1,33	
5	AQ2	24	78	3,25	21	0,88	
	ROK1	29	99	3,41	34	1,17	
	Luc43	29	94	3,24	4	0,14	
11	AQ2	30	20	1,54	9	0,30	
	ROK1	30	15	0,5	4	0,13	
	Luc43	29	8	0,28	2	0,07	
Gesamt	AQ2	2 10 von 11 Transformationen auswertbar					
	ROK1	K1 9 von 10 Transformationen auswertbar					
	Luc43	8	0,55 ± 0,44				

Die Regenerationsdaten des *luc*43- und *AQ2*-Konstrukt waren mit 0,55 \pm 0,44 bzw. 0,53 \pm 0,53 Sprosse/Explantat im Mittel vergleichbar. Wie auch bei den Transformationen mit den *pat*-Konstrukten, kam es innerhalb eines Konstruktes zu den für Tabak üblichen Schwankungen. Der Leervektor lag mit 0,48 \pm 0,34 Sprosse/Explantat innerhalb der Schwankungsbreiten des *luc*43-Konstruktes und somit konnte auch kein Einfluss dessen auf die Regeneration beobachtet werden.

Verglichen mit den Transformationen des *pat*47- und *pat*48-Konstruktes (Tab. C1) waren diese aber deutlich geringer. Das ist wahrscheinlich auf die verschiedenen genutzten Pflanzentransformationsvektoren zurückzuführen. Sowohl der ROK1 als auch der pBIN19, der als Ausgangsvektor für den Vektor pAQ2 diente, sind Vektoren der "ersten Generation". Dagegen ist der pLH9000 ein deutlich effektiverer binärer Transformationsvektor der "zweiten Generation".

Nach der Umsetzung der Sprosse auf Selektionsmedium wurde mit Hilfe einer spezifischen PCR in jeweils neun Regeneranten das Transgen nachgewiesen (Abb. C24 B). Anschließend konnte in diesen Linien mit Hilfe von RT-PCR Analysen die spezifische mRNA nachgewiesen werden (Abb. C24 C).



Abbildung C24: Nachweis der luc-Konstrukte und der luc-mRNA in planta

A Bindestellen der Primer LucSall-fw-rv für die DNA-PCR und LucS-fw-rv für die RT-PCR im AQ2- und *luc*43-Konstrukt. B Gelelektrophoretische Auftrennung der spezifischen DNA-Amplifikation von den Linien SRI/AQ2-2, -17, -31, -33 SRI/Luc43-5, -11,-22 und -26. Das korrekte Amplifikat besitzt eine Größe von ca. 1600 bp. Als negative Kontrolle diente genomische DNA aus der Linie SRI/ROK1-1. C Gelelektrophoretische Auftrennung der RT-PCR dieser Linien. Das korrekte Amplifikat besitzt eine Größe von ca. 350 bp. Als negative Kontrolle diente cDNA aus der Linie SRI/ROK1-1. Ein Ansatz ohne Template diente als Kontrolle der verwendeten Komponenten für die PCR (K). Als Größenstandart wurde der 100 bp Ladder Mix von Fermentas mitgeführt (M)

Für eine bessere Zuordnung wurden die Tabakpflanzen mit dem AQ2- und dem luc43-Gen als SRI/AQ2 bzw. SRI/Luc43 bezeichnet. Die Pflanzen mit dem Leervektor wurden als

SRI/ROK1 gekennzeichnet. Die transgenen Pflanzen wurden sowohl *in vitro* in einer Klimakammer als auch in Erde im Gewächshaus für die weiteren Untersuchungen angezogen. Wie in Abb. C25 exemplarisch für die *in vitro* Kulturen dargestellt, waren die transgenen Linien zu Beginn der Kultivierung phänotypisch nicht von den Pflanzen mit dem Leervektor und der nah isogenen Variante zu unterscheiden. Im Laufe der *in vitro* Kultivierung und auch im Gewächshaus zeigte sich aber, dass die transgenen Pflanzen während der Vermehrung sukzessive schlechter regenerierten. So war die Bewurzelung der Pflanzen verzögert und sie wuchsen auch deutlich schlechter. Weiterhin waren die Pflanzen früher Blüh-induziert. Gleiches konnte auch für die Pflanzen mit dem Leervektor beobachtet werden. Das führte bei einigen Linien dazu, dass diese nach einer bestimmten Anzahl von Regenrationen diese Fähigkeit verloren.



Abbildung C 25: Darstellung ausgewählter Tabakpflanzen mit dem luc43-Gen in verschiedenen Vermehrungsstadien Exemplarisch für die erzeugten transgenen Tabakpflanzen sind ca. 3 Wochen alte *in vitro* Kulturen der Linien SRI/AQ2-17, -31, SRI/Luc43-11 und -22 dargestellt. Die neu regenerierten (VS0) transgenen Tabakpflanzen unterscheiden sich in ihrem Phänotyp nicht von den Pflanzen mit dem Leervektor und der nah isogenen Variante (niV). Spätestens ab dem dritten Vermehrungsschritt (VS3) war die Kultivierung dieser transgenen Linien und der Linien mit dem Leervektor im Vergleich zu der nah isogenen Variante deutlich eingeschränkt. Charakteristisch dafür war eine frühe Blühinduktion.

C3.2.2 Qualitativer Nachweis der Luciferase-Aktivität in transgenen Tabakpflanzen

Um die *luc*-Expression in den Regeneranten schnell und einfach zu überprüfen, wurde wie zuvor in den Bakterien die Luciferase-Aktivität nachgewiesen [B2.12.8]. Doch auch nach mehrfacher Wiederholung des Experimentes konnte bei keiner SRI/AQ2 oder SRI/Luc43 Linie eine Lichtemission gezeigt werden. Auch die Variation der Inkubationszeiten von 30 min bis hin zu 6 h und die Zugabe von DMSO zur Substratlösung (Luciferinlösung III), um die Aufnahme des Substrates in das Blattmaterial zu fördern, führten zu keiner detektierbaren Emission. Da jedoch die Funktionalität beider *luc*-Gene zuvor nachgewiesen werden konnte

(Abb. C23) und in den untersuchten Linien das jeweilige Konstrukt und dessen Transkription (Abb. C24 C) gezeigt wurde, musste es an dem Testsystem liegen.

Daraufhin wurde die *luc*-Expression mit dem Luciferase Assay System von Promega bestimmt [B2.12.9]. Mit diesem Messsystem kann die Luciferase-Aktivität pflanzlicher Proteinextrakte durch die Zugabe einer Luciferinlösung luminometrisch bestimmt werden. Die gemessenen relativen Licht Einheiten (RLE) wurden auf einen µg des gesamtlöslichen Proteins (GLP) bezogen [B2.12.4]. Zusätzlich zu den transgenen Linien, wurden Pflanzen mit dem Leervektor und die nah isogene Variante vermessen. Neben den *in vitro* Kulturen wurden Linien aus dem Gewächshaus untersucht, um beide Kultivierungsarten vergleichen zu können. Um die Messmethode beurteilen zu können, wurden die RLE von jedem Proteinextrakt in einer Doppelbestimmung ermittelt (Anhang Tab. F7).



Abbildung C26: Bestimmung der relativen Luciferase-Aktivität in transgenen Tabakpflanzen Luminometrische Doppelbestimmung der Luciferase-Aktivität in SRI/AQ2 und SRI/Luc43 Pflanzen aus *in vitro* Kultur und in Erde (*) bei einer Sensitivität von 175. Die ermittelten Relativen Licht Einheiten (RLE) wurden auf einen µg des gesamtlöslichen Proteins (GLP) bezogen. niV, nah isogene Variante

Mit dem Luciferase Assay System war es möglich in einem Großteil der transgenen Linien verschieden starke Enzymaktivitäten zu messen. Wie in Abb. C26 dargestellt, konnte in acht von neun SRI/AQ2 und in vier von neun SRI/Luc43 Linien eine Luciferase-Aktivität nachgewiesen werden. In den restlichen Linien lagen die gemessenen relativen Einheiten unterhalb der Werte des Leervektors und der nah isogenen Variante.

Es zeigte sich, dass die Werte innerhalb eines Konstrukts stark schwankten. So lagen die Werte von den positiven SRI/AQ2 und SRI/Luc43 Linien zwischen 149,91 und 2158,29 RLE / µg GLP bzw. 16,08 und 1931,64 RLE / µg GLP. Aufgrund dieser Schwankungsbreiten kann zwischen den beiden *luc*-Konstrukten auch kein wesentlicher Unterschied ausgemacht
werden. Die Doppelbestimmung der Proteinextrakte zeigte, dass es zu leichten Methodenabhängigen Schwankungen kommt. Diese waren aber deutlich geringer als die Schwankungen zwischen den unabhängigen Linien und sind somit zu vernachlässigen. Die Linien SRI/AQ2-2, -8 und SRI/Luc43-5 aus dem Gewächshaus lagen mit 553,87 RLE / µg GLP, 611,58 RLE / µg GLP bzw. 387,64 RLE / µg GLP im Wertebereich der *in vitro* Kulturen, so dass die Kultivierungsart keinen Einfluss auf die Expressionsstärke zu nehmen scheint.

C3.2.3 Qualitativer Nachweis der Luciferase-Aktivität nach einen moderatem Hitzestress

Um eine mögliche Hitze-induzierte Auswirkung der 5' UTR41 und des 3' nos auf den *luc*-Kodierbereich zu untersuchen, wurden die SRI/Luc43 Linien dem 10 tägigen Hitzestress ausgesetzt und direkt im Anschluss die Luciferase-Aktivität in einer Doppelbestimmung ermittelt. Für die Untersuchungen wurden die Linien SRI/Luc43-5, -26 und SRI/AQ2-6, -31, -32 und -33 aus der *in vitro* Kultur und SRI/Luc43-11, -22 und SRI/AQ2-17und -22 aus dem Gewächshaus verwendet. In den restlichen Linien konnte zuvor keine Luciferase-Aktivität nachgewiesen werden oder waren aufgrund der genannten Kultivierungsprobleme nicht mehr vorhanden. Die Ergebnisse sind im Anhang (Tab. F8) aufgeführt und in Abb. C27 zusammengefasst.





Luminometrische Doppelbestimmung der Luciferase-Aktivität in SRI/AQ2 und SRI/Luc43 Linien aus *in vitro* Kultur und in Erde (*) unter Kontrollbedingungen (grau) und bei 37°C (weiß) bei einer Sensitivität von 175. Die ermittelten Relativen Licht Einheiten (RLE) wurden auf einen µg des gesamtlöslichen Proteins (GLP) bezogen. niV, nah isogene Variante

Wie auch schon im Kap. C1.2.2 beschrieben, bildeten die Tabakpflanzen unter Hitze, verglichen mit den isogenen Kontrollen bei 24°C, eine verdickte Kutikula aus und vereinzelt waren auch Lanzett-artige Blätter zu beobachten (Ergebnisse nicht gezeigt). Dies wurde sowohl bei den transgenen Pflanzen als auch bei der nah isogenen Variante beobachtet und war somit unabhängig von dem eingebrachten Transgen.

In allen untersuchten isogenen 24°C Kontrollen konnte eine Luciferase-Aktivität nachgewiesen werden. Wie schon in Kap. C3.2.2. beobachtet, kam es zwischen den unabhängigen Linien eines Konstruktes zu starken Schwankungen. Die absoluten Werte beider Messreihen können aber nicht miteinander verglichen werden, weil diese mit unterschiedlichen Sensitivitäten des Messgerätes gemessen werden mussten, um im auswertbaren Bereich des Gerätes zu bleiben. So wurde diese Messreihe mit einer geringeren Sensitivität (125 vs. 175) gemessen und die absoluten Werte waren erwartungsgemäß auch niedriger. Weiterhin zeigte sich, dass die Pflanzen aus dem Gewächshaus die höchsten Werte aufwiesen. Dies konnte aber im ersten Versuch nicht beobachtet werden.



Abbildung C28: Gegenüberstellung der relativen Luciferase-Aktivitäten von unabhängigen Hitzestressversuchen Zusammenfassende Darstellung der ermittelten Luciferase-Aktivitäten aus den drei durchgeführten Hitzestressversuchen mit *in vitro* Kulturen. Die luminometrische Doppelbestimmung der isogenen 24°C Kontrollen (grau) und der Klone unter Hitze (weiß) erfolgte bei einer Sensitivität von 175. Die ermittelten Relativen Licht Einheiten (RLE) wurden auf einen µg des gesamtlöslichen Proteins (GLP) bezogen. niV, nah isogene Variante.

Verglichen mit den isogenen 24°C Kontrollen, war die Luciferase-Aktivität in allen untersuchten SRI/AQ2 und SRI/Luc43 Linien unter Hitze eindeutig reduziert. Eine Ausnahme stellte die Linie SRI/Luc43-5 dar. Verglichen mit der isogenen Kontrolle bei 24°C mit 1,84 RLE / µg GLP im Mittel war die Aktivität in dem gestressten Klon mit 1,64 RLE / µg GLP im Mittel nur unwesentlich niedriger. Die Werte ergaben sich aus der Doppelbestimmung mit 1,95 bzw. 1,93 RLE / µg GLP bei 24°C und 1,53 bzw. 1,56 RLE / µg GLP unter Hitze. Der

Unterschied zwischen den Klonen war aber deutlicher als die Schwankungen in den Doppelbestimmungen und somit könnte es sich auch hierbei um eine reale Reduzierung der Luciferase-Aktivität bei 37°C handeln.

Anschließend wurden die Ergebnisse in einem zweiten unabhängigen Hitzestressversuch überprüft. Hierfür standen aufgrund der zuvor genannten Kultivierungsprobleme nur noch die Linien SRI/AQ2-6, -31, -32, -33 bzw. SRI/Luc43-5 und -26 zu Verfügung. Ein dritter unabhängiger Versuch war nur noch mit der Linie SRI/AQ2-6 und SRI/Luc43-26 möglich. Die Ergebnisse sind im Anhang (Tab. F8 und F9) aufgeführt und in Abb. C28 zusammengefasst. Bei den isogenen 24°C Kontrollen zeigte sich, dass nicht nur die Werte zwischen den unabhängigen Linien eines Konstruktes stark schwankten sondern auch die Werte zwischen den Klonen einer Linie unterschiedlich stark voneinander abweichten. So lagen zum Beispiel die Luciferase-Aktivität in den untersuchten lonen der Linien SRI/AQ2-31 und SRI/43-26 zwischen 26,95 und 635,35 RLE / µg GLP bzw. 52 und 566,61 RLE / µg GLP. Unabhängig davon war die Luciferase-Aktivität in den Hitze-behandelten Klonen, verglichen mit den isogenen 24°C Kontrollen, in jedem Hitzestressversuch reduziert. Auch die zuvor beobachtete geringe Hitze-induzierte Reduktion der Luciferase-Aktivität in der Linie SRI/Luc43-5 (Abb. C27) war in einem zweiten unabhängigen Versuch deutlich stärker ausgeprägt. So wurde ein Aktivität von 30,01 RLE / µg GLP in dem Klon unter Kontrollbedingungen und 0,23 RLE / µg GLP in dem Klon unter Hitze bestimmt. Dagegen konnte die eindeutige Hitze-induzierte Reduktion der Luciferase-Aktivität in der Linie SRI/AQ2-32 aus dem ersten Hitzestressversuch (Abb. C27) nicht reproduziert werden. Dennoch war der geringe Unterschied zwischen den ermittelten Aktivitäten mit 25,22 RLE / μg GLP bei 24°C und 24,71 RLE / μg GLP unter Hitze größer als die Schwankungen in den jeweiligen Doppelbestimmungen. So dass es sich hierbei, wie auch schon bei der Linie SRI/Luc43-5 im ersten Hitzestressversuch beobachtet (Abb. C27), um eine geringe aber reale Abnahme der Luciferase-Aktivität unter Hitze handeln könnte.

Weiterhin wurde in einem Hitzestressversuch von jeder Linie die Luciferase-Aktivität in zwei unabhängigen Blattproteinextrakten in einer Doppelbestimmung ermittelt und miteinander verglichen (Tab F10). Es konnte gezeigt werden, dass sich auch die Aktivitäten in den Blättern unterscheiden. Diese Schwankungen waren aber deutlich geringer als die Unterschiede zwischen dem Klon unter Hitze und der isogonen 24°C Kontrolle. Mit Ausnahme der 24°C Kontrolle der Linie SRI/AQ2-31 waren diese auch deutlich geringer als die Unterschiede zwischen den Klonen innerhalb der jeweiligen Linie.

C4 Untersuchung des Einflusses der 5´ UTR41 und des 3´ nos auf die Pat Expression während eines moderaten Hitzestresses in Arabidospis thaliana

In *N. tabacum* konnte gezeigt werden, dass bei 37°C der *pat*- und *luc*-Kodierbereich durch die 5′ UTR41 und den 3′ *nos* negativ reguliert werden kann. Unter den Standard-Kultivierungsbedingungen scheinen diese Elemente keinen Einfluss auf das Transgen zu nehmen. Ähnliches konnte auch in Kartoffeln (*Solanum tuberosum*), die wie der Tabak zur Familie der Nachtschattengewächse (Solanaceae) gehört, beobachtet werden (unv. Ergebnisse). Um zu untersuchen, ob die Regulation noch in weiteren Spezies auftritt und möglicherweise einen allgemeinen pflanzlichen Mechanismus darstellt, wurde dies in der Modellpflanze *Arabidopsis* (*A*.) *thaliana* untersucht. Das Arabidopsis Genom ist vollständig sequenziert und ist somit für weitere Untersuchungen bestens geeignet. Zudem zeigten Sequenzabgleiche der 5′ UTR41 mit dem Arabidopsis Genom (TAIR) auffällig hohe Homologien im 5′ Bereich von funktionellen Genen (Ergebnisse nicht gezeigt).

Für die Untersuchungen wurde das *pat*41- und *pat*43-Gen stabil in den Ökotyp Columbia (Col-0) eingebracht, weil im Gegensatz zu den beobachteten Intermediäreffekten in Tabakpflanzen mit dem *pat*44-, *pat*45-, *pat*46-, *pat*47- bzw. *pat*48-Gen, konnte in allen untersuchten SRI/41 und SRI/43 Linien eine deutliche Hitze-induzierte negative Regulation des Pat steady state Levels beobachtet werden (Köhne S. et al. 1998).

C4.1 Übertragung der *pat*-Gene in *A. tumefaciens* GV3101 (pMP90)

Der Stamm *A. tumefaciens* LBA4404 erwies sich oft als ungeeignet für die Arabidopsis Transformation. Daher wurde für eine effektive Integration der *pat*-Gene in das Arabidopsis Genom die Plasmide plB16.41 und pSK16.43 in den Stamm GV3101 (pMP90) (Koncz C. und Schell J. 1986) übertragen. Dies ist ein hoch virulenter Agrobakterien-Stamm aufgrund von zusätzlichen Virulenzgenen auf dem Helferplasmid pMP90.

Wie in Abb. C29 B dargestellt, konnte über eine spezifische PCR das *pat*41-Gen in dem Klon GV3101(pMP90)/IB16.41.1 und das *pat*43-Gen in dem Klon GV3101(pMP90)/SK16.43.1 nachgewiesen werden. Anschließend wurde mit Hilfe der ERIC-PCR die korrekte Stammzugehörigkeit bestätigt (Abb. C29 C).



Abbildung C29: Nachweis der korrekten Transformation von A. tumefaciens GV3101(pMP90)

A Bindestellen der Primer für die spezifische Amplifikation im *pat*41- und *pat*43-Gen. Das korrekte Amplifikat besitzt eine Größe von ca. 227 bp bzw. ca. 691 bp **B** Gelelektrophoretische Auftrennung der spezifischen Amplifikation von GV3101(pMP90)/IB16.41.1 (1) und GV3101(pMP90)/SK16.43.1 (2). Als positive Kontrollen dienten die Klone TG1/IB16.41.1 bzw. TG1/SK16.43.1 (P). Ein Ansatz ohne Template diente als Kontrolle der verwendeten Komponenten für die PCR (K). **C** Gelelektrophoretische Auftrennung der ERIC-PCR von GV3101(pMP90)/IB16.41.1 (4) und GV3101(pMP90)/SK16.43.1(5). Als Kontrolle wurden folgende Wildtyp Bakterienstämme mitgeführt: *A. tumefaciens* HV C58/C1 (1), *A. tumefaciens* GV3101(pMP90) (2) und *A. tumefaciens* LBA 4404 (3). Als Größenstandart wurde der 100 bp Ladder Mix von Fermentas mitgeführt (M).

C4.2 Nachweis der pat-Gene und ihrer Expression in planta

C4.2.1 Stabile Integration der pat-Gene in A. thaliana

Die Integration des *pat*41- und *pat*43-Gens erfolgte über die Blütentauchmethode [2.3.3] nach Clough und Bent (1998). Nach der Infiltration der Pflanzen mit den zuvor erzeugten Stämmen GV3101(pMP90)/IB16.41.1 und GV3101(pMP90)/SK16.43.1 (Kap. C4.1) wurden diese zur Blüte gebracht und die geernteten Samen in Erde ausgelegt. Die gekeimten Pflänzchen wurden im Vier- bis Sechsblattstadium vereinzelt und unter den Standard-Kultivierungsbedingungen angezogen [B2.1.2]. Um eine schnelle und effektive Selektion der positiven Transformanden zu ermöglichen, wurden diese nach der Vereinzelung mehrfach mit 10 mg/L L-Pt besprüht.

Die Behandlung der mitgeführten Wildtypen führte zum Absterben der Pflanzen. Schon nach der ersten Herbizidbehandlung waren diese deutlich geschädigt. Der größte Teil der Pflanzen, die aus den Samen nach der Blütentauchung keimten, waren sensitiv gegenüber dem Herbizid. Nur einige wenige Pflanzen zeigten auch nach mehrfacher Herbizidbehandlung über die gesamte Anzuchtperiode keine sichtbaren Schädigungen. Im Gegensatz zum Wildtyp waren diese in der Lage das toxische L-Pt zu acetylieren und somit resistent gegenüber dem Herbizid. Wie in Abb. C30 B dargestellt, wurde in diesen Pflanzen anschließend das jeweilige pat-Gen über eine spezifische PCR nachgewiesen. Insgesamt

konnte so eine Linie mit dem *pat*41-Gen und vier unabhängige Linien mit dem *pat*43-Gen erzeugt werden.



Abbildung C30: Nachweis des pat41- und pat43-Konstruktes in planta

A Bindestellen der Primer für die spezifische Amplifikation im *pat*41- und *pat*43-Gen. Das korrekte Amplifikat besitzt eine Größe von ca. 227 bp bzw. ca. 691 bp. B Gelelektrophoretische Auftrennung der spezifischen Amplifikation von den erzeugten Primärtransformanden. Als positive Kontrolle diente Plasmid-DNA aus dem Klon GV3101(pMP90)/IB16.41.1 bzw. GV3101(pMP90)/SK16.43.1 (P). Ein Ansatz ohne Template diente als Kontrolle der verwendeten Komponenten für die PCR (K). Als Größenstandart wurde der 100 bp Ladder Mix von Fermentas mitgeführt (M)

Phänotypisch waren die Primärtransformanden (T1) auch nicht von dem Wildtyp zu unterscheiden (Abb. C31). Für die korrekte Systematisierung wurden die Primärtransformanden mit dem *pat*41- und *pat*43-Gen als Col-0/41-1 bzw. Col-0/43-n bezeichnet. Die transgenen Pflanzen wurden zur Blüte gebracht und die Samen für weitere Untersuchungen geerntet.



Abbildung C31: Gegenüberstellung der erzeugten Primärtransformanden und dem Col-0/Wildtyp

C4.2.2 Inkubation der Arabidopsis Pflanzen unter erhöhten Temperaturbedingungen

Um das Resistenzverhalten der transgenen Arabidopsis Pflanzen unter erhöhten Temperaturbedingungen untersuchen zu können, sollten transgene Linien aus der T2 Generation homolog zu den Tabakpflanzen einem 10tägigen moderatem Hitzestress ausgesetzt werden.

Etablierung der Kultivierungstemperatur für einen moderaten Hitzestress

Die natürlichen Temperaturen für den verwendeten Ökotyp Col-0 liegen im Mittel bei 15-16°C im Frühjahr und 21-22°C im Herbst (Arabidopsis Biological Resource Center). Die standardisierte Temperatur für die Kultivierung in der Phytokammer liegt bei 22°C. Warner und Erwin (2005) konnten zeigen, dass die Kultivierung bei 36°C über einen Zeitraum von vier Tagen zum Tod von mindestens 50% der untersuchten Pflanzen führte und diese somit deutlich einem Hitzestress ausgesetzt waren. Dagegen kam es bei der Kultivierung von bis zu fünf Tagen bei 32°C und 34°C zu keinen Auswirkungen auf die Ausbildung der Blütenknospen (Warner R. M. und Erwin J. E. 2005); ein phänotypisches Indiz für einen Hitzestress. Ludwig-Müller et al. (2000) konnte beobachten, dass die Kultivierung über 14 d bei 32°C zu ersten leichten phänotypischen Veränderungen führte, wohingegen nach sechs Tagen noch kein Unterschied zu den Kontrollpflanzen bei 22°C auftrat. So waren erste Anzeichen von Seneszenz und trockene Blüten zu beobachten. Weiterhin war die Schotenbildung gestört. Mit Erhöhung der Temperatur nahm die Ausprägung dieser Symptome deutlich zu (Ludwig-Muller J. et al. 2000). Somit ist nicht nur die Temperatur selbst, sondern auch die Dauer, die die Pflanze dieser Temperatur ausgesetzt ist, für eine Reaktion in der Pflanze verantwortlich und können phänotypisch auch charakterisiert werden.



Abbildung C32: Kultivierung von Arabidopsis Col-0/Wildtyp Pflanzen bei 22°C und 31°C. Vergleich der Rosette (A), der Blütenstände (B) und der Schoten von gestressten und unter den Standardbedingungen kultivierten Wildtyp Pflanzen. Die Kontrollpflanzen sind mit einem roten Pfeil markiert.

Daraufhin wurden 10 Col-0/Wildtyp Pflanzen über den Versuchszeitraum von 10 d bei 31°C in der Hitzekammer kultiviert. Zur Kontrolle wurden weitere Wildtypen unter den Standard-Kultivierungsbedingungen mitgeführt. Wie in Abb. C32 A exemplarisch dargestellt, konnte kein wesentlicher Unterschied in der Rosettenbildung beobachtet werden. Jedoch zeigte sich bei dem Vergleich der Blütenstände, dass es bei 31°C zu leichten Verzögerungen in der Entwicklung gekommen ist (Abb. C32 B). Weiterhin war bei diesen Pflanzen auch die Schotenbildung eingeschränkt (Abb. C32 C). Dennoch überlebten alle untersuchten Pflanzen

die Kultivierung bei 31°C, waren vital und in der Lage keimfähige Samen auszubilden. Somit konnte gezeigt werden, dass eine zehn tägige Kultivierung bei 31°C zu einer Reaktion in der Pflanze führt, ohne aber diese letal zu schädigen und diese Bedingungen auch für die weiteren Untersuchungen genutzt wurden, um einen moderaten Hitzestress in den Arabidopsis Pflanzen zu induzieren.

Phänotypischer Nachweis der Acetyltransferase Aktivität in transgenen Arabidospis Pflanzen nach dem moderatem Hitzestress

Die ersten Untersuchungen mit den Nachkommen der Primärtransformanden haben gezeigt, dass es in den Pflanzen mit dem *pat*41-Gen unter Hitze zu einer Abnahme des Pat steady state Levels kommt. Dagegen blieb dieser in Pflanzen mit dem *pat*43-Gen unverändert (Ergebnisse nicht gezeigt).





Zusammenfassend für die durchgeführten Untersuchungen sind exemplarische Linien mit dem *pat*41- und *pat*43-Gen dargestellt. Bei keiner dieser Pflanzen führte die Inkubation bei 31°C zum Verlust der Herbizid-Resistenz. Dagegen waren bei Col-0/Wildtyp Pflanzen schon nach kurzer Zeit deutliche Beeinträchtigungen zu beobachten.

Anzucht Primärtransformanden Während der der konnten keine stabilen Kultivierungstemperaturen gewährleistet werden, so dass in der Spitze Temperaturen bis 26°C erreicht wurden. Obwohl sich diese phänotypisch nicht von den Kontrollpflanzen unterschieden und auch keine Hitze-induzierten Symptome (Abb. C32) beobachtet werden konnte, waren diese möglicherweise schon an höhere Temperaturen adaptiert und könnten somit die Untersuchungsergebnisse verfälschen. Um optimal angezogene Elternpflanzen für die Untersuchungen zu erzeugen, wurden daraufhin Nachkommen der Primärtransformanden (T2 Generation) in einer Phytokammer unter stabilen Bedingungen bei 22°C und Selektionsdruck angezogen. Der folgenden Hitzestressversuch [B2.1.3] wurde dann mit Pflanzen aus der T3 Generation jeder Primärtransformande durchgeführt und einmal wiederholt. Als Kontrolle wurde der Wildtyp mitgeführt. Um die Herbizid-Resistenz der Pflanzen während des Versuches zu testen, wurden diese jeden zweiten Tag mit 10 mg/L L-Pt besprüht.

Wie zu erwarten, zeigten die Wildtyp Pflanzen nach nur einer Behandlung mit 10 mg/L L-Pt schon deutliche Schädigungen (Col-0/wt, Abb. C33). Dagegen konnte weder bei den Col-0/41 noch bei den Col-0/43 Linien sichtbare Reaktionen auf das Herbizid beobachtet werden (Abb. C33). Entgegen den Ergebnissen mit dem *pat*41- und *pat*43-Gen in *N. tabacum*, führte die Erhöhung der Umgebungstemperatur transgener Arabidopsis Pflanzen nicht zu dem Verlust der Herbizid-Resistenz.

C4.2.3 Nachweis des Pat-Proteins und Bestimmung der Phosphinothricin-*N*-Acetyltransferase Aktivität in transgenen Arabidopsis Pflanzen nach dem moderatem Hitzestress

Unabhängig von der Umgebungstemperatur, konnte bei den untersuchten Col-0/41 und Col-0/43 Pflanzen phänotypisch keine Reaktion gegenüber dem Herbizid beobachtet werden (Abb. C33). Auch die SRI/47 und SRI/48 Pflanzen wiesen unter Hitze einen resistenten Phänotyp auf (Abb. C10 B). Jedoch konnte in einigen der untersuchten Linien eine deutliche Hitze-induzierte Abnahme des Pat-Proteins und Reduktion der spezifischen Enzymaktivität gezeigt werden (Abb. C11 / C12). Daher wurde untersucht, ob die Temperaturerhöhung auch einen Einfluss auf das Pat steady state Level in den transgenen Arabidopsis Pflanzen Hierfür wurden Pflanzen aus der T3 Generation dem 10tägigen Hitzestress nimmt. unterzogen, direkt im Anschluss beprobt und das Gesamtlösliche Protein aus dem Blattmaterial (Rosette) isoliert. Um eine höchst mögliche Vergleichbarkeit gewährleisten zu können, wurde darauf geachtet für die Beprobung stets Blätter in annähernd gleichen Entwicklungsstadien zu ernten. Das Pat-Protein wurde über einen polyklonalen Antikörper nachgewiesen. Die ungefähre Aktivität der Phosphinothricin-N-Acetyltransferase konnte mit Pat-Test Einfluss dem abgeschätzt werden. Um einen möglichen der Kultivierungstemperatur auf das Pat steady state Level in den transgenen Pflanzen zeigen zu können, wurden der Gehalt und die Aktivität des Pat-Proteins in den Pflanzen unter Hitze bestimmt und mit den Geschwistern bei 22°C verglichen. Als Kontrolle wurde der Wildtyp mitgeführt. Es wurden mindestens vier Geschwister (T3) von jeweils zwei Eltern (T2) jeder Primärtransformande untersucht.

Wie in Abb. C34 A exemplarisch dargestellt, konnte in allen transgenen Pflanzen bei 22°C unterschiedliche Mengen an Pat-Protein nachgewiesen werden. Diese waren auch alle in der Lage unterschiedlich viel Substrat umzusetzen (Abb. C34 B). Die Erhöhung der

Kultivierungstemperatur auf 31°C führte in den Linien beider Events zu unterschiedlichen Reaktionen. Die untersuchten Nachkommen der Primärtransformande Col-0/41-1 verhielten sich unter Hitze gleich. Verglichen mit den Geschwistern bei 22°C, konnte in den Nachkommen der Elter Col-0/41-1-1 und Col-0/41-1-2 bei 31°C eine deutliche Abnahme der Pat-Proteinmenge und Reduktion der Substratumsetzung gezeigt werden. Im Gegensatz dazu verhielten sich die Nachkommen der Primätransformanden Col-0/43-1, -3, -6 und -7 unter Hitze unterschiedlich. Die Nachkommen des Elter Col-0/43-1-1 verhielten sich wie die Nachkommen der Primärtransformande Col-0/41-1. Verglichen mit den Geschwistern bei 22°C, konnte auch in den Nachkommen des Elter Col-0/43-6-2 bei 31°C deutlich weniger Pat-Protein und eine reduzierte Pat-Aktivität gezeigt werden. Dagegen war der Pat steady state Level der Nachkommen von dem Elter Col-0/43-6-1 unter Hitze vergleichbar mit den Geschwistern bei 22°C. Auch bei den Primätransformanden Col-0/43-3 und Col-0/43-7 konnte unter Hitze ein unterschiedliches Verhalten innerhalb der Linien gezeigt werden. So war der Pat steady state Level in den Nachkommen der Elter Col-0/43-3-2 und Col-0/43-7-1 unverändert. Dagegen zeigten die Nachkommen der Elter Col-0/43-3-1 und Col-0/43-7-2 unter Hitze eine Zunahme des Pat-Proteins und der Pat-Aktivität. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass ähnlich wie in N. tabacum auch in Arabidospis eine Regulation des pat41- und pat43-Gens unter erhöhten Temperaturbedingungen auftritt.



Abbildung C34: Nachweis des Pat-Proteins und der Enzymaktivität in ausgewählten Arabidopsis Pflanzen unter Hitze. Exemplarisch für die untersuchten Arabidospis Pflanzen sind jeweils zwei Geschwister (T3) von beiden Elter (T2) jeder Primärtransformande (T1) und der Wildtyp dargestellt. In allen transgenen Pflanzen bei 22°C konnten unterschiedliche Mengen des Pat-Proteins (A) und unterschiedlich starke Pat-Aktivitäten (B) nachgewiesen werden. Die Linien beider Events reagierten unter Hitze unterschiedlich.

wt, Wildtyp; Pat, Phosphinothricin-*N*-Acetyltransferase (23 kDa); L-Pt, L-Phosphinothricin; L-*N*-ac-Pt, L-*N*-acetyl-phosphinothricin; MPP, 3-methyl-phosphinico-Propansäure

D Diskussion

Eine Kultivierung verschiedener transgener Tabak Linien bei 37°C kann zu einem reversiblen Verlust bzw. einer Reduzierung der Phosphinothricin-*N*-Acetyltransferase führen. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente sollten dazu beigetragen, die dafür verantwortlichen Sequenzelemente zu identifizieren und den molekularen Mechanismus zu charakterisieren. Weiterhin sollte untersucht werden, ob dieses im Folgenden auch als Hitzeinduzierte Transgeninaktivierung bezeichnete Phänomen ein endogener Mechanismus zur Reaktion verschiedener Gene auf ansteigende Temperaturen ist, der möglicherweise auch in anderen Pflanzenspezies vorkommt. Die Ergebnisse werden im Vergleich zu verschiedenen bereits bekannten Transgeninaktivierung der Hitze-induzierten Transgeninaktivierung für die Grundlagenforschung und die Bedeutung der Hitze-induzierten Transgeninaktivierung für den Einsatz gentechnisch veränderter Pflanzen (GVP) in der Landwirtschaft sind ebenfalls Gegenstand dieser Diskussion.

D1 Erzeugung transgener Pflanzen durch die Integration der Phosphinothricin-*N*-Acetyltransferase und der Luciferase.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen erfolgten mit verschiedenen Varianten des Phosphinothricin-*N*-Acetyltransferase (*pat*) - und Luciferase (*luc*) Gens in den Modellpflanzen *Nicotiana* (*N*.) *tabacum* und *Arabidopsis* (*A*.) *thaliana*. Im Folgenden soll die Transformation und die Kultivierung der transgenen Pflanzen diskutiert werden.

Nicotiana tabacum

Die stabile Integration der Transgene in N. tabacum erfolgte über die Blattscheibentransformation (Horsch R. B. et al. 1985). Eine gängige und effiziente Methode für die Überführung von Fremdgenen in Tabak. Durch die Integration des pat47- und pat48-Gens ist es gelungen Herbizid-resistente Pflanzen zu erzeugen und somit die notwendige Grundlage für die weiteren Untersuchungen zu schaffen. Unabhängig von der Kultivierungsmethode, führte die mehrfache Behandlung der transgenen Pflanzen mit einer toxischen Dosis des Herbizids BASTA® zu keinen sichtbaren Schädigungen. Weiter lassen die erhobenen Transformationsraten, die für das pat47- und pat48-Konstrukt in einem für Tabak üblichen Bereich lagen, und der Phänotyp der transgenen Linien im Vergleich zu den Kontrollpflanzen auch keinen Einfluss der eingebrachten Transgene auf die Entwicklung der Pflanzen erkennen. Dies entspricht auch den Beobachtungen früherer Arbeiten, die ebenfalls

Herbizid-resistente Tabakpflanzen durch die Integration des *pat*-Gens erzeugt haben (Broer I. 1989, Dröge-Laser W. et al. 1992, Dröge-Laser W. et al. 1994, Köhne S. et al. 1998).

Die Transformationsraten des AQ2- und luc43-Konstruktes waren mit durchschnittlich 0,55 bzw. 0,53 Sprosse/Explantat verglichen mit denen des pat47- und pat48-Konstruktes deutlich geringer. Jedoch wurden alle Konstrukte basierend auf den Agrobakterien vermittelten Gentransfer über die Blattscheibentransformation in N. tabacum SRI überführt. Zudem wurde auch immer der gleiche Agrobakterien-Stamm (LBA4404) verwendet, so dass die verschieden genutzten binären Transformationsvektoren für die unterschiedlichen Transformationsfrequenzen verantwortlich sein mussten. Das AQ2-Konstrukt ist im pBIN19 (Bevan M. 1984) und das luc43-Konstrukt im pROK1 integriert, einem Derivat des pBIN19. Dagegen sind das pat47- und pat48-Konstrukt in dem effizienteren pLH9000 eingebracht (Hausmann L. und Töpfer R. 1999). Der pBIN19 ist der älteste und am häufigsten eingesetzte binäre Transformationsvektor, hat aber eine Reihe von Nachteilen. Der pflanzliche Selektionsmarker (nptll-Gen) enthält eine Punktmutation (Yenofsky R. L. et al. 1990), die zu einer vierfach niedrigen Resistenz transgener Pflanzen gegenüber Kanamycin führt (Frisch D. A. et al. 1995) und somit die Transformationseffizienz negativ beeinflusst. Dalta et al. (1992) konnten ohne diese Mutation in Raps eine zweifach höhere Transformationsfrequenz erreichen. Darüber hinaus hat der pBIN19 im Gegensatz zu den meisten binären Vektoren den Selektionsmarker an der rechten 'Border' und das Zielgen an der linken 'Border' (Abb. D1). Dies führt bei der Selektion in der Gewebekultur dazu, dass der Selektionsmarker, nicht aber das Zielgen, vollständig übertragen wird, weil die T-DNA beginnend mit der rechten 'Border' - und an der linken 'Border' oft ungenau endend - in die Pflanze transferiert wird (Hausmann L. und Töpfer R. 1999).



Abbildung D1: Gegenüberstellung der in N. tabacum integrierten T-DNAs

Weiterhin besitzt der pBIN19 das in Agrobakterien aktive RK2-Minimalreplikon. Jedoch fehlen die Genloci *parA* (Mrs) und *korA-kfrA*, die für dessen stabilen Vermehrung benötigt

werden und so dass die Stabilität und Kopienzahl während der Vermehrung in den Agrobakterien begrenzt ist (Schmidhauser T. J. und Helinski D. R. 1985, Pansegrau W. et al. 1994, Sobecky P. A. et al. 1996). Die Vermutung, dass der binäre Vektor pBIN19 für die geringere Transformationsfrequenz verantwortlich ist wird weiter durch die Tatsache unterstützt, dass die Transformationsraten nur des pLH9000 ohne Zielgen mit 1,00 Sprosse/Explantat deutlich höher waren als diese nur des pROK1 ohne Zielgen.

Das Wachstum und die Morphologie der Primärtransformanden mit dem AQ2- und luc43-Konstrukt waren unter den Standard-Kultivierungsbedingungen zunächst nicht von denen der untransformierten nah isogenen Variante zu unterscheiden. Jedoch war im Laufe der in vitro Vermehrung und im Gewächshaus sukzessive die Regeneration dieser Pflanzen gestört. Verglichen mit der nah isogenen Variante waren bei den transgenen Pflanzen die Induktion des Wurzelwachstums und auch die Entwicklung zeitlich verzögert. Zudem war auch die Blühinduktion deutlich früher induziert. Diese Prozesse werden in der Pflanze hormonell gesteuert (zur Übersicht siehe Gaspar T. et al. 1996, Xiong G. S. et al. 2009), so dass die beobachteten Symptome auf eine Verschiebung im Gleichgewicht der Phytohormone hindeuten könnten. In früheren Arbeiten konnte beobachtet werden, dass die Integration der T-DNA von A. rhizogenes zu einer Veränderung in der Blattmorphologie führte (Tepfer D. 1984, Guerche P. et al. 1987). Die Expression der auf dieser T-DNA liegenden Gene führte zur Veränderungen in der Auxin Sensitivität der Pflanze, so dass diese eine scheinbare Verschiebung des Phytohormon-Gleichgewichts registrierten und daraufhin entsprechend reagierten. Zagorskaya et al. (2009) haben gezeigt, dass die Integration von T-DNAs in Endogene von N. tabacum L. den Gehalt und die Dynamik von Auxin und Cytokininen verändern kann und es daraufhin in diesen Pflanzen zu Beeinträchtigungen während der Blüten-Morphogenese kommt. In diesem Fall scheint das aber unwahrscheinlich, weil es in allen untersuchten Pflanzen zu den phänotypischen Modifikationen kommt und somit unabhängig vom Integrationsort sein muss. Auch die Expression des luc-Gens kann nicht für die Veränderungen verantwortlich sein, weil Pflanzen mit dem pBIN19 ohne das Zielgen ebenfalls den modifizierten Phänotyp zeigten (s.o.). Unterstützt wird dies durch die Arbeiten von Quandt (1989) und Neumann (1997), die auch das luc-Gen aus Photinus pyralis in N. tabacum einbrachten aber keine vergleichbaren Modifikationen des transgenen Phänotyps beschrieben. Zusammen mit dem Zielgen wurde das nptll-Gen als Selektionsmarker in die Pflanzen übertragen. Jedoch kann auch das Markergen als Ursache für die Modifikationen ausgeschlossen werden, da dieses ebenfalls in den SRI/9000, SRI/47 und SRI/48 Pflanzen exprimiert wird aber zu keinen vergleichbaren Veränderungen im Phänotyp führte (s. o.). Die Modifikationen traten unabhängig von den Transformation und den genutzten Ausgangspflanzen auf, so dass auch diese Faktoren nicht

die Ursache sein können. Letztlich kommen nur noch die für Transformationen eingesetzten Agrobakterien in Frage. Möglicherweise war der verwendete Bakterienstamm kontaminiert.

Arabidopsis thaliana

Die stabile Integration des pat41- und pat43-Gens erfolgte über die Blütentauchmethode (Clough S. J. und Bent A. F. 1998). In Vorarbeiten war es nicht gelungen die pat-Gene mit Hilfe des Agrobakterien-Stamm LBA4404 in das Arabidopsis Genom einzubringen. Jedoch ist es in dieser Arbeit durch die Überführung der Plasmide plB16.41 und pSK16.43 in den Agrobakterien-Stamm GV3101(pMP90) gelungen das pat41- und pat43-Gen stabil in das pflanzliche Genom zu integrieren. Dies ist mit der höheren Transformationseffizienz des Bakterienstammes GV3101 aufgrund zusätzlicher Virulenzgene auf dem Helferplasmid pMP90 zu erklären (Koncz C. und Schell J. 1986). Diese sind essentiell für die Übertragung der T-DNA vom binären Transformationsvektor in das pflanzliche Genom (Zupan J. et al. 2000). Insgesamt konnten in dieser Arbeit eine Herbizid-resistente Linie mit dem pat41-Gen und vier resistente, unabhängige Linien mit dem pat43-Gen erzeugt werden. Diese relativ geringen Transformationsraten entsprachen auch durchaus den Angaben in der Literatur (Clough S. J. und Bent A. F. 1998, Lee J. H. et al. 2009, Zhang B. et al. 2010). Die mehrfache Behandlung aller erzeugten Primärtransformanden und derer Nachkommen mit einer toxischen Dosis des Herbizids BASTA® führte zu keinen sichtbaren Schädigungen. Weiterhin konnten diese phänotypisch auch nicht vom Wildtyp unterschieden werden, so dass keinen Einfluss der eingebrachten Transgene auf die Entwicklung der Pflanzen zu erkennen war.

D2 Die Grundexpression des *pat*-Gens wird durch die Kombination der regulatorischen Elemente beeinflusst.

Die Expression eines Gens kann über Sequenzelemente, die die Kodierregion umgeben, reguliert werden (Kap. A1). Das *pat*47- und *pat*48-Gen unterscheiden sich in dem verwendeten Promotorfragement, der 5' UTR und dem 3' Terminationssignal (Abb. C1 B). Im Folgenden soll das Expressionsniveau unter den Standard-Kultivierungsbedingungen bei 24°C (Grundexpression) verglichen und im Kontext mit den weiteren *pat*-Genen (Abb. A1) diskutiert werden.

Die Quantifizierung des Pat-Proteins in den Tabakpflanzen mit dem *pat*47- und *pat*48-Gen hat ergeben, dass die Expression des Transgens zwischen den unabhängigen Linien eines Konstruktes stark schwanken. Auch in den Klonen einer Linie kam es zu Unterschieden im Pat-Protein-Gehalt, wenn diese auch geringer waren. Gleiches konnte ebenfalls in den

Tabakpflanzen mit dem patOCA-, pat43-, pat44-, pat45-, pat46- und pat50-Gen beobachtet werden (Knöchel N. et al. 2011). Solche Variationen zwischen unabhängigen Transformanden sind ausführlich bekannt und können durch die Kopienzahl, den Integrationsort, der T-DNA Struktur und den physiologischen Zustand der einzelnen Transformande beeinflusst werden (Jones J. D. G. et al. 1987, Hobbs S. L. A. et al. 1990, Peach C. und Velten J. 1991). Letzteres wurde versucht so gering wie möglich zu halten, indem die Pflanzen unter identischen Bedingungen kultiviert und für die entsprechenden Analysen Blätter in annähernd gleichen Entwicklungsstadien beprobt wurden. Die Bestimmung der Kopienzahl des pat-Gens in den SRI/47 und SRI/48 Linien zeigte keine Korrelation zwischen dem Expressionsniveau des Pat-Proteins und der spezifischen Kopienzahl. Die untersuchten Linien hatten entweder eine oder zwei bzw. drei Kopien des Transgens. Auch in den SRI/OCA, SRI/43, SRI/44, SRI/45, SRI/46 und SRI/50 Pflanzen gab es keine Korrelation zwischen der Pat-Expression und der Kopienzahl des Transgens (Knöchel N. et al. 2011). Zudem wird auch die Korrelation zwischen der Kopienzahl und der Expression eines Gens in der Literatur kontrovers diskutiert. So gibt es Untersuchungen, die entweder einen positiven Effekt (Stockhaus J. et al. 1987, Gendloff E. H. et al. 1990, Ku M. S. B. et al. 1999) oder auch einen negativen Effekt (Jones J. D. G. et al. 1987, Hobbs S. L. A. et al. 1990, Jorgensen R. A. et al. 1996, Schubert D. et al. 2004) beobachteten. Im Unterschied dazu zeigen andere Arbeiten eindeutig, dass es keine Korrelation gibt (Jones J. D. G. et al. 1985, Jorgensen R. et al. 1987, Dean C. et al. 1988, Shirsat A. H. et al. 1989, Peach C. und Velten J. 1991). Biolistische Transformationssysteme haben zur Folge, dass das Transgen oft als 'tandem repeat' - häufig als 'inverted repeat' - in das pflanzliche Genom integriert (Christou P. 1992, Pawlowski W. P. und Somers D. A. 1998). Solche repeat Strukturen gehen oft einher mit einer verstärkten Methylierung und daraus resultierenden Inaktivierung - 'Silencing' - des Transgens (Muskens M. W. M. et al. 2000, Huettel B. et al. 2007). Basierend auf den in dieser Arbeit verwendeten Agrobakterien vermittelten Gentransfer kommt es dagegen hauptsächlich zur kompletten Integration einzelner Kopien (Muskens M. W. M. et al. 2000). Weiterhin konnte in Tabakpflanzen mit dem luc-Gen gezeigt werden, dass eine Hitze-induzierte Inaktivierung der Transgenvermittelten Enzymaktivität nicht auf ein verändertes Methylierungsmuster zurückzuführen ist (Neumann K. 1997). Die Analyse der Struktur der integrierten T-DNA war nicht Gegenstand dieser Arbeit, so dass dieser Faktor für die unterschiedlichen Expressionsniveaus des Pat-Proteins in den unabhängigen Transformanden nicht ausgeschlossen werden kann.

Vergleicht man den Gehalt an transgenem Pat-Protein aus unterschiedlichen Linien der beiden Konstrukte miteinander, so sind die gemittelten Ergebnisse nicht signifikant voneinander zu unterscheiden. Vergleicht man diese mit den weiteren *pat*-Genen (*pat*OCA, *pat*43, *pat*44, *pat*45 und *pat*46) sind jedoch signifikante Unterschiede in der Grundexpression

des Pat-Proteins vorhanden. Diese *pat*-Gene besitzen die *pat*S-Kodierregion aber unterscheiden sich in der Kombination des verwendeten Promotorfragments, dem Terminationssignal und den untranslatierten Regionen (Abb. A1). Jedoch können die unterschiedlich langen Promotorfragmente (CaMV₈₃₂, CaMV₅₃₄) als Ursache dafür ausgeschlossen werden, weil (i) das gemittelte Expressionsniveau des Pat Proteins in den SRI/47 (CaMV₈₂₃) und SRI/48 (CaMV₅₃₄) Pflanzen nicht signifikant voneinander zu unterscheiden ist (s. o.), (ii) die unterschiedlichen Grundexpressionen in den SRI/OCA, SRI/43, SRI/44, SRI/45 und SRI/46 Pflanzen nicht mit den Promotorvarianten korrelieren (Knöchel N. et al. 2011) und (iii) beide Promotorfragmente sich auch nicht in ihrer Aktivität voneinander unterscheiden (Odell J. T. et al. 1985). Demnach muss das Expressionsniveau des Pat-Proteins über die spezifischen Kombinationen der 5' UTR, 3' UTR und dem 3' Terminationssignal beeinflusst werden.

Knöchel et al. (2011) haben gezeigt, dass das Pat steady state Level mit dem spezifischen Transkript-Gehalt korreliert. Die Transkriptionsanalysen in dieser Arbeit haben ergeben, dass auch in den untersuchten SRI/47 und SRI/48 Pflanzen unter den Standard-Kultivierungsbedingungen das Pat steady state Level mit dem patS-mRNA Gehalt korreliert. Solche Korrelationen sind auf Ebene der Translationsinitiation ausführlich beschrieben (Mazumder B. et al. 2003). Weiterhin haben Ali und Taylor (2001) beobachtet, dass Sequenzen im 5' und 3' Bereich die Akkumulation der mRNA beeinflussen können ohne dies aber näher erläutern zu können. Banerjee et al. (2009) konnten zeigen, dass die 5´UTR in Kombination mit der 3´ UTR des StBEL5 Transkriptionsfaktors aus Solanum tuberosum zu einem höheren gus-mRNA Gehalt führen als der 5' oder 3' UTR alleine. Der erhöhte Transkript-Gehalt konnte durch eine erhöhte Stabilität der spezifischen mRNA und die Repression ihrer Translation erklärt werden (Banerjee A. K. et al. 2009). Knöchel et al. (2011) konnten zeigen, dass die Stabilität der patS-mRNA weder von den genutzten UTRs (5' UTR41 und 5' UTRS) noch von den 3' Terminationssignalen (3' camv und 3' nos) beeinflusst wird und somit unterschiedliche Transkriptionsraten für die verschiedenen patSmRNA steady state Level verantwortlich sein müssen.

D3 Die Hitze-induzierte Transgeninaktivierung wird durch den 5' UTR41 und den 3' *nos* reguliert.

Im Folgenden soll der Einfluss der regulatorischen Elemente des *pat*41-Gens und deren Kombinationen auf die Expression der Phosphinothricin-*N*-Acetyltransferase und der Luciferase in *N. tabacum* und *A. thaliana* während eines moderaten Hitzestresses verglichen und diskutiert werden. Weiterhin sollen Ansatzpunkte für mögliche Regulationsmechanismen auf molekularer Ebene aufgezeigt werden.

Induzierung eines moderaten Hitzestresses

Neumann (1997) hat gezeigt, dass in transgenen N. tabacum Pflanzen bei 37°C ein moderater Hitzestress induziert wird. Dagegen sind die Bedingungen für die Induzierung eines moderaten Hitzestresses in A. thaliana Col-0 nicht eindeutig in der Literatur definiert und mussten somit zunächst einmal etabliert werden. Zhang et al. (2010) beobachteten in A. thaliana Col-0 Pflanzen bei Kultivierungstemperaturen von 30°C bis 40°C reversible Störungen in ihrer Photosynthese und definieren daraufhin diesen Bereich als moderaten Hitzestress. Dagegen war die Photosynthese ab 42°C irreversibel geschädigt. Dieser Temperaturbereich wurde somit als akuter Hitzestress bezeichnet. Jedoch dauerten die Expositionen maximal 30 Minuten an. In früheren Arbeiten mit Col-0 Keimlingen und ganzen Pflanzen wurde beobachtet, dass man deren Kultivierung bei 30°C bis 34°C auch über einen Zeitraum von mehreren Tagen, ohne eine wesentliche sichtbare Schädigung der Pflanzen durchführen kann, wohingegen es bei Temperaturen ab 36°C schon nach weniger als 10 Tagen zum Tod von mindestens 50% der untersuchten Keimlinge bzw. Pflanzen kam (Ludwig-Muller J. et al. 2000, Warner R. M. und Erwin J. E. 2005). Diese Studien zeigen, dass für die Induzierung eines moderaten Hitzestresses nicht nur die Temperatur, sondern auch die Dauer der Exposition ausschlaggebend ist. Die Ergebnisse des in dieser Arbeit durchgeführten Experiments für die Etablierung der Temperatur, um über die gesamte Versuchsdauer in den Pflanzen einen moderaten Hitzestress zu induzieren, knüpfen nahtlos daran an. Verglichen mit den Kontrollpflanzen bei 22°C, führte die 10 tägige Exposition bei 31°C bei den untersuchten Col-0/Wildtyp Pflanzen zu leichten Verzögerungen in der Entwicklung der Blütenstände und der Schoten. Jedoch kam es bei all diesen Pflanzen zu keinen letalen Schädigungen. Die Pflanzen waren vital und in der Lage keimfähige Samen auszubilden.

Einfluss der Kombinationen 5´ UTR41/3´ UTR41 und 3´ UTR41/3´ nos auf die Transgenexpression während eines moderaten Hitzestresses

Die Hitzestressversuche und die sich anschließende Proteinanalytik der SRI/47 und SRI/48 Pflanzen haben ergeben, dass die Kombination der 5' UTR41 mit dem 3' UTR41 (*pat*47) und die Kombination der 3' UTR41 mit dem 3' *nos* (*pat*48) nur in einigen der untersuchten Tabak Linien zu einer Abnahme des Pat-Proteins und somit auch der spezifischen Enzymaktivität führten. In den weiteren Linien war dieser bei 37°C vergleichbar mit denen der isogenen 24°C Kontrollen. Dagegen konnte in allen untersuchten Pflanzen mit der Kombination 5' UTR41/3' *nos* (*pat*43) weder das spezifische Protein noch eine Enzymaktivität detektiert werden (Köhne S. et al. 1998). Somit führt nur die Kombination

spezifischer Sequenzmotive in der 5' UTR41 und dem 3' *nos* zu einer Linien unabhängigen, Hitze-induzierten Inaktivierung des Transgen-kodierten Protein steady state Level. Im Folgenden soll diskutiert werden, welche Faktoren die Unterschiede in den SRI/47 bzw. SRI/48 Linien hervorrufen könnten, die dann zu einer Hitze-sensitiven Pat Aktivität führten. Solche Faktoren können in *trans*, also unabhängig von der Transgen-kodierten DNA, RNA oder dem Protein in der Pflanze vorliegen, oder aber in *cis*, also an das Transgen gebunden sein.

Ein möglicher Faktor, der einen Unterschied zwischen den verschiedenen Tabak Linien hervorrufen könnte, ist das Auftreten von Sekundärmutationen in den einzelnen Linien. Eine solche somaklonale Variation kann durch Gewebekultur und Transformation der Pflanzen hervorgerufen werden (Marton L. et al. 1994, Nikova V. et al. 1998, Mori S. et al. 2007). Diese Sekundärmutationen treten vergleichsweise häufig auf. So ließen sich die allermeisten im Rahmen einer T-DNA Mutagenese erzeugten Mutationen auf von der T-DNA Insertion unabhängigen Sekundärmutationen zurückführen. Zudem zeigten diese sehr selten eine Co-Segregation mit der T-DNA Insertion (Andre D. et al. 1986, Koncz C. et al. 1992). Falls Sekundärmutationen für die Hitze-spezifische Reaktion des Pat steady state Level verantwortlich sind, müssten diese in der Regel in trans wirken und somit sollte in einem Teil der Pflanzen in der T1-Generation eine Segregation dieses Faktors und damit eine veränderte Reaktion auf die Hitzebehandlung zu beobachten sein. In der T1-Generation von Tabakpflanzen mit dem pat44- und pat46-Gen, die ebenfalls unter Hitze einen intermediären Effekt aufweisen, konnte keine solche Veränderungen in den Nachkommen beobachtet werden (Kerbach S. 1999, Latzkow T. et al. 2011), so dass der entscheidende Faktor gekoppelt mit dem Transgen vorliegen muss. Solche Faktoren können pflanzeneigene regulatorische Elemente sein, die je nach Integrationsort des Transgens in den verschiedenen Tabak Linien variierten. Dabei könnte es sich um DNA-Seguenzen sowie um die dadurch hervorgerufene Chromatinstruktur handeln (Jones J. D. G. et al. 1987, Dean C. et al. 1988, Fang R. X. et al. 1989, Peach C. und Velten J. 1991, Nap J. P. et al. 1993, Mlynarova L. et al. 1994). Demnach müssten die regulatorischen Sequenzmotive in der 5 UTR41 und dem 3' nos ebenfalls im Tabakgenom vorhanden sein, so dass es nur in den Linien zu einer spezifischen Reaktion unter Hitze kommt, in der das pat47- bzw. pat48-Gen in die räumliche Nähe des endogenen Gegenspielers integriert ist.

Offen bleibt dabei die Frage, warum es im Gegensatz zu den Hitze-gestressten SRI/43 Pflanzen in den Hitze-sensitiven SRI/47 und SRI/48 Linien nicht zu dem kompletten Verlust, sondern nur zu einer Reduzierung des Pat steady state Level kommt. Auch dies kann durch endogene Faktoren, die je nach Integrationsort des Transgens in den verschiedenen Tabak Linien variieren, reguliert werden. Es gibt eine Vielzahl von Arbeiten die beschreiben, dass der Integrationsort des Transgens im pflanzlichen Genom auch deren Expression

maßgeblich beeinflussen können (Linn F. et al. 1990, Iglesias V. A. et al. 1997, Fladung M. 1999, Kooter J. M. et al. 1999, Kumar S. und Fladung M. 2001, Kohli A. et al. 2003). Unterstützt wird dies durch die Beobachtungen, dass die negative Regulation zwischen den Hitze-sensitiven Linien mit dem *pat*47- bzw. *pat*48-Gen auch unterschiedlich stark ausgeprägt sein kann. So konnte in den Linien SRI/47-18, SRI/48-30 und -39 nach der Hitzebehandlung kein Pat-Protein und/oder auch keine Pat-Aktivität mehr detektiert werden. Dennoch waren diese auch weiterhin resistent gegenüber dem Herbizid. Vermutlich lagen die Proteinmengen in diesen Linien unter der Nachweisgrenze der verwendeten Messsysteme aber waren immer noch ausreichend, um das applizierte toxische L-Pt umzusetzen. Diese Beobachtungen gehen auch einher mit Daten von Broer, die zeigen konnte, dass geringste Mengen des Pat-Proteins für eine Herbizid-Resistenz ausreichend sind (Broer I. 1989).

Zusammengefasst deuten die Ergebnisse daraufhin, dass die Entscheidung zwischen Hitze-Stabilität oder Hitze-Sensitivität der Phosphinothricin-*N*-Acetyltransferase, abhängig vom Integrationsort über das Vorhandensein oder Fehlen endogener regulatorischer Sequenz-Elemente und/oder der Chromatinstruktur in räumlicher Nähe des *pat*-Gens gefällt wird.

Einfluss der 3' UTR 41 auf die Transgenexpression während eines moderaten Hitzestresses

Während des moderaten Hitzestresses verhalten sich die untersuchten Pflanzen mit der Kombination 5' UTR41/3' nos (pat47) ähnlich denen mit der 5' UTR41 allein (pat44; Abb. D2). Sandra Kerbach (1999) konnte auch nur in einigen der Hitze-gestressten SRI/44 Pflanzen die Abnahme des Pat steady state Level beobachten. Auch in Pflanzen mit dem 3' nos allein (pat46) kommt es unter Hitze nur in einigen der untersuchten Pflanzen zur Abnahme des Pat steady state Level (unv. Ergebnisse). Das stimmt wiederum überein mit den oben genannten Ergebnissen für die Hitze-gestressten SRI/48 Pflanzen mit der Kombination 3' UTR41/3' nos (Abb. D2). Die bedeutende Funktion der 5' UTR41 und des 3' nos innerhalb der Hitze-induzierten Inaktivierung des Pat steady state Levels ist zuvor von mir schon genannt und diskutiert worden, so dass diese und nicht der 3' UTR41 in den gestressten Pflanzen mit dem pat47- bzw. pat48-Gen für die Abnahme des Pat steady state Level unter Hitze verantwortlich sein müssen. Unterstützt wird dies durch die Tatsache, dass es in keiner der untersuchten Pflanzen mit dem 3' UTR41 aber ohne dem 5' UTR41 bzw. 3' nos (pat45) zu einer Abnahme des transgenen Protein steady state Level unter Hitze kommt (Abb. D2; Latzkow T. et al. 2011). Dagegen zeigten frühere Untersuchungen von Tabakpflanzen mit dem pat45-Gen, dass es während eines moderaten Hitzestresses in einem Teil der transgenen Linien ebenfalls zu einer Reduktion des Pat steady state Levels

kommt (Walter S. 2001). Der einzige Unterschied zwischen beiden Arbeiten lag in der Orientierung des *pat*45-Gens und des Selektionsmarkers (*npt*II), die beide unter der Kontrolle des CaMV-Promotors und -Terminators stehen (Abb. D2). Nur auf der von Walter genutzten T-DNA waren beide Gene in umgekehrter Orientierung zueinander angeordnet.



Abbildung D2: Schematische Darstellung der untersuchten *pat-*Gene und des Transgen-vermittelten Protein steady state Level bei 24°C und nach einem 10tägigen moderaten Hitzestress.

+, positive Detektion; A, signifikante Abnahme; n.d., nicht detektiert; \\, Sequenzdeletion

Die Wiederholung homologer Sequenzen in umgekehrter Reihenfolge ('inverted repeat') geht oft einher mit einer Inhibierung der Trankriptionsinitiation aufgrund der Methylierung von Cytosinresten in der Promotorregion (Muskens M. W. M. et al. 2000, Huettel B. et al. 2007, Marenkova T. V. und Deineko E. V. 2010, Charon C. et al. 2010). Demnach könnte die Inaktivierung in den transgenen Tabak Linien aufgrund der umgekehrten Anordnung der homologen Promotor- und Terminatorsequenzen auf der T-DNA induziert worden sein. Jedoch trat die Transgeninaktivierung nur in Hitze-gestressten Linien auf. Es gibt eine Reihe von Arbeiten, die einen Einfluss der Temperatur auf das 'Gene-Silencing' beschreiben. Beispielsweise führten erhöhte Temperaturen zu einem Verlust der Blütenfarbe in transgenen Petunien aufgrund von Methylierungen des CaMV-Promotors des Mais-A1 Gens (Meyer P. et al. 1992). In anderen Arbeiten wurde eine Temperatur-abhängige Produktion der 'Gene-Silencing' vermittelnden siRNAs beschrieben (Shirsat A. H. et al. 1989, Fojtova M. et al. 2003). Obwohl es in den von Walter untersuchten transgenen Tabak Linien auch nur zu einer Abnahme des Pat steady state Levels kam, waren diese Linien entgegen den Ergebnissen mit den Hitze-sensitiven SRI/47 und SR/48 Linien sensitiv gegenüber dem Herbizid. Hauptsächlich können hierfür zwei Gründe genannt werden. Erstens unterschieden

sich die applizierten Dosen des Herbizids deutlich voneinander. Neben der mehrfachen Besprühung der Versuchspflanzen mit einer 10fachen höheren Konzentration (100 mg/L L-Pt Lösung), hat Walter dem Kultivierungsmedium noch zusätzlich 40 mg/L L-Pt beigemengt. Zweitens beschreibt sie eine erhebliche mikrobielle Kontamination der Versuchspflanzen, verursacht durch den Prozess des Besprühens, die ebenfalls für die phänotypischen Schädigungen verantwortlich sein könnten und/oder daraufhin die Versuchspflanzen anfälliger gegenüber der Herbizidbehandlung waren.

Somit konnte gezeigt werden, dass die 3' UTR41 während eines moderaten Hitzestresses, entgegen den Ergebnissen unter den Standard-Kultivierungsbedingungen (s. o.), keinen Einfluss auf die Pat-Expression nimmt.

Einfluss der Kombinationen 5' UTR41/3' nos auf die Luciferase-Aktivität während eines moderaten Hitzestresses

Um zu untersuchen, ob die beobachtete Hitze-induzierte Regulation unabhängig von dem *pat*-Kodierbereich ist und somit wohlmöglich einen allgemeingültigen Regulationsmechanismus in Tabak darstellt, wurde der *luc*-Kodierbereich gegen den *pat*S-Kodierbereich im *pat*43-Gen substituiert und somit mit der 5' UTR41 und dem 3' nos kombiniert (*luc*43). In den vier untersuchten Linien war die Luciferase-Aktivität unter Hitze eindeutig reduziert. Dies geht einher mit den Ergebnisse von Köhne et al. (1998) der ebenfalls beobachten konnte, dass die Kombination der 5' UTR41 und des 3' *nos* in allen untersuchten Tabak Linien zu einer negativen Regulation des transgenen Protein steady state Level unter Hitze führt.

Eine allgemeine Hitzelabilität der Luciferase-Aktivität kann ausgeschlossen werden (Neumann K. 1997), so dass deren Inaktivierung eindeutig an das Transgen gebunden war. Dennoch war die in dieser Arbeit untersuchte Anzahl transgener Pflanzen nicht ausreichend, um eine signifikante Aussage treffen zu können. Auch wenn es statistisch nicht möglich ist den genauen Probenumfang zu berechnen, um einen möglichen intermediären Effekt auf zu zeigen, haben die Untersuchungen mit den *pat*-Linien gezeigt, dass ein Probenumfang von mindestens zehn unabhängigen Linien notwendig ist. Unterstützt wird das durch die Tatsache, dass es in den sechs unabhängigen Linien mit dem *AQ2*-Konstrukt ebenfalls zu einer eindeutigen und reproduzierbaren Abnahme der Luciferase-Aktivität unter Hitze kommt. Dagegen konnte Neuman (1997) dies nur in einigen der untersuchten SRI/AQ2 Linien beobachten. Auch wenn das in dieser Arbeit verwendete System zum Nachweis der Luciferase-Aktivität quantifizierbar und sensitiver ist, waren die Ergebnisse von Neumann signifikant und reproduzierbare.

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass auch die Kombination der 5' UTR41 und des 3' nos mit dem *luc*-Kodierbereich in transgenen Tabakpflanzen eine signifikante Abnahme der Transgen-kodierten Enzymaktivität vermitteln. Jedoch kann bis dato nicht ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei entgegen den Ergebnissen mit dem *pat*-Kodierbereich um einen intermediären Effekt handelt und sich dann die molekularen Mechanismen voneinander unterscheiden.

Hitze-induzierte Inaktivierung des Pat-steady state Levels in nicht Solanaceen

Während eines moderaten Hitzestresses führte die Kombination der 5' UTR41 und der 3' *nos* mit dem bakteriellen *pat*-Kodierbereich (*pat*41) in allen untersuchten Arabidopsis Pflanzen zu einer signifikanten Abnahme des Transgen-kodierten Protein steady state Level. Dies entspricht den Ergebnissen des *pat*41-Gens in Tabak (Köhne S. et al. 1998) und Kartoffel (unv. Ergebnisse). Jedoch wurden in dieser Arbeit nur die Nachkommen einer Linie untersucht, so dass bis dato keine Aussage über das Verhalten des *pat*41-Gens in *A. thaliana* während eines moderaten Hitzestresses gemacht werden kann.

Die unabhängigen Arabidopsis Linien mit dem *pat*43-Gen zeigten während der Hitzebehandlung ein intermediäres Verhalten. Dagegen konnte in allen untersuchten transgenen Tabak- (Köhne S. et al. 1998) und Kartoffel Linien (unv. Ergebnisse) mit dem *pat*43-Gen eine negative Regulation unter Hitze gezeigt werden. Mögliche vom Integrationsort abhängige und unabhängige Faktoren, einschließlich dem Vorhandensein oder Fehlen endogener regulatorischer Sequenz-Elemente und/oder der Chromatinstruktur in räumlicher Nähe des *pat*-Gens oder somaklonale Variationen, die zu dem unterschiedlichen Hitze-induzierten Verhalten in den verschiedenen Arabidopsis Linien führen können sind schon zuvor von mir diskutiert worden.

Die hier angeführten Ergebnisse sind ein eindeutiger Beleg dafür, dass die 5′ UTR41 und/oder der 3′ *nos* unabhängig von der Pflanzenspezies die negative Regulation des *pat*-Gens aufgrund erhöhter Temperaturen induzieren. Jedoch deuten die unterschiedlichen Ausprägungen der Hitze-induzierten Regulation in Solanacaeen und *A. thaliana* auch darauf hin, dass sich die molekularen Mechanismen voneinander unterscheiden.

D3.1 Die Hitze-induzierte Transgeninaktivierung in Tabak ist unabhängig von der Kopienzahl, dem spezifischen Transkriptlevel und der Grundexpression.

Die Inaktivierung bzw. das 'Silencing' von Transgenen kann mit der Kopienzahl des eingebrachten Gens korrelieren (Muskens M. W. M. et al. 2000, Wang M. B. und

Waterhouse P. M. 2000, De Buck S. et al. 2001). Die Bestimmung der Kopienzahl des *pat*-Gens in den SRI/47 und SRI/48 Pflanzen hat aber keine Korrelation mit der spezifischen Reaktion unter Hitze aufzeigen können. Sowohl in Hitze-stabilen als auch in Hitze-sensitiven Linien mit dem *pat*47- bzw. *pat*48-Gen konnten entweder eine oder zwei Kopien des Transgens nachgewiesen werden. Auch in den Hitze-stabilen und Hitze-sensitiven Linien mit dem *pat*41-, *pat*43-, *pat*44- bzw. *pat*46-Gen konnten sowohl eine als auch mehr Kopien des Transgens nachgewiesen werden (Köhne S. et al. 1998, Knöchel N. et al. 2011). Dies geht einher mit Daten von Neumann, die zeigen konnte, dass in Tabakpflanzen mit dem *luc*-Gen die Hitze-induzierte Inaktivierung der Transgen-vermittelten Enzymaktivität ebenfalls nicht mit der spezifischen Kopienzahl im pflanzlichen Genom korreliert (Neumann K. 1997).

Die Transkriptionsanalysen aller Hitze-sensitiven Linien mit dem *pat*47- bzw. *pat*48-Gen haben gezeigt, dass die Reduktion des Pat steady state Levels nicht immer mit dem *pat*S-mRNA Gehalt korreliert. Zudem konnten auch für beide Konstrukte Hitze-stabile Linien gefunden werden, in denen der spezifische Transkript-Gehalt unter Hitze signifikant abnimmt. Auch in Linien mit dem *pat*44- bzw. *pat*46-Gen konnte keine eindeutige Korrelation zwischen dem spezifischen Transkript-Level und dem Pat-Protein sowohl bei 24°C als auch unter Hitze gezeigt werden (Latzkow T. et al. 2011). Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die Hitze-induzierte Reduktion des Pat steady state Levels unabhängig von dem spezifischen Transkript-Gehalt ist. Bekräftigt wird dies durch die Ergebnisse von Tabakpflanzen mit dem *pat*45-Gen, in denen es unter Hitze weder zu einer Abnahme des Pat-Proteins noch der Pat-Aktivität kommt. In einem Teil der untersuchten Linien konnte sogar eine Erhöhung des Pat steady state Levels unter Hitze beobachtet werden. Dennoch war auch in diesen Linien keine klare Korrelation zwischen dem transgenen Protein steady state und dem spezifischen Transkript-Gehalt auszumachen (Latzkow T. et al. 2011).

Die Quantifizierung des Pat-Proteins im Pat-ELISA hat zudem ergeben, dass auch der Pat-Protein-Gehalt in den transgenen Pflanzen nicht mit der spezifischen Reaktion unter Hitze korreliert. Auch in den Hitze-sensitiven Linien mit dem *pat*44- bzw. *pat*46- (Knöchel N. et al. 2011) und *luc*-Gen (Neumann K. 1997) konnte keine Korrelation zwischen der Transgenvermittelten Grundexpression und deren Abnahme unter Hitze beobachtet werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, das an dem Verlust der Hitze-induzierten Transgenaktivität ein posttranskriptionaler Mechanismus beteiligt sein muss.

D3.2 Welcher Mechanismus ist für die Hitze-induzierte Reduktion des transgenen Protein steady state Levels verantwortlich?

Im Folgenden soll diskutiert werden, wie die Inaktivierung bzw. die Reduktion des transgenen Protein steady state Levels unter Hitze reguliert werden könnte. In dieser Arbeit

wurde gezeigt, dass sowohl der 5' UTR41 als auch der 3 '*nos* eine entscheidende Rolle spielen. Dagegen konnte ein Temperatur-spezifischer Einfluss der 3' UTR41 ausgeschlossen werden. Weiterhin wurden für die transgenen Konstrukte auch zwei Promotorversionen verwendet.

Die Hypermethylierung von Promotorregionen, verursacht durch die Integration mehrerer Kopien des Transgens in das pflanzliche Genom können zu dessen Inaktivierung führen (Baulcombe D. 2004, Matzke M. et al. 2004). Ein Prozess der allgemein als 'Transcriptional Gene Silencing (TGS) bezeichnet wird (Marenkova T. V. und Deineko E. V. 2010). Jedoch konnte gezeigt werden, dass die Kopienzahl des jeweiligen pat-Gens nicht mit der Reduktion des Pat steady state Levels unter Hitze korreliert und somit über einen Mechanismus, der sich vom TGS unterscheidet, reguliert werden muss. Unterstützt wird das durch die Tatsache, dass auch die Hitze-induzierte Inaktivierung des luc- und nptll-Gens in transgenen Tabakpflanzen nicht durch die Hypermethylierung des genutzten Promotors oder der spezifischen Kopienzahl verursacht wurde (Neumann K. et al. 1997). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Hitze-induzierte Reduktion des transgenen Proteins unabhängig von den beiden genutzten Promotorversionen ist (CaMV₈₃₂ vs. CaMV₅₃₄), weil der spezifische Transkript-Gehalt in den Hitze-sensitiven Linien nicht mit dem Transgen-kodierten Protein steady state Level korreliert und beide genutzten Promotoren sich in ihren Aktivitäten und der Expression des Genproduktes bei 24°C nicht signifikant unterscheiden (Odell J. T. et al. 1985, Knöchel N. et al. 2011).

Das zweite regulatorische Element, dass für die spezifische Reaktion unter Hitze verantwortlich sein könnte, ist der 5' UTR41. Verglichen mit den 5' UTR Protein-kodierender Gene aus Tomate, Sojabohne, Pappeln, Reis, Mais und Arabidopsis, deren Längen im Durchschnitt zwischen 82 bp und 260 bp variieren (Alexandrov N. N. et al. 2006, Jia J. P. et al. 2006, Umezawa T. et al. 2008, Ralph S. G. et al. 2008, Aoki K. et al. 2010), ist der 5' UTR41 mit 28 bp verhältnismäßig kurz. Kozak (1991a) hat gezeigt, dass ein extrem kurzer 5' UTR (< 20 nt) den 43S Präinitiationskomplex bzw. die Erkennung des Startcodons der Transkription (AUG) inhibieren kann, wohingegen ein relativ langer 5' UTR (40-100 nt) förderlich ist (Kozak M. 1994, Gayen A. K. und Peffley D. M. 1995). Es erscheint dennoch unwahrscheinlich, dass die Länge der 5' UTR41 für die Reduzierung des transgenen Protein steady state Levels verantwortlich ist, weil dies zum einem nur in den Hitze-behandelten Klonen auftrat und somit eindeutig Temperatur induziert ist und weiterhin in transgenen Tabakpflanzen, in denen der nur 3 bp längere 5' UTRS enthalten ist, keine spezifische Reaktion auftrat (*pat*OCA vs. *pat*44).

Bedeutende Kontrollelemente innerhalb der Translationskontrolle aufgrund abiotischer Einflüsse sind charakteristische Sequenzelemente im 5' UTR, einschließlich 'upstream open reading frames' (uORF), 'upstream' Startcodons (uAUG), 'internal ribosome entry site'

(interne ribosomale Eintrittstelle, IRES), sich wiederholenden CATT Sequenzen ('CATT repeat element') und spezifische Sequenzen in der *hsp*70-mRNA (Floris M. et al. 2009). Jedoch ist keines dieser Kontrollelemente in dem 5' UTR41 enthalten.

Die Sequenz der 5' UTR41 bildet eine spezifische RNA-Sekundärstruktur aus (Anhang Kap. F6.1). Klaff et al. (1997) haben gezeigt, dass die Interaktion von spezifischen RNA-Bindeproteinen (RBP) mit der 5' UTR der chloroplastidären *psb*A-mRNA aus Spinat deren Expression beeinflusst. Dabei ist die Bindung der Proteine an den 5' UTR abhängig von dessen Sekundärstruktur und der Temperatur. Gleiches konnten Shen et al. (2001) in Arabidopsis beobachten. Jedoch ist die RNA-Sekundärstruktur des 5' UTRS (Anhang Kap. F6.2), der keine Reaktion unter Hitze hervorruft, nicht wesentlich von der der 5' UTR41 zu unterscheiden. Weiterhin sind auch die RNA-Sekundärstrukturen des 5' UTR41 bei 24°C und 37°C nicht voneinander zu unterscheiden. Bei der Betrachtung von RNA-Sekundärstrukturen muss auch beachtet werden, dass es sich dabei um *in silico* Vorhersagen handelt und diese von der biologisch aktiven Sekundärstruktur abweichen können. Zudem kann auch die Sekundärstruktur durch die angrenzenden Sequenzen 'upstream' und 'downstream' beeinflusst werden, so dass deren Beteiligung nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden kann.

Möglicherweise ist ein RNA-Bindeprotein, dass an den 5' UTR41 der mRNA bindet und daraufhin dessen Translation negativ beeinflusst, Temperatur induziert. Pflanzliche RBP'e sind multifunktionale, zelluläre regulatorische Proteine (Fedoroff N. V. 2002) und obwohl im Arabidopsis Genom mehr als 200 putative Gene für RBP'e gefunden werden konnten, gibt es bisher nur wenige Studien über deren Funktion in Pflanzen (Lorkovic Z. J. und Barta A. 2002). Das am besten untersuchte Beispiel ist die Licht abhängige, posttranskriptionale Regulation der chloroplastidären psbA-mRNA (Jensen K. H. et al. 1986, Rochaix J. D. et al. 1989, Danon A. und Mayfield S. P. Y. 1991). Initiiert wird die Regulation über die Bindung eines Komplexes aus vier RNA-Bindeproteinen an der 5' UTR (Jensen K. H. et al. 1986, Rochaix J. D. et al. 1989, Danon A. und Mayfield S. P. Y. 1991). Weiterhin werden pflanzlichen RBP'e, basierend auf Expressionsanalysen, auch eine wichtige biologische Rolle innerhalb der Antwort auf weitere biotische und abiotische Einflüsse, einschließlich Temperatur, Trockenheit und viraler Infektionen, zugeschrieben (Stephen J. R. et al. 2003, Kwak K. J. et al. 2005, Raab S. et al. 2006, Palusa S. G. et al. 2007). Um zu untersuchen, ob es zu einer Temperatur induzierten Bindung eines RBP an den 5' UTR kommt, wurden in dieser Arbeit Bindungsstudien mit der Sequenz der 5' UTR41 durchgeführt. Es konnte jedoch weder bei 24°C noch bei 37°C eine spezifische Protein Interaktion mit dem 5´ UTR41 gezeigt werden. Hauptsächlich können hierfür zwei Gründe genannt werden. Erstens war die in den Studien genutzte 5' UTR41 Sequenz ein DNA-Amplifikat und somit die Base Thymidin anstatt Uracil eingebaut. Die in silico Vorhersagen lassen aber keinen Unterschied zwischen

der DNA- und RNA-Sekundärstruktur, weder bei 24°C noch bei 37°C erkennen (Anhang Kap. F6.1). Zweitens ist für eine RNA-Protein Interaktion das Protein im nativen Zustand essentiell. Dafür ist es wichtig schon während der Isolation eine für das Protein stabile Umgebung zu schaffen. Für unbekannte Proteine ist dieses jedoch relativ schwierig abzuschätzen, so dass für die ersten Untersuchungen das Isolationsprotokoll von Kegler (Kegler C. 2001), der die Bindung von TGA-Transkriptionsfaktoren an das '*as-1* Element' in Tabak untersucht hat, als Basis genommen wurde. Möglicherweise waren diese Bedingungen nicht optimal, um das speziell gesuchte Protein im nativen Zustand zu isolieren. Weiterhin könnte man annehmen, dass für eine spezifische Reaktion unter Hitze sowohl der 5' UTR41 als auch der 3' *nos* vorhanden sein müssen, so dass der 5' UTR41 allein möglicherweise nicht in der Lage ist eine stabile spezifische RNA-Protein Interaktion einzugehen.

Köhne et al. (1998) zeigten, dass die Hitze-induzierte Reduktion des Pat steady state Levels reversibel ist. Nach der Hitze-Behandlung führte die Kultivierung dieser Pflanzen bei 24°C wieder zu einer signifikanten Zunahme des Pat-Proteins und somit auch der spezifischen Enzymaktivität. Liu et al. (2005) und Sen und Blau (2005) haben gezeigt, dass mRNAs durch kleine, regulatorische RNAs - miRNAs - in cytoplasmatischen Aggregaten - Processing bodies (P-bodies) - zurückgehalten werden können und dadurch u. a. in ihrer Translation inhibiert sind. Als Reaktion auf Umweltreize können diese auch wieder die P-bodies verlassen und werden daraufhin weiter normal translatiert (Brengues M. et al. 2005, Kulkarni M. et al. 2010). miRNAs sind kleine endogene, nicht kodierende RNAs die in pflanzlichen und tierischen Organismen vorkommen (Wahid F. et al. 2010) und bedeutende Regulatoren der Expression von Endo- und Transgenen innerhalb abiotischer Stressantworten sind (Sunkar R. et al. 2007, Floris M. et al. 2009). Sie binden an komplementäre Regionen miRNA-responsive elements (MREs) - einer mRNA und regulieren so deren Expression. Bisher konnten MREs in der kodierenden Region (Rhoades M. W. et al. 2002, Bartel D. P. 2004), in der 3´ UTR (Rhoades M. W. et al. 2002, Sunkar R. und Zhu J. K. 2004) und in der 5' UTR (Allen E. et al. 2005, Fujii H. et al. 2005, Lu S. F. et al. 2005, Chiou T. J. et al. 2006, Sunkar R. et al. 2007) pflanzlicher Gene beschrieben werden. Pflanzliche miRNAs vermitteln hauptsächlich die Degradation einer Ziel-mRNA, können aber auch dessen Translation reprimieren (Jones-Rhoades M. W. et al. 2006, Voinnet O. 2009). So sind in der Literatur zwei Beispiele beschrieben, in denen die Translation einer pflanzlichen mRNA durch miRNAs inhibiert wird (Aukerman M. J. und Sakai, H. 2003 Chen X. M. 2004) auch wenn der Mechanismus noch immer nicht vollständig verstanden ist. Bisher ist nicht auszuschließen, dass die Bindung einer Hitze-induzierten miRNA an die 5' UTR41 die patS-mRNA zurückhält und somit deren Translation für die Dauer des Temperaturstresses verhindert.

Das dritte regulatorische Element, dass für die spezifische Reaktion unter Hitze verantwortlich sein könnte, ist das 3' Terminationssignal des Nopalinsynthasegens aus *A. tumefaciens.* Es gibt eine Reihe von Arbeiten in denen ein Einfluss der 3' regulatorischen Region auf die Repression der Translation in tierischen Systemen beschrieben wird (Gavis E. R. und Lehmann R. 1994, Kimha J. et al. 1995, Huang Y. S. et al. 2006, Padmanabhan K. und Richter J. D. 2006). Dagegen ist nur sehr wenig in Pflanzen bekannt. Gandikota et al. (2007) beschreiben die Inhibierung der Translation des SBP Box Gens *SPL*3 aus Arabidopsis durch die Bindung einer spezifischem miRNA in der 3' regulatorischen Region der mRNA. Zudem konnten auch in verschiedenen Pflanzenspezies MREs in den 3' regulatorischen Regionen von Genen *in situ* beschrieben werden (Rhoades M. W. et al. 2002, Sunkar R. und Zhu J. K. 2004, Gandikota M. et al. 2007). Möglicherweise könnte die Reduktion des Pat steady state Levels ebenfalls über die Interaktion von miRNAs mit dem 3' *nos* erfolgen.

D4 Welche Konsequenzen hat ein Hitze-induzierter Verlust Transgenkodierter Genprodukte für den Einsatz gentechnisch veränderter Pflanzen in der Landwirtschaft und Grundlagenforschung?

Die Aktivität Transgen-kodierter Genprodukte wurde in Tabakpflanzen durch eine Kultivierung bei erhöhten Temperaturen stark beeinträchtig und führte in einigen der untersuchten Pflanzen sogar zu deren Verlust. Diese Hitze-induzierte Transgeninaktivierung trat nicht nur in steril kultivierten Pflanzen auf, sondern auch bei in Erde kultivierten Pflanzen. Weiterhin konnten ähnliche Effekte in S. tuberosum und A. thaliana beobachtet werden. Obwohl in dieser Arbeit der moderate Hitzestress über eine Dauer von 10 Tagen durchgeführt wurde, konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass schon eine zwei bis drei stündige Inkubation bei 37°C ausreichend ist, um erste Beeinträchtigungen des Transgen-kodierten Genprodukts beobachten zu können (Neumann K. 1997) und es somit auch bei transgenen Pflanzen im Freiland selbst bei nur kurzzeitig erhöhten Temperaturen ebenfalls zu einer solchen Transgeninaktivierung kommen könnte. Hinzu kommt die Problematik der globalen Erwärmung im Zuge des Klimawandels. Denn Vorhersagen nach, steigt die globale Temperatur je nach Region im Durchschnitt um 2 ± 0,6°C (IPCC 2007). Bisher wurden einige Fälle beschrieben, bei denen es zu einer Inaktivierung von Fremdgenen aufgrund abiotischer Faktoren im Freiland kam. Erstmals beschrieben Meyer et al. (1992) die Inaktivierung des A1-Gens in Petunien aufgrund hoher Lichtintensität und Temperatur. Erst kürzlich konnten Mikschofsky et al. (2011) in einer transgenen S. tuberosum Linie eine signifikante Abnahme im Gehalt des Transgen-kodierten Proteins (VP60) bei hoher Temperatur beobachten.

Die Folgen einer Hitze-induzierten Transgeninaktivierung bei einem Einsatz gentechnisch veränderter Pflanzen (GVP) in der Landwirtschaft sind offensichtlich. Die Applikation eines Herbizids während einer Hitze-induzierten sensitiven Periode würde auch schwere Schäden an den Nutzpflanzen hinterlassen. Zudem könnte sich ein temperaturbedingter Ausfall von Schädlingsresistenzen oder anderen Transgen-vermittelten Eigenschaften ungünstig auf den Ertrag auswirken. Weiterhin ist die Stabilität bzw. Beständigkeit der transgen vermittelten Eigenschaft eine essentielle Voraussetzung für die Zulassung von GVPs. Um solche Probleme zu vermeiden, sollte bei der Erstellung eines Transgens darauf geachtet werden, die in dieser Arbeit identifizierten Sequenzelemente nicht zu verwenden. Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass diese unter den Standard-Kultivierungsbedingungen die Expression eines Transgens positiv beeinflussen können (Knöchel N. et al. 2011). In diesen Zusammenhang scheinen ein Ausschalten des Integrationsorteffekts und die Stabilisierung der Expression während erhöhter Kultivierungstemperaturen als sinnvoll. Obwohl es einige viel versprechende Ansätze gibt, ist dies bisher noch nicht vollständig gelungen. So gibt es Arbeiten die zeigen, dass Kernmatrix bindende Sequenzen (matrix attachment region, MAR) ein in das Genom integrierte Transgen von Einflüssen des umgebenden Chromatins schützen und dessen Expression stabilisieren (Mlynarova L. et al. 1995, Porsch P. et al. 1998, Ulker B. et al. 1999, Brouwer C. et al. 2002, Butaye K. M. J. et al. 2004, Oh S. J. et al. 2005, Zhang J. D. et al. 2009). Weiterhin gibt es Studien, in denen über Sequenz-spezifische Rekombinationssysteme oder Zinkfinger Nukleasen versucht wird, das Zielgen in eine definierte Position im Genom zu integrieren (Gidoni D. et al. 2008, Weinthal D. et al. 2010). Interessant ist die in dieser Arbeit beschriebene Hitze-induzierte Transgeninaktivierung auch im Rahmen der Grundlagenforschung mit Hilfe transgener Pflanzen. Über eine Reaktion der Transgenaktivität in Pflanzen auf veränderte Umweltbedingungen ist bislang noch sehr wenig bekannt. Zudem ist die Regulation von Endogenen im Rahmen der Hitzeschock-Antwort ausgiebig untersucht aber welche molekularen Mechanismen regulieren die Anpassung der Pflanze an die erhöhten Temperaturen? Weiterhin ist es interessant zu untersuchen, welche Mechanismen bzw. Regulatoren zu der Unterscheidung zwischen den Hitze-stabilen und - sensitiven Transkripten verantwortlich sind.

E Literaturverzeichnis

Abell L. M. und Villafranca J. J. (1991) Investigation of the Mechanism of Phosphinothricin Inactivation of Escherichia-Coli Glutamine-Synthetase Using Rapid Quench Kinetic Techniques. Biochemistry 30:6135-6141.

Alexandrov N. N., Troukhan M. E., Brover V. V., Tatarinova T., Flavell R. B. und Feldmann K. A. (2006) Features of Arabidopsis genes and genome discovered using full-length cDNAs. Plant Molecular Biology 60:69-85.

Ali S. und Taylor W. C. (2001) Quantitative regulation of the Flaveria Me1 gene is controlled by the 3 '-untranslated region and sequences near the amino terminus. Plant Molecular Biology 46:251-261.

Allen E., Xie Z. X., Gustafson A. M. und Carrington J. C. (2005) microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. Cell 121:207-221.

Andre D., Colau D., Schell J., Vanmontagu M. und Hernalsteens J. P. (1986) Gene Tagging in Plants by A T-Dna Insertion Mutagen That Generates Aph(3')li-Plant Gene Fusions. Molecular & General Genetics 204:512-518.

Antoniou M., Deboer E., Habets G. und Grosveld F. (1988) The Human Beta-Globin Gene Contains Multiple Regulatory Regions - Identification of One Promoter and 2 Downstream Enhancers. Embo Journal 7:377-384.

Aoki K., Yano K., Suzuki A., Kawamura S., Sakurai N., Suda K., Kurabayashi A., Suzuki T., Tsugane T., Watanabe M., Ooga K., Torii M., Narita T., Shin-I T., Kohara Y., Yamamoto N., Takahashi H., Watanabe Y., Egusa M., Kodama M., Ichinose Y., Kikuchi M., Fukushima S., Okabe A., Arie T., Sato Y., Yazawa K., Satoh S., Omura T., Ezura H. und Shibata D. (2010) Large-scale analysis of full-length cDNAs from the tomato (Solanum lycopersicum) cultivar Micro-Tom, a reference system for the Solanaceae genomics. Bmc Genomics 11.

Aukerman M. J. und Sakai H. (2003) Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-like target genes. Plant Cell 15:2730-2741.

Banerjee A. K., Lin T. und Hannapel D. J. (2009) Untranslated Regions of a Mobile Transcript Mediate RNA Metabolism. Plant Physiology 151:1831-1843.

Bartel D. P. (2004) MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 116:281-297.

Baulcombe D. (2004) RNA silencing in plants. Nature 431:356-363.

Baulcombe D. C., Saunders G. R., Bevan M. W., Mayo M. A. und Harrison B. D. (1986) Expression of Biologically-Active Viral Satellite Rna from the Nuclear Genome of Transformed Plants. Nature 321:446-449.

Bevan M. (1984) Binary Agrobacterium Vectors for Plant Transformation. Nucleic Acids Research 12:8711-8721.

Bevan M., Barnes W. M. und Chilton M. D. (1983) Structure and Transcription of the Nopaline Synthase Gene Region of T-Dna. Nucleic Acids Research 11:369-385.

Bradford M. M. (1976) Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. Analytical Biochemistry 72:248-254.

Brengues M., Teixeira D. und Parker R. (2005) Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. Science 310:486-489.

Bresinsky A., Körner C., Kadereit J. W., Neuhaus G. und Sonnewald U. (2008) Strasburger-Lehrbuch der Botanik. 36. Auflage. Spektrum Verlag Deutschland, Heidelberg.

Broer, I. (1989) Expression des Phosphinothricin-*N*-Acetyltransferase-Gens aus *Streptomyces viridochromogenes* in *Nicotiana tabacum*. Dissertation Universität Bielefeld.

Brouwer C., Bruce W., Maddock S., Avramova Z. und Bowen B. (2002) Suppression of transgene silencing by matrix attachment regions in maize: A dual role for the maize 5 ' ADH1 matrix attachment region. Plant Cell 14:2251-2264.

Browning K. S. (1996) The plant translational apparatus. Plant Molecular Biology 32:107-144.

Busch U., Block A. und Meissner E. (2010) Genetically modified food. Chemie in Unserer Zeit 44:108-117.

Butaye K. M. J., Goderis I. J. W. M., Wouters P. F. J., Pues J. M. T. G., Delaure S. L., Broekaert W. F., Depicker A., Cammue B. P. A. und De Bolle M. F. C. (2004) Stable highlevel transgene expression in Arabidopsis thaliana using gene silencing mutants and matrix attachment regions. Plant Journal 39:440-449.

Campell N. A. und Reece J. B. (2009) Biologie. 8., aktualisierte Auflage. Pearson Education Deutschland GmbH, München

Charon C., Moreno A. B., Bardou F. und Crespi M. (2010) Non-Protein-Coding RNAs and their Interacting RNA-Binding Proteins in the Plant Cell Nucleus. Molecular Plant 3:729-739.

Chen X. M. (2009) Small RNAs and Their Roles in Plant Development. Annual Review of Cell and Developmental Biology 25:21-44.

Chen X. M. (2004) A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development. Science 303:2022-2025.

Chiou T. J., Aung K., Lin S. I., Wu C. C., Chiang S. F. und Su C. L. (2006) Regulation of phosphate homeostasis by microRNA in Arabidopsis. Plant Cell 18:412-421.

Christou P. (1992) Genetic-Transformation of Crop Plants Using Microprojectile Bombardment. Plant Journal 2:275-281.

Clough S. J. und Bent A. F. (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacteriummediated transformation of Arabidopsis thaliana. Plant Journal 16:735-743.

Coetzer E., Al-Khatib K. und Loughin T. M. (2001) Glufosinate efficacy, absorption, and translocation in amaranth as affected by relative humidity and temperature. Weed Science 49:8-13.

Conner A. J., Mlynarova L., Stiekema W. J. und Nap J. P. (1998) Meiotic stability of transgene expression is unaffected by flanking matrix-associated regions. Molecular Breeding 4:47-58.

Cowling V. H. (2010) Regulation of mRNA cap methylation. Biochemical Journal 425:295-302.

Danon A. und Mayfield S. P. Y. (1991) Light Regulated Translational Activators -Identification of Chloroplast Gene Specific Messenger-Rna Binding-Proteins. Embo Journal 10:3993-4001.

Datla R. S. S., Hammerlindl J. K., Panchuk B., Pelcher L. E. und Keller W. (1992) Modified Binary Plant Transformation Vectors with the Wild-Type Gene Encoding Nptii. Gene 122:383-384.

De Buck S., Van Montagu M. und Depicker A. (2001) Transgene silencing of invertedly repeated transgenes is released upon deletion of one of the transgenes involved. Plant Molecular Biology 46:433-445.

De Rocher E. J., Vargo-Gogola T. C., Diehn S. H. und Green P. J. (1998) Direct evidence for rapid degradation of Bacillus thuringiensis toxin mRNA as a cause of poor expression in plants. Plant Physiology 117:1445-1461.

Dean C., Jones J., Favreau M., Dunsmuir P. und Bedbrook J. (1988) Influence of Flanking Sequences on Variability in Expression Levels of An Introduced Gene in Transgenic Tobacco Plants. Nucleic Acids Research 16:9267-9283.

Dhaese P., Degreve H., Gielen J., Seurinck J., Vanmontagu M. und Schell J. (1983) Identification of Sequences Involved in the Polyadenylation of Higher-Plant Nuclear Transcripts Using Agrobacterium T-Dna Genes As Models. Embo Journal 2:419-426.

Dröge-Laser W., Broer I. und Pühler A. (1992) Transgenic Plants Containing the Phosphinothricin-N-Acetyltransferase Gene Metabolize the Herbicide L-Phosphinothricin (Glufosinate) Differently from Untransformed Plants. Planta 187:142-151.

Dröge-Laser W., Siemeling U., Pühler A. und Broer I. (1994) The Metabolites of the Herbicide L-Phosphinothricin (Glufosinate) - Identification, Stability, and Mobility in Transgenic, Herbicide-Resistant, and Untransformed Plants. Plant Physiology 105:159-166.

Eckes P., Vijtewaa, B. und Donn, G. (1989) Synthetic gene confers resistance to the broad spectrum herbicide L-Phosphinothricin in plants. Journal of Cellular Biochemistry-Supplement 13D: 334.

Fang R. X., Nagy F., Sivasubramaniam S. und Chua N. H. (1989) Multiple Cis Regulatory Elements for Maximal Expression of the Cauliflower Mosaic-Virus S-35 Promoter in Transgenic Plants. Plant Cell 1:141-150.

Fedoroff N. V. (2002) RNA-binding proteins in plants: the tip of an iceberg? Current Opinion in Plant Biology 5:452-459.

Feldbrugge M., Arizti P., Sullivan M. L., Zamore P. D., Belasco J. G. und Green P. J. (2002) Comparative analysis of the plant mRNA-destabilizing element, DST, in mammalian and tobacco cells. Plant Molecular Biology 49:215-223.

Finnegan J. und Mcelroy D. (1994) Transgene Inactivation - Plants Fight Back. Bio-Technology 12:883-888.

Fladung M. (1999) Gene stability in transgenic aspen (Populus). I. Flanking DNA sequences and T-DNA structure. Molecular and General Genetics 260:574-581.

Floris M., Mahgoub H., Lanet E., Robaglia C. und Menand B. (2009) Post-transcriptional Regulation of Gene Expression in Plants during Abiotic Stress. International Journal of Molecular Sciences 10:3168-3185.

Fojtova M., Van Houdt H., Depicker A. und Kovarik A. (2003) Epigenetic switch from posttranscriptional to transcriptional silencing is correlated with promoter hypermethylation. Plant Physiology 133:1240-1250.

Frisch D. A., Harrishaller L. W., Yokubaitis N. T., Thomas T. L., Hardin S. H. und Hall T.
C. (1995) Complete Sequence of the Binary Vector Bin-19. Plant Molecular Biology 27:405-409.

Fujii H., Chiou T. J., Lin S. I., Aung K. und Zhu J. K. (2005) A miRNA involved in phosphate-starvation response in Arabidopsis. Current Biology 15:2038-2043.

Furuichi Y., Lafiandra A. und Shatkin A. J. (1977) 5'-Terminal Structure and Messenger-Rna Stability. Nature 266:235-239.

Gandikota M., Birkenbihl R. P., Hohmann S., Cardon G. H., Saedler H. und Huijser P. (2007) The miRNA156/157 recognition element in the 3' UTR of the Arabidopsis SBP box gene SPL3 prevents early flowering by translational inhibition in seedlings. Plant Journal 49:683-693.

Gaspar T., Kevers C., Penel C., Greppin H., Reid D. M. und Thorpe T. A. (1996) Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant 32:272-289.

Gavis E. R. und Lehmann R. (1994) Translational Regulation of Nanos by Rna Localization. Nature 369:315-318.

Gayen A. K. und Peffley D. M. (1995) The Length of 5'-Untranslated Leader Sequences Influences Distribution of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme-A Reductase Messenger-Rna in Polysomes - Effects of Lovastatin, Oxysterols, and Mevalonate. Archives of Biochemistry and Biophysics 322:475-485.

Gendloff E. H., Bowen B. und Buchholz W. G. (1990) Quantitation of Chloramphenicol Acetyl Transferase in Transgenic Tobacco Plants by Elisa and Correlation with Gene Copy Number. Plant Molecular Biology 14:575-583.

Gidoni D., Srivastava V. und Carmi N. (2008) Site-specific excisional recombination strategies for elimination of undesirable transgenes from crop plants. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant 44:457-467.

Guerch P., Jouanin L., Tepfer D. und Pelletier G. (1987) Genetic-Transformation of Oilseed Rape (Brassica-Napus) by the Ri T-Dna of Agrobacterium-Rhizogenes and Analysis of Inheritance of the Transformed Phenotype. Molecular & General Genetics 206:382-386.

Hausmann L. und Töpfer R (1999) Entwicklung von Plasmid-Vektoren. In: Brauer D., Roebbelen G., Töpfer R. (Hrsg.) BioEngineering für Rapssorten nach Maß, Vorträge für Pflanzenzüchtung 45: 153-171.

Hayes J. J. und Wolffe A. P. (1992) The Interaction of Transcription Factors with Nucleosomal Dna. Bioessays 14:597-603.

Hirayama T. und Shinozaki K. (2010) Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. Plant Journal 61:1041-1052.

Hobbs S. L. A., Kpodar P. und Delong C. M. O. (1990) The Effect of T-Dna Copy Number, Position and Methylation on Reporter Gene-Expression in Tobacco Transformants. Plant Molecular Biology 15:851-864.

Hoekema A., Hirsch P. R., Hooykaas P. J. J. und Schilperoort R. A. (1983) A Binary Plant Vector Strategy Based on Separation of Vir-Region and T-Region of the Agrobacterium-Tumefaciens Ti-Plasmid. Nature 303:179-180.

Horsch R. B., Fry J. E., Hoffmann N. L., Eichholtz D., Rogers S. G. und Fraley R. T. (1985) A Simple and General-Method for Transferring Genes Into Plants. Science 227:1229-1231.

Huang Y. S., Kan M. C., Lin C. L. und Richter J. D. (2006) CPEB3 and CPEB4 in neurons: analysis of RNA-binding specificity and translational control of AMPA receptor GluR2 mRNA. Embo Journal 25:4865-4876.

Huettel B., Kanno T., Daxinger L., Bucher E., van der Winden J., Matzke A. J. M. und Matzke M. (2007) RNA-directed DNA methylation mediated by DRD1 and Pol IVb: A versatile pathway for transcriptional gene silencing in plants. Biochimica et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression 1769:358-374.

Hühns M., Neumann K., Hausmann T., Ziegler K., Klemke F., Kahmann U., Staiger D., Lockau W., Pistorius E. K. und Broer I. (2008) Plastid targeting strategies for cyanophycin synthetase to achieve high-level polymer accumulation in Nicotiana tabacum. Plant Biotechnology Journal 6:321-336.

Hunt A. G. (2008) Messenger RNA 3 ' End Formation in Plants. Nuclear Pre-Mrna Processing in Plants 326:151-177.

Hirayama T. und shinozaki K. (2010) Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. Plant Journal 61:1041-1052

Iglesias V. A., Moscone E. A., Papp I., Neuhuber F., Michalowski S., Phelan T., Spiker S., Matzke M. und Matzke A. J. M. (1997) Molecular and cytogenetic analyses of stably and unstably expressed transgene loci in tobacco. Plant Cell 9:1251-1264.

IPCC (2007) Zusammenfassung für politische Entscheidungsträger. In: Klimaänderung 2007: Wissenschaftliche Grundlagen. Beitrag der Arbeitsgruppe I zum Vierten Sachstandsbericht des Zwischenstaatlichen Ausschusses für Klimaänderung (IPCC)

Jensen K. H., Herrin D. L., Plumley F. G. und Schmidt G. W. (1986) Biogenesis of Photosystem-li Complexes - Transcriptional, Translational, and Posttranslational Regulation. Journal of Cell Biology 103:1315-1325.

Jia J. P., Fu J. J., Zheng J., Zhou X., Huai J. L., Wang J. H., Wang M., Zhang Y., Chen X. P., Zhang J. P., Zhao J. F., Su Z., Lv Y. P. und Wang G. Y. (2006) Annotation and expression profile analysis of 2073 full-length cDNAs from stress-induced maize (Zea mays L.) seedlings. Plant Journal 48:710-727.

Jones J. D. G., Dunsmuir P. und Bedbrook J. (1985) High-Level Expression of Introduced Chimaeric Genes in Regenerated Transformed Plants. Embo Journal 4:2411-2418.

Jones J. D. G., Gilbert D. E., Grady K. L. und Jorgensen R. A. (1987) T-Dna Structure and Gene-Expression in Petunia Plants Transformed by Agrobacterium-Tumefaciens C58 Derivatives. Molecular & General Genetics 207:478-485.

Jones-Rhoades M. W., Bartel D. P. und Bartel B. (2006) MicroRNAs and their regulatory roles in plants. Annual Review of Plant Biology 57:19-53.

Jorgensen R., Snyder C. und Jones J. D. G. (1987) T-Dna Is Organized Predominantly in Inverted Repeat Structures in Plants Transformed with Agrobacterium-Tumefaciens C58 Derivatives. Molecular & General Genetics 207:471-477. Jorgensen R. A., Cluster P. D., English J., Que Q. D. und Napoli C. A. (1996) Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: Comparison of sense vs antisense constructs and single-copy vs complex T-DNA sequences. Plant Molecular Biology 31:957-973.

Karp A. und Shield I. (2008) Bioenergy from plants and the sustainable yield challenge. New Phytologist 179:15-32.

Kawaguchi R. und Bailey-Serres J. (2002) Regulation of translational initiation in plants. Current Opinion in Plant Biology 5:460-465.

Kegler C. (2001) Analyse des Transkriptionsfaktors TGA2.1 aus *Nicotiana tabacum*. Dissertation Universität Göttingen

Kelly S. M. und Corbett A. H. (2009) Messenger RNA Export from the Nucleus: A Series of Molecular Wardrobe Changes. Traffic 10:1199-1208.

Kerbach S. (1999) Hitzeinduzierte Transgeninaktivierung Sequenzen und Signale. Diplomarbeit Universität Rostock

Khanuja S. P. S., Shasany A. K., Darokar M. P. und Kumar S. (1999) Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. Plant Molecular Biology Reporter 17:74.

Kimha J., Kerr K. und Macdonald P. M. (1995) Translational Regulation of Oskar Messenger-Rna by Bruno, An Ovarian Rna-Binding Protein, Is Essential. Cell 81:403-412.

Klaff P., Mundt S. M. und Steger G. (1997) Complex formation of the spinach chloroplast psbA mRNA 5 ' untranslated region with proteins is dependent on the RNA structure. Rna-A Publication of the Rna Society 3:1468-1479.

Klug W. S., Cummings M. R. und Spencer C. A. (2007) Genetik. 8., aktualisierte Auflage. Pearson Education Deutschland GmbH, München

Knöchel N., Latzkow T., Walter S., Kerbach S., Broer I. und Huckauf, J. (2011) Influence of UTR and terminator sequences on the expression of the herbicide resistance gene *pat* in *Nicotiana tabacum*. (in preparation)

Kohli A., Twyman R. M., Abranches R., Wegel E., Stoger E. und Christou P. (2003) Transgene integration, organization and interaction in plants. Plant Molecular Biology 52:247-258.
Köhne S., Neumann K., Pühler A. und Broer I. (1998) The heat-treatment induced reduction of the pat gene encoded herbicide resistance in Nicotiana tabacum is influenced by the transgene sequence. Journal of Plant Physiology 153:631-642.

Koncz C., Nemeth K., Redei G. P., und Schell J. (1992) T-Dna Insertional Mutagenesis in Arabidopsis. Plant Molecular Biology 20:963-976.

Koncz C. und Schell J. (1986) The Promoter of TI-Dna Gene 5 Controls the Tissue-Specific Expression of Chimeric Genes Carried by A Novel Type of Agrobacterium Binary Vector. Molecular & General Genetics 204:383-396.

Kooter J. M., Matzke M. A. und Meyer P. (1999) Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control. Trends in Plant Science 4:340-347.

Kozak M. (1986) Point Mutations Define A Sequence Flanking the Aug Initiator Codon That Modulates Translation by Eukaryotic Ribosomes. Cell 44:283-292.

Kozak M. (1989a) Circumstances and Mechanisms of Inhibition of Translation by Secondary Structure in Eukaryotic Messenger-Rnas. Molecular and Cellular Biology 9:5134-5142.

Kozak M. (1989b) The Scanning Model for Translation - An Update. Journal of Cell Biology 108:229-241.

Kozak M. (1991b) Effects of Long 5' Leader Sequences on Initiation by Eukaryotic Ribosomes Invitro. Gene Expression 1:117-125.

Kozak M. (1991a) A Short Leader Sequence Impairs the Fidelity of Initiation by Eukaryotic Ribosomes. Gene Expression 1:111-115.

Kozak M. (1994) Determinants of Translational Fidelity and Efficiency in Vertebrate Messenger-Rnas. Biochimie 76:815-821.

Ku M. S. B., Agarie S., Nomura M., Fukayama H., Tsuchida H., Ono K., Hirose S., Toki S., Miyao M. und Matsuoka M. (1999) High-level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants. Nature Biotechnology 17:76-80.

Kulkarni M., Ozgur S. und Stoecklin G. (2010) On track with P-bodies. Biochemical Society Transactions 38:242-251.

Kumar S. und Fladung M. (2001) Gene stability in transgenic aspen (Populus). II. Molecular characterization of variable expression of transgene in wild and hybrid aspen. Planta 213:731-740.

Kwak K. J., Kim Y. O. und Kang H. S. (2005) Characterization of transgenic Arabidopsis plants overexpressing GR-RBP4 under high salinity, dehydration, or cold stress. Journal of Experimental Botany 56:3007-3016.

Laemmli U. K. (1970) Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4. Nature 227:680-&.

Lam E. und Lam Y. K. P. (1995) Binding-Site Requirements and Differential Representation of Tga Factors in Nuclear Asf-1 Activity. Nucleic Acids Research 23:3778-3785.

Larkin P. J. und Scowcroft W. R. (1981) Somaclonal Variation - A Novel Source of Variability from Cell-Cultures for Plant Improvement. Theoretical and Applied Genetics 60:197-214.

Latzkow T., Knöchel N., Broer I. und Huckauf J. (2011) Influence of the transgene sequence on the heat induced inactivation of the herbicide resistance gene *pat* in transgenic tobacco plants. (in preparation)

Lau O. S. und Sun S. S. M. (2009) Plant seeds as bioreactors for recombinant protein production. Biotechnology Advances 27:1015-1022.

Lee J. H., Wang F. und Schnell D. J. (2009) Toc Receptor Dimerization Participates in the Initiation of Membrane Translocation during Protein Import into Chloroplasts. Journal of Biological Chemistry 284:31130-31141.

Linn F., Heidmann I., Saedler H. und Meyer P. (1990) Epigenetic Changes in the Expression of the Maize A1 Gene in Petunia-Hybrida - Role of Numbers of Integrated Gene Copies and State of Methylation. Molecular & General Genetics 222:329-336.

Linsemaier E. M. und Skoog F. (1965) Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Cultures. Physiologia Plantarum 18:100-&.

Liu J. D., Valencia-Sanchez M. A., Hannon G. J. und Parker R. (2005) MicroRNAdependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. Nature Cell Biology 7:719-U118.

Livak K. J. und Schmittgen T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2-\Delta\Delta$ CT method. Methods **25**:402-408.

Logemann J., Schell J. und Willmitzer L. (1987) Improved Method for the Isolation of Rna from Plant-Tissues. Analytical Biochemistry 163:16-20.

Logusch E. W., Walker D. M., Mcdonald J. F. und Franz J. E. (1991) Inhibition of Plant Glutamine Synthetases by Substituted Phosphinothricins. Plant Physiology 95:1057-1062.

Lorkovic Z. J. und Barta A. (2002) Genome analysis: RNA recognition motif (RRM) and K homology (KH) domain RNA-binding proteins from the flowering plant Arabidopsis thaliana. Nucleic Acids Research 30:623-635.

Lu S. F., Sun Y. H., Shi R., Clark C., Li L. G. und Chiang V. L. (2005) Novel and mechanical stress-responsive microRNAs in Populus trichocarpa that are absent from Arabidopsis. Plant Cell 17:2186-2203.

Ludwig-Muller J., Krishna P. und Forreiter C. (2000) A glucosinolate mutant of Arabidopsis is thermosensitive and defective in cytosolic Hsp90 expression after heat stress. Plant Physiology 123:949-958.

Maliga O. P., Breznowitz A. und Marton L. (1973) Streptomycin resistant plants from callus cultures of tobacco. Nature New Biol. 244:29-30

Marenkova T. V. und Deineko E. V. (2010) Transcriptional Gene Silencing in Plants. Russian Journal of Genetics 46:511-520.

Marton L., Hrouda M., Pecsvaradi A. und Czako M. (1994) T-Dna-Insert-Independent Mutations Induced in Transformed Plant-Cells During Agrobacterium Cocultivation. Transgenic Research 3:317-325.

Matsubayashi Y. (2011) Post-Translational Modifications in Secreted Peptide Hormones in Plants. Plant and Cell Physiology 52:5-13.

Matzke M., Aufsatz W., Kanno T., Daxinger L., Papp I., Mette A. F. und Matzke A. J. M. (2004) Genetic analysis of RNA-mediated transcriptional gene silencing. Biochimica et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression 1677:129-141.

Mazumder B., Seshadri V. und Fox P. L. (2003) Translational control by the 3 '-UTR: the ends specify the means. Trends in Biochemical Sciences 28:91-98.

Meijer H. A. und Thomas A. A. M. (2002) Control of eukaryotic protein synthesis by upstream open reading frames in the 5 '-untranslated region of an mRNA. Biochemical Journal 367:1-11.

Meyer P., Linn F., Heidmann I., Meyer H., Niedenhof I. und Saedler H. (1992) Endogenous and Environmental-Factors Influence 35S Promoter Methylation of A Maize A1 Gene Construct in Transgenic Petunia and Its Color Phenotype. Molecular & General Genetics 231:345-352.

Meza T. J., Kamfjord D., Hakelien A. M., Evans I., Godager L. H., Mandal A., Jakobsen K. S. und Aalen R. B. (2001) The frequency of silencing in Arabidopsis thaliana varies highly between progeny of siblings and can be influenced by environmental factors. Transgenic Research 10:53-67.

Mikschofsky H., Heilmann E., Schmidtke J. S. K., Meyer U., Leinweber P. und Broer I. (2011) Greenhouse and field cultivations of antigen-expressing potatoes focussing the variability in plant constituents and antigen expression. Plant Molecular Biology (in print).

Miller J. H. (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Mlynarova L., Jansen R. C., Conner A. J., Stiekema W. J. und Nap J. P. (1995) The Mar-Mediated Reduction in Position Effect Can be Uncoupled from Copy Number-Dependent Expression in Transgenic Plants. Plant Cell 7:599-609.

Mlynarova L., Loonen A., Heldens J., Jansen R. C., Keizer P., Stiekema W. J. und Nap J. P. (1994) Reduced Position Effect in Mature Transgenic Plants Conferred by the Chicken Lysozyme Matrix-Associated Region. Plant Cell 6:417-426.

Mori S., Oka E., Umehara H., Suzuki S., Kobayashi H., Hoshi Y., Kondo M., Koike Y. und Nakano M. (2007) Somaclonal variation and stability of GUS gene expression in transgenic agapanthus (Agapanthus praecox ssp orientalis) plants at the flowering stage. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant 43:79-87.

Morino K., Olsen O. A. und Shimamoto K. (1999) Silencing of an aleurone-specific gene in transgenic rice is caused by a rearranged transgene. Plant Journal 17:275-285.

Murray M. G. und Thompson W. F. (1980) Rapid Isolation of High Molecular-Weight Plant DNA. Nucleic Acids Research 8:4321-4325.

Muskens M. W. M., Vissers A. P. A., Mol J. N. M. und Kooter J. M. (2000) Role of inverted DNA repeats in transcriptional and post-transcriptional gene silencing. Plant Molecular Biology 43:243-260.

Nap J. P., Vanspanje M., Dirkse W. G., Baarda G., Mlynarova L., Loonen A., Grondhuis P. und Stiekema W. J. (1993) Activity of the Promoter of the Lhca3.St.1 Gene, Encoding the Potato Apoprotein-2 of the Light-Harvesting Complex of Photosystem-I, in Transgenic Potato and Tobacco Plants. Plant Molecular Biology 23:605-612.

Napoli C., Lemieux C. und Jorgensen R. (1990) Introduction of A Chimeric Chalcone Synthase Gene Into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in Trans. Plant Cell 2:279-289.

Neumann K. (1997) Analyse der hitzesensitiven oder hitzestabilen Aktivität von Luciferase und Neomycinphophotransferase in transgenen Tabaklinen. Dissertation Universität Bielefeld

Neumann K., Dröge-Laser W., Köhne S. und Broer I. (1997) Heat treatment results in a loss of transgene-encoded activities in several tobacco lines. Plant Physiology 115:939-947.

Neumann K., Stephan D. P., Ziegler K., Hühns M., Broer I., Lockau W. und Pistorius E.
K. (2005) Production of cyanophycin, a suitable source for the biodegradable polymer polyaspartate, in transgenic plants. Plant Biotechnology Journal 3:249-258.

Niggeweg R. (1999) Salizylsäure- und Auxin-induzierte Genexpression in *Nicotiana tabacum*: Funktionelle Bedeutung der TGA-Faktoren der Subklasse II. Dissertation Universität Bielefeld

Nikova V., Palakarcheva M., Pundeva R. und Krusteva D. (1998) Somaclonal variation in cultured in vitro tobacco plants from the hybrid Nicotiana gossey Domain. x N-tabacum L. Israel Journal of Plant Sciences 46:35-40.

Odell J. T., Nagy F. und Chua N. H. (1985) Identification of Dna-Sequences Required for Activity of the Cauliflower Mosaic Virus-35S Promoter. Nature 313:810-812.

Oh S. J., Jeong J., Kim E. H., Yi N., Yi S. I., Jang I. C., Kim Y. S., Suh S. C., Nahm B. H. und Kim J. K. (2005) Matrix attachment region from the chicken lysozyme locus reduces variability in transgene expression and confers copy number-dependence in transgenic rice plants. Plant Cell Reports 24:145-154.

Ohme-Takagi M., Taylor C. B., Newman T. C. und Green P. J. (1993) The effect of sequences with high AU content on mRNA stability in tobacco. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90:11811-11815.

Ow D. W., Wood K. V., Deluca M., Dewet J. R., Helinski D. R. und Howell S. H. (1986) Transient and Stable Expression of the Firefly Luciferase Gene in Plant-Cells and Transgenic Plants. Science 234:856-859.

Padmanabhan K. und Richter J. D. (2006) Regulated Pumilio-2 binding controls RINGO/Spy mRNA translation and CPEB activation. Genes & Development 20:199-209.

Palauqui J. C. und Vaucheret H. (1995) Field Trial Analysis of Nitrate Reductase Co-Suppression - A Comparative-Study of 38 Combinations of Transgene Loci. Plant Molecular Biology 29:149-159.

Palusa S. G., Ali G. S. und Reddy A. S. N. (2007) Alternative splicing of pre-mRNAs of Arabidopsis serine/arginine-rich proteins: regulation by hormones and stresses. Plant Journal 49:1091-1107.

Pansegrau W., Lanka E., Barth P. T., Figurski D. H., Guiney D. G., Haas D., Helinski D.
R., Schwab H., Stanisich V. A. und Thomas C. M. (1994) Complete Nucleotide-Sequence of Birmingham Incp-Alpha Plasmids - Compilation and Comparative-Analysis. Journal of Molecular Biology 239:623-663.

Park J. R., McFarlane I., Phipps R. H. und Ceddia G. (2011) The role of transgenic crops in sustainable development. Plant Biotechnology Journal 9:2-21.

Pawlowski W. P. und Somers D. A. (1998) Transgenic DNA integrated into the oat genome is frequently interspersed by host DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95:12106-12110.

Peach C. und Velten J. (1991) Transgene Expression Variability (Position Effect) of Cat and Gus Reporter Genes Driven by Linked Divergent T-Dna Promoters. Plant Molecular Biology 17:49-60.

Porsch P., Jahnke A. und During K. (1998) A plant transformation vector with a minimal T-DNA II. Irregular integration patterns of the T-DNA in the plant genome. Plant Molecular Biology 37:581-585.

Prat S., Willmitzer L. und Sanchezserrano J. J. (1989) Nuclear Proteins Binding to A Cauliflower Mosaic Virus-35S Truncated Promoter. Molecular & General Genetics 217:209-214.

Prols F. und Meyer P. (1992) The Methylation Patterns of Chromosomal Integration Regions Influence Gene Activity of Transferred Dna in Petunia-Hybrida. Plant Journal 2:465-475.

Quandt H-J. (1989) Quantifizierung der Expression eines Genhybrids, bestehend aus einem lichtregulierbaren Promotor und dem Kodierbereich des Luciferasegens aus *Photinus pyralis*, in *Nicotiana tabacum*. Diplomarbeit Universität Bielefeld

Raab S., Toth Z., de Groot C., Stamminger T. und Hoth S. (2006) ABA-responsive RNAbinding proteins are involved in chloroplast and stromule function in Arabidopsis seedlings. Planta 224:900-914.

Ralph S. G., Chun H. J. E., Cooper D., Kirkpatrick R., Kolosova N., Gunter L., Tuskan G. A., Douglas C. J., Holt R. A., Jones S. J. M., Marra M. A. und Bohlmann J. (2008) Analysis of 4,664 high-quality sequence-finished poplar full-length cDNA clones and their utility for the discovery of genes responding to insect feeding. Bmc Genomics 9.

Rhoades M. W., Reinhart B. J., Lim L. P., Burge C. B., Bartel B. und Bartel D. P. (2002) Prediction of plant microRNA targets. Cell 110:513-520.

Rochaix J. D., Kuchka M., Mayfield S., Schirmerrahire M., Girardbascou J. und Bennoun P. (1989) Nuclear and Chloroplast Mutations Affect the Synthesis Or Stability of the Chloroplast Psbc Gene-Product in Chlamydomonas-Reinhardtii. Embo Journal 8:1013-1021.

Rybicki E. P. (2010) Plant-made vaccines for humans and animals. Plant Biotechnology Journal 8:620-637.

Sambrook J., Fritsch E. F. und Maniatis T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manuell. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sanfacon H., Brodmann P. und Hohn T. (1991) A Dissection of the Cauliflower Mosaic-Virus Polyadenylation Signal. Genes & Development 5:141-149.

Scheller J. und Conrad U. (2005) Plant-based material, protein and biodegradable plastic. Current Opinion in Plant Biology 8:188-196.

Schmidhauser T. J. und Helinski D. R. (1985) Regions of Broad-Host-Range Plasmid Rk2 Involved in Replication and Stable Maintenance in 9 Species of Gram-Negative Bacteria. Journal of Bacteriology 164:446-455. **Schmidt G. W. und Delaney S. K.** (2010) Stable internal reference genes for normalization of real-time RT-PCR in tobacco (Nicotiana tabacum) during development and abiotic stress. Molecular Genetics and Genomics 283:233-241.

Schubert D., Lechtenberg B., Forsbach A., Gils M., Bahadur S. und Schmidt R. (2004) Silencing in Arabidopsis T-DNA transformants: The predominant role of a gene-specific RNA sensing mechanism versus position effects. Plant Cell 16:2561-2572.

Sen G. L. und Blau H. M. (2005) Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. Nature Cell Biology **7**:633-U28.

Shapiro B. M. und Stadtman E. R. (1970) Glutamine synthetase: *Escherichia coli*. Methods Enzymol. 17A: 910-922

Shatkin A. J. (1976) Capping of Eukaryotic Messenger-Rnas. Cell 9:645-653.

Shen Y. X., Danon A. und Christopher D. A. (2001) RNA binding-proteins interact specifically with the Arabidopsis chloroplast psbA mRNA 5 ' untranslated region in a redox-dependent manner. Plant and Cell Physiology 42:1071-1078.

Shirsat A. H., Wilford N. und Croy R. R. D. (1989) Gene Copy Number and Levels of Expression in Transgenic Plants of A Seed Specific Gene. Plant Science 61:75-80.

Simpson G. G. und Filipowicz W. (1996) Splicing of precursors to mRNA in higher plants: Mechanism, regulation and sub-nuclear organisation of the spliceosomal machinery. Plant Molecular Biology 32:1-41.

Smalle J. und Vierstra R. D. (2004) The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. Annual Review of Plant Biology 55:555-590.

Sobecky P. A., Easter C. L., Bear P. D. und Helinski D. R. (1996) Characterization of the stable maintenance properties of the par region of broad-host-range plasmid RK2. Journal of Bacteriology 178:2086-2093.

Southern E. M. (1975) Detection of Specific Sequences Among Dna Fragments Separated by Gel-Electrophoresis. Journal of Molecular Biology 98:503-&.

Stephen J. R., Dent K. C. und Finch-Savage W. E. (2003) A cDNA encoding a coldinduced glycine-rich RNA binding protein from Prunus avium expressed in embryonic axes. Gene 320:177-183. **Stockhaus J., Eckes P., Blau A., Schell J. und Willmitzer L.** (1987) Organ-Specific and Dosage-Dependent Expression of A Leaf Stem Specific Gene from Potato After Tagging and Transfer Into Potato and Tobacco Plants. Nucleic Acids Research 15:3479-3491.

Strauch E., Wohlleben W. und Pühler,A. (1988) Cloning of A Phosphinothricin N-Acetyltransferase Gene from Streptomyces-Viridochromogenes Tu494 and Its Expression in Streptomyces-Lividans and Escherichia-Coli. Gene 63:65-74.

Sunkar R., Chinnusamy V., Zhu J. H. und Zhu J. K. (2007) Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. Trends in Plant Science 12:301-309.

Sunkar R. und Zhu J. K. (2004) Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis. Plant Cell 16:2001-2019.

Tepfer D. (1984) Transformation of Several Species of Higher-Plants by Agrobacterium-Rhizogenes - Sexual Transmission of the Transformed Genotype and Phenotype. Cell 37:959-967.

Thompson C. J., Movva N. R., Tizard R., Crameri R., Davies J. E., Lauwereys M. und Botterman J. (1987) Characterization of the Herbicide-Resistance Gene Bar from Streptomyces-Hygroscopicus. Embo Journal 6:2519-2523.

Ulker B., Allen G. C., Thompson W. F., Spiker S. und Weissinger A. K. (1999) A tobacco matrix attachment region reduces the loss of transgene expression in the progeny of transgenic tobacco plants. Plant Journal 18:253-263.

Umezawa T., Sakurai T., Totoki Y., Toyoda A., Seki M., Ishiwata A., Akiyama K., Kurotani A., Yoshida T., Mochida K., Kasuga M., Todaka D., Maruyama K., Nakashima K., Enju A., Mizukado S., Ahmed S., Yoshiwara K., Harada K., Tsubokura Y., Hayashi M., Sato S., Anai T., Ishimoto M., Funatsuki H., Teraishi M., Osaki M., Shinano T., Akashi R., Sakaki Y., Yamaguchi-Shinozaki K. und Shinozaki K. (2008) Sequencing and Analysis of Approximately 40 000 Soybean cDNA Clones from a Full-Length-Enriched cDNA Library. Dna Research 15:333-346.

Vinnemeier J., Dröge-Laser W., Pistorius E. K. und Broer I. (1995) Purification and partial characterization of the Streptomyces viridochromogenes Tu494 phosphinothricin-N-acetyltransferase mediating resistance to the herbicide phosphinothricin in transgenic plants. Zeitschrift fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences 50:796-805.

Voinnet O. (2009) Origin, Biogenesis, and Activity of Plant MicroRNAs. Cell 136:669-687.

Wahid F., Shehzad A., Khan T. und Kim Y. Y. (2010) MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research 1803:1231-1243.

Walter C., Broer I., Hillemann D. und Pühler A. (1992) High-Frequency, Heat Treatment-Induced Inactivation of the Phosphinothricin Resistance Gene in Transgenic Single Cell-Suspension Cultures of Medicago-Sativa. Molecular & General Genetics 235:189-196.

Walter S. (2001) Hitze-induzierte Transgeninaktivierung: Regulation über spezifische DNA-Elemente und Proteinfaktoren. Diplomarbeit Universität Rostock

Wang M. B. und Waterhouse P. M. (2000) High-efficiency silencing of a beta-glucuronidase gene in rice is correlated with repetitive transgene structure but is independent of DNA methylation. Plant Molecular Biology 43:67-82.

Warner R. M. und Erwin J. E. (2005) Naturally occurring variation in high temperature induced floral bud abortion across Arabidopsis thaliana accessions. Plant Cell and Environment 28:1255-1266.

Wehrmann A., VanVliet A., Opsomer C., Botterman J. und Schulz A. (1996) The similarities of bar and pat gene products make them equally applicable for plant engineers. Nature Biotechnology 14:1274-1278.

Weinthal D., Tovkach A., Zeevi V. und Tzfira T. (2010) Genome editing in plant cells by zinc finger nucleases. Trends in Plant Science 15:308-321.

Wendler C., Barniske M. und Wild A. (1990) Effect of Phosphinothricin (Glufosinate) on Photosynthesis and Photorespiration of C3 and C4 Plants. Photosynthesis Research 24:55-61.

Wohlleben W., Arnold W., Broer I., Hillemann D., Strauch E. und Pühler, A. (1988) Nucleotide-Sequence of the Phosphinothricin N-Acetyltransferase Gene from Streptomyces-Viridochromogenes-Tu494 and Its Expression in Nicotiana-Tabacum. Gene 70:25-37.

Wood K. V. und Deluca M. (1987) Photographic Detection of Luminescence in Escherichia-Coli Containing the Gene for Firefly Luciferase. Analytical Biochemistry 161:501-507.

Xiong G. S., Li J. Y. und Wang Y. H. (2009) Advances in the regulation and crosstalks of phytohormones. Chinese Science Bulletin 54:4069-4082.

Yenofsky R. L., Fine M. und Pellow J. W. (1990) A Mutant Neomycin Phosphotransferaseli Gene Reduces the Resistance of Transformants to Antibiotic Selection Pressure. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 87:3435-3439.

Ytterberg A. J. und Jensen O. N. (2010) Modification-specific proteomics in plant biology. Journal of Proteomics 73:2249-2266.

Zagorskaya A. A., Sidorchuk Y. V., Shumnyi V. K. und Deineko E. V. (2009) Dynamics of IAA and cytokinins in flower tissues of transgenic tobacco mutant plants with mutant phenotype. Russian Journal of Plant Physiology 56:830-837.

Zhang B., Wang H. Q., Liu B. L., Liu J., Wang X., Liu Q. und Zhang H. G. (2010) A potato NOA gene increased salinity tolerance in Arabidopsis thaliana. African Journal of Biotechnology 9:5869-5878.

Zhang J. D., Lu L. T., Ji L. S., Yang G. D. und Zheng C. C. (2009) Functional characterization of a tobacco matrix attachment region-mediated enhancement of transgene expression. Transgenic Research 18:377-385.

Zhang R., Wise R. R., Struck K. R. und Sharkey T. D. (2010) Moderate heat stress of Arabidopsis thaliana leaves causes chloroplast swelling and plastoglobule formation. Photosynthesis Research 105:123-134.

Zuker M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. Nucleic Acids Research 31:3406-3415.

Zupan J., Muth T. R., Draper O. und Zambryski P. (2000) The transfer of DNA from Agrobacterium tumefaciens into plants: a feast of fundamental insights. Plant Journal 23:11-28.

F Anhang

F1 Abkürzungsverzeichnis

µ	Micro (x 10 ⁻⁶)
°C	Grad Celsius
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
≤	kleiner als
≥	größer als
∞	unendlich
\\	Sequenzdeletion
+1	Transkriptionsstart
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyesigsäure
3' <i>nos</i>	Terminator des Nopalinsynthasegens
3' <i>camv</i>	Terminator des 35S-RNA-Gens des Blumenkohlmosaikvirus
3' UTR	3' untranslatierte Region
5' UTR	5' untranslatierte Region
¹⁴ C	Kohlenstoffisotop der relativen Masse 14
³² P	Phosphorisotop der relativen Masse 32
as-1	´activation sequence-1´
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
A. thaliana	Arabidopsis thaliana
A. tumefaciens	Agrobakterium tumefaciens
bp BPB Bq	Basenpaar Bromphenolblau Becquerel Binderserumelbumin
bsa bzgl. bzw.	kinderserumabumin bezüglich beziehungsweise Cytosin
CaMV	Promotor des 35S-RNA-Gens des Blumenkohlmosaikvirus
cDNA	komplementäre DNA
cm ²	Quadratzentimeter
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DAPI	4´, 6-Diamidin-2-phenylindiol
d. h.	das heißt
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	´enzyme-linked immunosorbent assay´, Enzymimmuntest
EMSA	´Electrophoretic Mobility Shift Assay´
et al. evt.	et alii eventuell Eemto (10 ⁻¹⁵)
fw	´forward´ vorwärts gerichtet (Primer)
g	Gramm

G	Guanin
ggfs.	gegebenenfalls
GLP	gesamtlösliches Protein
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
IRES	internal ribosome entry site
kb	Kilohasen
kD	Kilodalton
	Liter
- I B	Luria Broth
LB	linke Randsequenz der T-DNA
L-N-ac-Pt	I-N-acetyl-phosphinothricin
	logarithmisch
I -Pt	biologisch aktives Phosphinothricin
	Kodierbereich des Luciferase-Gen aus Photinus pyralis
m	$Milli (10^{-3})$
M	Molar
min	Minute
miDNIΛ	microPNA
MODS	3 (N morbolino) propansulfonsäuro
MDD	³ methylphosphinicopropanoic acid
MDE	miDNA responsive element
	mininina-responsive element
MS	Murashiga und Skoog Pflanzonmadium
n n	Nana (10 ⁻⁹)
	Naho (10)
INAA ni\/	napiliaiensaure
	Nacry singhean betransferee and
npm N. bonthomiono	
N. Dentriarriaria	Nicoliana beninamana
	Nicoliana labacum
Oligo	optische Dichte
Oligo	
ρ	PIKO (10)
p	Plasifilio Recording the sign A/A patrilite and for the sign of the starter way
ραι	Phosphinolnncin-w-Acelyliransierase Gen aus Streptomyces
n = 44.4	Viridochromogenes
pat41	Kodierbereich des modifizierten Phosphinothricin-/v-
	Acetyltransferase Gens
pat5	Kodierbereich des synthetischen Phosphinothricin-/v-
Det	Acelyliransierase Gens
Pat	Phosphinothricin-/v-Acetyltransterase
PB2	Phosphat-gepufferte Kochsalziosung
PCR	Polymeraseketten-Reaktion
PEG	
pers.	personiicn
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
	Polyvinylpyrrrolidon
qRI-PCR	quantitative Real Time PCR
KB	rechte Randsequenz der I-DNA
KLE	Relative Licht Einheiten
rpm	Umdrehungen pro Minute
KI DT DOT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse transcriptase PCR
rv	reverse , rückwärts gerichtet (Primer)

s SDS	Sekunde Natriumdodecylsulfat
5. 0. t3' I ITR41	verkürzter 3' LITR41
Т	Thymin
ТА	Tris-Acetat-Puffer
TAPS	N-[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-3-aminopropansulfonsäure
ТВ	Tris-Borat-Puffer
T-DNA	Transfer-DNA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylendiamin
U	Units
unv.	unveröffentlicht
UV	Ultraviolett
ü. N.	über Nacht
VS.	versus
Vol	Volumen
V	Volt
Wdh.	Wiederholung
wt	Wildtyp
хg	Erdbeschleunigung
ZA	Zyklen Anzahl
z. B.	zum Beispiel

F2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung A1: Schematische Darstellung der untersuchten pat-Gene und deren Expression
bei 24°C und nach einem 10tägigen moderaten Hitzestress8
Abbildung C1: Darstellung der erstellten pat-Konstrukte und Vergleich der regulatorischen
Sequenzen
Abbildung C2: Klonierschema des binären Transformationsvektors pTLpat47
Abbildung C3: Nachweis der korrekten Klonierung des binären Transformationsvektors
pTLpat47
Abbildung C4: Klonierschema des binären Transformationsvektors pTLpat48
Abbildung C5: Nachweis der korrekten Klonierung des binären Transformationsvektors
pTLpat48
Abbildung C6: Schematische Darstellung der Blattscheibentransforamtion von N. tabacum 41
Abbildung C7: Nachweis der <i>pat</i> -Konstruke <i>in planta</i> 42
Abbildung C8: Darstellung ausgewählter Tabakpflanzen mit dem pat47- und pat48-Gen 43
Abbildung C9: Phänotypischer Resistenztest ausgewählter Tabakpflanzen mit dem pat47-
und <i>pat</i> 48-Gen
Abbildung C10: Phänotypischer Resistenztest gegenüber BASTA® ausgewählter SRI/47 und
SRI/48 Linien nach einem moderatem Hitzestress
Abbildung C11: Nachweis des Pat-Proteins und der Enzymaktivität in ausgewählten SRI/47
Linien unter Hitze46
Abbildung C12: Nachweis des Pat-Proteins und der Enzymaktivität in ausgewählten SRI/48
Linien unter Hitze47
Abbildung C13: Nachweis der spezifischen patS- und Aktin-mRNA in transgenen
Tabakpflanzen50
Abbildung C14: Etablierung der Amplifikationsbedingungen für die RT-PCR
Abbildung C15: Bestimmung des relativen patS-Transkript-Gehaltes in transgenen
Tabakpflanzen52
Abbildung C16: Bestimmung des relativen patS-Transkript-Gehaltes in transgenen
Tabakpflanzen mit der qRT-PCR53
Abbildung C17: Schematische Darstellung der Klonierung und Markierung der 5' UTR1-
EMSA Sonde
Abbildung C18: Nachweis der korrekten Klonierung der Vektoren pGEM-as1Bpil und pGEM-
s5´ UTR4157
Abbildung C19: DAPI Färbung von Zellkernfraktionen aus N. tabacum SRI kultiviert unter
24°C und 37°C57

Abbildung (C20:	Gelshift-Analyse nativer Kernproteinextrakte aus <i>N. tabacum</i> nach einem	-0
		Hitzestressversuch	28
Abbildung (C21:	Klonierschema des Pflanzentransformationsvektor pLuc43	30
Abbildung (C22:	Nachweis der korrekten Klonierung des Pflanzentransformationsvektors	
		pLuc436	31
Abbildung (C23:	Autoluminogramme der mit dem Luciferasereportergen transformierten	
		Bakterienstämme	32
Abbildung (C24:	Nachweis der luc-Konstrukte und der luc-mRNA in planta	54
Abbildung (C25:	Darstellung ausgewählter Tabakpflanzen mit dem luc43-Gen in	
		verschiedenen Vermehrungsstadien	35
Abbildung (C26:	Bestimmung der relativen Luciferase-Aktivität in transgenen Tabakpflanzen	
			36
Abbildung (C27:	Bestimmung der relativen Luciferase-Aktivität nach einem moderaten	
0		Hitzestress	37
Abbilduna (C28:	Gegenüberstellung der relativen Luciferase-Aktivitäten von unabhängigen	
0		Hitzestressversuchen	58
Abbilduna (C29	Nachweis der korrekten Transformation von A tumefaciens GV3101(pMP9	0)
	020.		71
Abbildung (C30:	Nachweis des pat41- und pat43-Konstruktes in planta	72
Abbildung (C31:	Gegenüberstellung der erzeugten Primärtransformanden und dem Col-	
-		0/Wildtyp	72
Abbilduna (C32:	Kultivierung von Arabidopsis Col-0/Wildtvp Pflanzen bei 22°C und 31°C	73
Abbilduna (C33:	Phänotypischer Resistenztest gegenüber BASTA® ausgewählter Col-0/41	
,		und Col-0/43 Linien nach einem moderatem Hitzestress	74
Abbildung (C31.	Nachweis des Pat-Proteins und der Enzymaktivität in ausgewählten	т
	004.	Archidonaia Oflanzon unter Hitza	76
			0
Abbildung [D1: 0	Gegenüberstellung der in <i>N. tabacum</i> integrierten T-DNAs	78
Abbildung [D2: S	Schematische Darstellung der untersuchten pat-Gene und des Transgen-	
	١	vermittelten Protein steady state Level bei 24°C und nach einem 10tägigen	
	r	noderaten Hitzestress	36

F3 Tabellenverzeichnis

Tabelle B1:	Bezeichnung, Eigenschaften und Herkunft der verwendeten Plasmide11
Tabelle B2:	Bezeichnung, Eigenschaften und Herkunft der verwendeten E. coli - Stämme . 11
Tabelle B3:	Bezeichnung, Eigenschaften und Herkunft der verwendeten A. tumefaciens -
	Stämme12
Tabelle B4:	Antibiotika- und Herbizid Zusätze zu Bakterien- und Pflanzenmedien
Tabelle B5:	Bezeichnung, Sequenz und Verwendung der PCR-Primer
Tabelle C1:	Darstellung der Regenerationsdaten der pat-Gene und des Leervektors in N.
	tabacum
Tabelle C2:	Quantifizierung des Pat-Proteins in ausgewählten SRI/47 und SRI/48 Pflanzen
	bei 24°C
Tabelle C3:	Bestimmung der patS-Kopienzahl in ausgewählten transgenen Events
Tabelle C4:	Darstellung der Regenerationsdaten des luc43-, AQ2-Gens und des Leervektors
	in <i>N. tabacum</i>

Tabelle F1: Bonituren des LH9000-, pat47- und pat48-Konstruktes	129
Tabelle F2: Bonituren des ROK1-, AQ2- und luc43-Konstruktes	130
Tabelle F3: Relative <i>pat</i> S-Trankriptionseinheiten aus Versuchsreihe I	132
Tabelle F4: Relative patS-Trankriptionseinheiten aus Versuchsreihe II	134
Tabelle F5: Relative patS-Trankriptionseinheiten aus Versuchsreihe I	136
Tabelle F6: Relative <i>pat</i> S-Trankriptionseinheiten aus Versuchsreihe II	137
Tabelle F7: Relative Lichteinheinheiten aus Versuchsreihe I	139
Tabelle F8: Relative Lichteinheinheiten aus Versuchsreihe II	140
Tabelle F9: Relative Lichteinheinheiten aus Versuchsreihe III	141
Tabelle F10: Relative Lichteinheinheiten aus Versuchsreihe IV	142
Tabelle F11: Molekulare Analyse und Proteinanalytik der untersuchten SRI/47 und SRI/48	3
Linien	143
Tabelle F12: Molekulare Analyse und Proteinanalytik der untersuchten SRI/AQ2 und	
SRI/Luc43 Linien	145

F4 Sequenzen und Sequenzvergleiche

F4.1 Sequenzen und Sequenzvergleich des CaMV823 und CaMV534

Sequenzvergleich der in den *pat*-Konstrukten verwendeten CaMV Versionen. Sequenzübereinstimmungen sind grau unterlegt. Funktionelle Elemente sind Fett und unterstrichen.

CaMV ₈₂₃	GAATTCCCTTTCAGAAAGAATGCTAACCCACAGATGGTTAGAGAGGCTTACGCAGCAGGT
CaMV ₅₃₄	
CaMV ₈₂₃	CTCATCAAGACGATCTACCCGAGCAATAATCTCCAGGAAATCAAATACCTTCCCAAGAAG
CaMV ₅₃₄	
CaMV ₈₂₃	GTTAAAGATGCAGTCAAAAGATTCAGGACTAACTGCATCAAGAACACAGAGAAAGATATA
CaMV ₅₃₄	
CaMV ₈₂₃	TTTCTCAAGATCAGAAGTACTATTCCAGTATGGACGATTCAAGGCTTGCTT
CaMV ₅₃₄	
CaMV ₈₂₃	AGGCAAGTAATAGAGATTGGAGTCTCTAAAAAGGTAGTTCCCACTGAATCAAAGGCCATG
CaMV ₅₃₄	GAATTCCCATG
	GAGTCAAAGATTCAAATAGAGGACCTAACAGAACTCGCCGTAAAGACTGGCGAACAGTTC
Calviv ₅₃₄	GAGTCAAAGATTCAAATAGAGGACCTAACAGAACTCGCCGTAAAGACTGG-GAACAGTTC
CaMV ₈₂₃	ATACAGAGTCTCTTACGACTCAATGACAAGAAGAAAATCTTCGTCAACATGGTGGAGCAC
CaMV ₅₃₄	ATACAGAGTCTCTTACGACTCAATGACAAGAAGAAAATCTTCGTCAACATGGTGGAGCAC
CaMV ₈₂₃	GACACGCTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATT
CaMV ₅₃₄	GACACGCTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATT
CaMV ₈₂₃	GAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCCAGCTATC
CaMV ₅₃₄	GAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCCAGCTATC
CaMV ₈₂₃	TGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGC
CaMV ₅₃₄	TGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGC
CaMV ₈₂₃	GATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCC
CaMV ₅₃₄	GATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCC

 $CaMV_{823} \ \mbox{caccacgaggagcatcgtggaaaaagaagacgttccaaccacgtcttcaaagcaagtg} \\ CaMV_{534} \ \mbox{cacccacgaggagcatcgtggaaaaagaagacgttccaaccacgtcttcaaagcaagtg} \\$

 $CaMV_{823} \text{ gattgatgtgatatctccactgacgtaagggatgacg} a t t control camves a set of the set of the$

 $\begin{array}{l} CaMV_{823} \hspace{0.1cm} \text{GACCCTTCCTC} \\ \hline \textbf{TATATAA} \\ \text{GGAAGTTCATTTCATTTGGAGAGGG} \\ \hline \textbf{CaMV}_{534} \hspace{0.1cm} \text{GACCCTTCCTC} \\ \hline \textbf{TATATAA} \\ \text{GGAAGTTCATTTCATTTGGAGAGGA} \\ \end{array}$

CaMV₈₂₃ : 823 bp CaMV₅₃₄ : 534 bp

F4.2 Sequenzen und Sequenzvergleich der patS- und pat41-Kodierregion

Sequenzvergleich der *pat*41-Kodierregion aus *S. viridochromogenes* mit der modifizierten *pat*S-Kodierregion (Eckes, P. et al. 1989). Sequenzübereinstimmungen sind grau unterlegt. Start- und Stopcodons sind Fett und kursiv dargestellt.

 patS
 ATG

 pat41
 ATG

 ATG
 CCCAGAACGACGCCCGGTCGAGATCCGTCCCGCCACCGCCGACATGGCGGCG

patS GTTTGTGATATCGTTAACCATTACATTGAGACGTCTACAGTGAACTTTAGGACAGAGCCA

pat41 GTCTGCGACATCGTCAATCACTACATCGAGACGAGCACGGTCAACTTCCGTACGGAGCCG

patS GTTGCTGAGGTTGAGGGTGTTGTGGCTGGTATTGCTTACGCTGGGCCCTGGAAGGCTAGG
pat41 GTCGCCGAGGTGGAGGGCGTCGTCGCCGGCATCGCCTACGCCGGCCCCTGGAAGGCCCGC

patS AACGCTTACGATTGGACAGTTGAGAGTACTGTTTACGTGTCACATAGGCATCAAAGGTTG *pat41* AACGCCTACGACTGGACCGTCGAGTCGACGGTGTACGTCTCCCACCGGCACCAGCGGCTC

patS GGCCTAGGATCCACATTGTACACACATTTGCTTAAGTCTATGGAGGCGCAAGGTTTTAAG *pat41* GGACTGGGCTCCACCCTCTACACCCACCTGCTGAAGTCCATGGAGGCCCAGGGCTTCAAG

patS TCTGTGGTTGCTGTTATAGGCCTTCCAAACGATCCATCTGTTAGGTTGCATGAGGCTTTG
pat41 AGCGTGGTCGCCGTCATCGGACTGCCCAACGACCCCGAGCGTGCGCCTGCACGAGGCGCTC

patS GTTGGTTTTTGGCAAAGGGATTTTGAGTTGCCAGCTCCTCCAAGGCCAGTTAGGCCAGTT

patS ACCCAGATC TGA

pat41 ACACAGATCCCCGATCGTTCAAACATTTGGCAATAA

patS : 552 bp / 49% G+C

pat41:550 bp / 69% G+C

F4.3 Sequenzen und Sequenzvergleich der 3' UTRS, 3' UTR41 und t3' UTR41

Sequenzvergleich der in den *pat*-Konstrukten verwendeten 3' UTRs. Sequenzübereinstimmungen sind mit einem Doppelpunkt markiert.

- 3' UTR41 : 50 bp / 60% G+C
- t3' UTR41 : 17 bp / 82% G+C
- 3' UTRS : 50 bp / 54% G+C

F5 Sequenzierungen

Alle Sequenzierungen wurden durch die Firma GeneArt GmbH in Regensburg durchgeführt.

F5.1 Sequenzierung des pat47-Konstruktes

Sequenzierung des *pat*47-Konstruktes im Vektor pTLpat47 mit den Primern p35Stnos-fw und -rv. Die Sequenz des eingebrachten Fragmentes ist unterstrichen. Die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen sind Fett markiert. Das Stopcodon der *pat*S-Kodierregion ist kursiv dargestellt

patS → TGGTTGGTTGCTGAGGTTGAGGGTGTTGTGGCTGGTATTGCTTACGCTGGGCCCTGGAAGGCTAGGAA CGCTTACGATTGGACAGTTGAGAGTACTGTTTACGTGTCACATAGGCATCAAAGGTTGGGCCTAGGAT CCACATTGTACACACATTTGCTTAAGTCTATGGAGGCGCAAGGTTTTAAGTCTGTGGTTGCTGTTATA GGCCTTCCAAACGATCCATCTGTTAGGTTGCATGAGGCTTTGGGATACACAGCCCGGGGTACATTGCG CGCAGCTGGATACAAGCATGGTGGATGGCATGATGTTGGTTTTTGGCAAAGGGATTTTGAGTTGCCAG Bg/II Stop 3' UTR41 → ${\tt CTCCTCCAAGGCCAGTTAGGCCAGTTACCC} {\tt AGATC} {\tt T} {\tt GAGTCGACCTGCAGCTCAATAGGCCGCCGCAG}$ 3' camv → Sphl TAATGTGTGAGTAGTTCCCAGATAAGGGAATTAGGGTTCTTATAGGGTTTCGCTCATGTGTTGAGCAT ATAAGAAACCCTTAGTATGTATTTGTATTTGTAAAATACTTCTATCAATAAAATTTCTAATTCCTAAA Kpnl ACCAAAATCCAGG**GGTACC**CGATCAGATTGTCGTTTCCCGCCTTCGGTTTAAACTATCAGTGTTTGAC AGGATATATTGGCGGGTAAACCTAAGAGAAAAGAGCGTTTATTAGAATAATCGGATATTTAAAAGGGC GTGAAAAGGTTTATCCGTTCGTCCATTTGTATGTGCATGCCAACCACAGGGTTCCCCTCGGGAGTGCT TGGCATTCCGTGCGATAATGACTTCTGTTCACC 3'

F5.2 Sequenzierung des *pat*48-Konstruktes

Sequenzierung des *pat*48-Konstruktes im Subvektor pDH48 mit den Primern p35St35S-fw und -rv. Die Sequenz des eingebrachten Fragmentes ist unterstrichen. Die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen sind Fett markiert. Das Stopcodon der *pat*S-Kodierregion ist kursiv dargestellt.

patS → 5 ´GCTGAATATGGCCGCGGTTTGTGATATCGTTAACCATTACATTGAGACGTCTACAGTGAACTTTAG TGGTTGCTGAGGTTGAGGGTGTTGTGGCTGGTATTGCTTACGCTGGGCCCTGGAAGGCTAGGAACGCT TACGATTGGACAGTTGAGAGTACTGTTTACGTGTCACATAGGCATCAAAGGTTGGGCCTAGGATCCAC ATTGTACACACATTTGCTTAAGTCTATGGAGGCGCAAGGTTTTAAGTCTGTGGTTGCTGTTATAGGCC TTCCAAACGATCCATCTGTTAGGTTGCATGAGGCTTTGGGATACACAGCCCGGGGTACATTGCGCGCA GCTGGATACAAGCATGGTGGATGGCATGATGTTGGTTTTTGGCAAAGGGATTTTGAGTTGCCAGCTCC Stop 3' UTR41 → TCCAAGGCCAGTTAGGCCAGTTACCCAGATCTGAGCCGACCTGCAGCTCAATAGGCCGCCGCAGTTTC $3' nos \rightarrow$ Sphl CAGTGAGATCC**GCATGC**TCCCCGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTG TTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATG TAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGC SacI

ATCGGGAATTGCCAAGCTT**GAGCTC**GAATTCAAGCT 3

F5.3 Sequenzierung des Subvektors pGEM-as1Bpil

Sequenzierung von dem Klon pGEM-as1Bpil.1 mit den Standard-Primer pUC/M13-fw und pUC/M13-rv für das pGEM®- TEasy Vector System. Die Sequenz der Bpi-Kassette ist unterstrichen. Die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen sind Fett markiert. Die Sequenz des *as-1* Elements ist kursiv dargestellt. Die Punktmutation von T \rightarrow G in der *Xba*I-Erkennungssequenz außerhalb der Bpi-Kassette ist blau dargestellt. Die Bpi-Kassette ist in 'antisense' Orientierung integriert.

5´GCCCGACGTCGC	ATGCTCCCGGCCGCCATG	GCGGCCGCGGGGAATTCG	ATTGTACCTCGCGAATGCA
Xbal	Bpil	Xbal	
GCTAGATTTGAATT(C TTTT GC GTCTTC GTACC	CGGGGATCC TCTAGA GT	$GCGTCATCCCTTACGTCA\mathbf{T}$
Xbal	Bpil		
CTAGA GTCGACCTG	CAGGCATGC GAAGAC GC A	AAA GCTTAAGTAATCGG	ATCCCGGGCCCGTCGACTG
CAGAGGCCTGCATG	CAAGCTTGGCGTAATCAT	GGTCATAGCTGTTTCCT	GTGTGAATCACTAGTGAAT
TCGCGGCCGCCTGC	AGGTCGACCATATGGGAG	AGCTCCCAACGCGTTGG	ATGCATAGCTTGAGTATTC
TATAGTGTCACCTA	AATAGCTTGGCGTAATCA	TGGTCATAGCTGTTTCC	TGTGTGAAATTGTTATCCG
		~ እ Ლ እ እ እ ርጦር Ლ እ እ እ ር ር ር ጦ	
CICACAAIICCACA	CAACAIACGAGCCGGAAG	CATAAAGIGIAAAGCCI	GGGIGCCIAAIGAGIGAG
СТААСТСАСАТТАА	TTGCGTTGCGCTCACTGC	CCGCTTTCCAGTCGGGA	AACCTGTCGTGCCAGCTGC
ATTAATGAATCGGC	CAACGCGCGGGGGAGAGGC	GGTTTGCGTATTGGGCG	CTCTTCCGCTTCCTCGCTC
ACTGACTCGCTGCG	CTCGGTCGTTCGGCTGCG	GCGAGCGGTATCAGCTC	ACTCAAAGGCGGTAATACG
GTTATCCACAGAAT	CAGGGGATAACGCAGGAA	AGAACATGTGAGCAAAA	GGCCAGCAAAAGGCCAGGA
ACCGTAAAAAGGCC	GCGTTGCTGGCGTTTTTC	CATAGGCTCCGCCCCCC	TGACGAGCATCACAAA 3´

F5.4 Sequenzierung des Vektors pGEM-s5´ UTR41

Sequenzierung von dem Klon pGEM-s5'UTR41.7 mit den Standard-Primer pUC/M13-fw und pUC/M13-rv für das pGEM®- TEasy Vector System. Die Sequenz der Bpi-Kassette ist unterstrichen. Die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen sind Fett markiert. Die Sequenz des s5' UTR41 ist kursiv dargestellt. Die Punktmutation von T \rightarrow G in der *Xba*l-Erkennungssequenz außerhalb der Bpi-Kassette ist blau dargestellt. Die s5' UTR41 ist in 'antisense' Orientierung integriert.

5´TACACTATAGGGCGAATT	GGGCCCGACGTCG	GCATGCTCCCG	GCCGCCATGGCGC	GCCGCGGGGAATTC
	Xbal		Bpil	
GATTGTACCTCGCGAATGCA	GCTAGATTTGAAT	TCTTTTGCGT(CTTCGTACCCGGC	GGATCCTCTAG <i>GT</i>
			Bpil	
CGACTGTTAGTTCCTCGAGG	ATCCCCTAGAGTC	CGACCTGCAGG	CATGC GAAGAC GO	C AAAA GCTTAAGT
AATCGGATCCCGGGCCCGTC	GACTGCAGAGGCC	CTGCATGCAAG	CTTGGCGTAATCA	ATGGTCATAGCTG
TTTCCTGTGTGAATCACTAG	TGAATTCGCGGCC	GCCTGCAGGT(CGACCATATGGGA	AGAGC'I'CCCAACG
ССТТССАТАССТТСАС	ТАТТСТАТАСТСТ		GCTTGGCGTAAT(САТССТСАТАССТ
		011001111111	50110000111110	
GTTTCCTGTGTGAAATTGTT	ATCCGCTCACAAI	TCCACACAAC	ATACGAGCCGGA	AGCATAAAGTGTA
AAGCCTGGGGTGCCTAATGA	GTGAGCTAACTCA	CATTAATTGC	GTTGCGCTCACTO	GCCCGCTTTCCAG
TCGGGAAACCTGTCGTGCCA	GCTGCATTAATGA	ATCGGCCAAC	GCGCGGGGGAGAG	GCGGTTTGCGTAT
	~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~			
TGGGCGCTCTTCCGCTTCCT	CGCTCACTGACTC	GCTGCGCTCG	GTCGTTCGGCTGC	CGGCGAGCGGTAT
САССТСАСТСАААСССССТА	Ճաջշշառջան		CCATAACCCACCI	
CAUCICACICAAAOOCOOIA	AIACOOIIAICCA		JUATAACUCAUUA	MAGAACAIGIGA
GCAAAAGGCCAGCAAAAGGC	CAGGAACCGTAAA	AAGGCCGCGT	IGCTGGCGTTTT	ICCATAGGCTCCG
CCCCCTGACGAGCATCACA	AAAATCGACGCTC	CAAGTCAGAGG	IGGCGAAACCCGA	ACAGGACTATAAA
GATACCAGGCGTTTCCCCCT	GGAAGCTCCCTCG	STGCGCTCTCC	IGTTCCGACCCT	GCCGCTTACCGGA
TACCTGTCCGCCTTTCTCCC	TTCGGGAAGCGTG	GCGCTTTCTC	ATAGCTCACGCT	GTAAGTATCT 3′

## F6 Sekundärstrukturen

Die möglichen DNA- und RNA-Sekundärstrukturen wurden mit der Software mfold 2.3 (Zuker, M. 2003) berechnet. Die Strukturen mit dem günstigsten Energiezustand wurden dargestellt.

## F6.1 DNA- und RNA-Sekundärstruktur der 5´ UTR41 bei 24°C und 37°C



37 °C (DNA)

37 °C (RNA)







## F6.2 RNA-Sekundärstruktur der 5' UTRS bei 24°C und 37°C

## F7 Regenerationsraten

Die binären Transformationsvektoren mit und ohne das jeweilige Zielgen wurden in N. tabacum eingebracht und nach vier bzw. sechs Wochen Regeneration der Explantate auf ACB-Medium die Anzahl der gebildeten Kalli und Sprosse bonitiert.

Tabelle F1: Bonituren des LH9000- , pat47- und pat48-KonstruktesTf., Transformation; B1, Bonitur nach vier Wochen Regeneration; B2, Bonitur nach vier Wochen Regeneration

			Ka	alli	Kalli/Ex	plantat	Spro	osse	Sprosse/	Explantat
Tf	T-DNA	Explantate	B1	B2	B1	B2	B1	B2	B1	B2
	LH9000	14	35	35	2,50	2,50	2	34	0,14	2,43
1	TLpat47	18	38	49	2,11	2,72	1	21	0,06	1,17
	TLpat48	14	24	39	1,71	2,79	4	31	0,29	2,21
	LH9000	19	75	75	3,95	3,95	10	51	0,53	2,68
2	TLpat47	25	54	77	2,16	3,08	10	45	0,40	1,80
	TLpat48	20	67	67	3,35	3,35	5	41	0,25	2,05
	LH9000	25	58	58	2,32	2,32	0	18	0,00	0,72
3	TLpat47	25	38	49	1,52	1,96	0	8	0,00	0,32
	TLpat48	25	47	64	1,88	2,56	0	14	0,00	0,56
	LH9000	25	43	55	1,72	2,20	3	43	0,12	1,72
4	TLpat47	25	34	57	1,36	2,28	11	34	0,44	1,36
	TLpat48	30	67	73	2,23	2,43	0	40	0,00	1,33
	LH9000	20	62	62	3,10	3,10	0	7	0,00	0,35
5	TLpat47	25	56	64	2,33	2,56	0	15	0,00	0,60
	TLpat48	25	63	66	2,52	2,64	0	15	0,00	0,60
	LH9000	30	46	102	1,53	3,40	5	17	0,17	0,57
6	TLpat47	30	0	0	0,00	0,00	0	0	0,00	0,00
	TLpat48	24	21	48	0,87	2,00	3	15	0,13	0,63
	LH9000	24	53	78	2,21	3,25	0	18	0,00	0,75
7	TLpat47	18	0	0	0,00	0,00	0	0	0,00	0,00
	TLpat48	18	33	52	1,83	2,89	0	33	0,00	1,83
	LH9000	30	24	24	0,80	0,80	0	10	0,00	0,33
8	TLpat47	30	0	0	0,00	0,00	0	0	0,00	0,00
	TLpat48	30	0	0	0,00	0,00	0	0	0,00	0,00
	LH9000	29	34	64	1,17	2,20	0	23	0,00	0,79
9	TLpat47	30	0	18	0,00	0,60	0	1	0,00	0,03
	TLpat48	30	67	73	2,23	2,43	0	40	0,00	1,33
	LH9000	28	96	104	3,43	3,71	0	25	0,00	0,89
10	TLpat47	30	0	0	0,00	0,00	0	0	0,00	0,00
	TLpat48	30	60	98	2,00	3,27	0	35	0,00	1,17

Tf	T-DNA	Explantata	Kalli		Kalli/Explantat		Sprosse		Sprosse/Explantat	
		Explantate	B1	B2	B1	B2	B1	B2	B1	B2
	LH9000	30	88	89	2,93	2,97	1	15	0,03	0,50
11	TLpat47	28	0	0	0,00	0,00	0	0	0,00	0,00
	TLpat48	31	31	83	1,00	2,68	0	32	0,00	1,03
12	LH9000	30	0	68	0,00	2,27	0	1	0,00	0,03
	TLpat47	30	57	68	1,90	2,27	8	14	0,27	0,47
	TLpat48	30	63	81	2,10	2,70	1	37	0,03	1,23
	LH9000	30	53	109	1,77	3,63	0	36	0,00	1,20
13	TLpat47	30	45	96	1,50	3,20	0	37	0,00	1,23
	TLpat48	30	49	100	1,63	3,33	0	20	0,00	0,67

Tabelle F2: Bonituren des ROK1-, AQ2- und luc43-Konstruktes

Tf., Transformation; B1, Bonitur nach vier Wochen Regeneration; B2, Bonitur nach vier Wochen Regeneration

т		Evploritoto	Ka	alli	Kalli/Ex	plantat	Spro	osse	Sprosse/	Explantat
	I-DNA	Explantate	B1	B2	B1	B2	B1	B2	B1	B2
	AQ2	24	46	48	1,92	2,00	4	5	0,17	0,21
1	ROK1	24	33	58	1,37	2,42	4	6	0,17	0,25
	Luc43	18	69	69	3,83	3,83	19	19	1,06	1,06
	AQ2	24	58	79	2,42	3,29	7	14	0,29	0,58
2	ROK1	18	0	0	0,00	0,00	0	0	0,00	0,00
	Luc43	24	44	44	1,83	1,83	0	11	0,00	0,46
	AQ2	30	28	72	0,93	2,40	0	8	0,00	0,27
3	ROK1	18	56	85	3,22	4,72	3	24	0,17	0,50
	Luc43	18	13	63	0,72	3,50	0	9	0,00	1,33
	AQ2	30	85	93	2,83	3,10	11	18	0,37	0,60
4	ROK1	30	0	0	0,00	0,00	0	0	0,00	0,00
	Luc43	30	19	67	0,63	2,23	0	13	0,00	0,43
	AQ2	24	21	78	0,87	3,25	0	21	0,00	0,88
5	ROK1	29	45	99	1,55	3,41	0	34	0,00	1,17
	Luc43	29	8	94	0,27	3,24	0	4	0,00	0,14
	AQ2	30	0	18	0,00	0,60	0	3	0,00	0,10
6	ROK1	30	42	107	1,40	3,57	0	13	0,00	0,43
	Luc43	30	0	0	0,00	0,00	0	0	0,00	0,00
	AQ2	30	98	100	3,27	3,33	20	56	0,67	1,87
7	ROK1	30	83	103	2,77	3,43	14	21	0,47	0,70
	Luc43	29	0	0	0,00	0,00	0	0	0,00	0,00
	AQ2	30	0	5	0,00	0,17	0	0	0,00	0,00
8	ROK1	30	0	13	0,00	0,43	0	2	0,00	0,07
	Luc43	29	0	0	0,00	0,00	0	0	0,00	0,00

τf		Explantate	Ka	alli	Kalli/E>	cplantat	Spro	osse	Sprosse/	Explantat
	I-DNA	Explantate	B1	B2	B1	B2	B1	B2	B1	B2
	AQ2	28	10	39	0,36	1,39	0	13	0,00	0,46
9	ROK1	24	10	22	0,42	0,92	0	10	0,00	0,42
	Luc43	30	17	49	0,57	1,63	0	25	0,00	0,83
	AQ2	29	43	56	1,48	1,93	5	7	0,17	0,24
10	ROK1	28	78	85	2,79	3,03	13	18	0,46	0,64
	Luc43	30	16	16	0,53	0,53	0	2	0,00	0,07
	AQ2	30	13	20	0,43	1,54	0	9	0,00	0,3
11	ROK1	30	6	15	0,20	0,50	0	4	0,00	0,13
	Luc43	29	2	8	0,07	0,28	0	2	0,00	0,07

# F8 Densitometrische Bestimmung relativer Transkriptionseinheiten

Nach einem Hitzestressversuch wurden die Pflanzen beprobt, die Gesamt-RNA isoliert und cDNA synthetisiert. Anschließend erfolgte die spezifische Amplifikation des patS- und Aktin-Gens in der RT-PCR. Die Amplifikationen wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Mit Hilfe der Jede densitometrische Messung wurde gegen einen spezifischen Blindwert (OD_{Blind}), der dem Hintergrundsignal der gelelektrophoretischen Auftrennung entsprach normalisiert (ODProbe-Blind). Für die Bestimmung der relativen patS-Transkriptionseinheiten (patS-Aktin), wurden die patS-Werte (pars) anhand der Aktin-Werte (Aktin) normalisiert. Um einen möglichen Unterschied unter Hitze aufzeigen zu können, wurden die Software PCBAS[®] 2.0 wurden die spezifischen Signale densitometrisch in einen Zahlenwert proportional zu dessen Stärke verrechnet (OD_{Probe}). ermittelten Werte der Klone bei 37°C relativ gegen die Werte der isogenen 24°C Kontrollen verrechnet.

M. 0 00 0 00 10 4	-		an the second		OD Akti	L		OD pat	S	Trans	Relative kriptionsei	nheiten
		Sinceam	lelliperatur	Probe	Blind	Probe- Blind	Probe	Blind	Probe- Blind	Aktin	patS	<i>pat</i> S-Aktin
pat47		Ţ	24°C	4090	2813	1277	3532	2489	1043	-	~	~
	0	_	37°C	4797	2932	1865	4953	4048	905	1,46	0,87	0,59
	0	c	24°C	6347	4062	2285	12385	9425	2960	-	~	~
		V	37°C	6980	4243	2737	11391	9112	2279	1,20	0,77	0,64
		7	24°C	7374	3977	3397	11694	3495	8199	-	~	~
	10	_	37°C	7443	4000	3443	10331	4241	0609	1,01	0,74	0,73
	40	c	24°C	10545	5347	5198	9607	2970	6637	-	~	~
		V	37°C	9450	5098	4352	10191	3496	6695	0,84	1,01	1,20
		Ţ	24°C	7085	4084	3001	8120	2999	5121	-	~	~
	Ţ		37°C	5995	3755	2240	7211	2876	4335	0,75	0,85	1,13
	- 0	c	24°C	8472	4630	3842	8930	2997	5933	-	~	~
		V	37°C	7426	3647	3779	9051	3505	5546	0,98	0,93	0,95
		Ţ	24°C	6465	3224	3241	11117	3713	7404	-	<u> </u>	~
	L T	_	37°C	6683	3986	2697	6448	2917	3531	0,83	0,48	0,57
	5 1 1	c	24°C	7424	4066	3358	7590	2437	5153	1	-	1
		V	37°C	7784	4376	3408	6671	2440	4231	1 01	0.82	0.81

Tabelle F3: Relative patS-Transkriptionseinheiten aus Versuchsreihe I

0	
σ	
∢	
ш	

											Dolativo	
Vouctur. 14	-		Tomocont		OD Akti	ц		OD pat	(0	Transk	kriptionsei	nheiten
Nonstrukt	ГШе	Messung	i emperatur	Probe	Blind	Probe- Blind	Probe	Blind	Probe- Blind	Aktin	patS	patS-Aktin
pat47			24°C	0699	3969	2721	8069	2810	5259	-	~	1
	C U	-	37°C	7313	3970	3343	5486	2661	2825	1,23	0,54	0,44
	00	c	24°C	8534	4963	3571	8967	2907	6060	-	-	~
		N	37°C	9701	4644	5057	5120	2127	2993	1,42	0,49	0,35
		7	24°C	7571	3834	3737	8792	3312	5480	-	-	~
	77	_	37°C	10273	4192	6081	9322	3951	5371	1,63	0,98	0,60
		¢	24°C	10026	4557	5469	6616	2574	4042	-	-	-
		۷	37°C	14231	6970	7261	6925	2317	4608	1,33	1,14	0,86
pat48		,	24°C	5598	3520	2078	8156	3263	4893	-	-	~
	L	_	37°C	7855	5363	2492	4384	2934	1450	1,20	0,30	0,25
	n	c	24°C	1	1		1	,	ı	1	1	
		V	37°C	1	1		1	,	ı	1	1	
		•	24°C	8741	5641	3100	5597	5404	193	-	-	~
	00	_	37°C	8881	5618	3263	7355	6846	509	1,05	2,64	2,5
	00	c	24°C	9343	5857	3486	12021	10089	1932	1	1	~
		V	37°C	9239	4741	4498	18554	14813	3741	1,10	1,94	1,76
		•	24°C	12735	7781	4954	15250	8394	6856	-	-	~
	00	_	37°C	12563	7015	5548	8128	6748	1380	1,12	0,20	0,18
	09	c	24°C	1	1		ı	1	ı	1	ı	
		V	37°C	1	1		1	,	ı	1	1	
			24°C	10097	5904	4193	6351	3392	2959	-	-	~
	20	_	37°C	10557	5767	4790	7049	4245	2804	1,14	0,95	0,83
	21	c	24°C	12932	7176	5756	8949	3739	5210	1	-	-
		V	37°C	14837	7847	0669	7067	3503	3564	1,21	0,68	0,65

0	
σ	
L	
$\triangleleft$	
ш	

Tabelle F4: Re	lative patS-Ti	ranskriptionseir	nheiten aus Versu	uchsreihe II								
	-		F		OD Aktii	c		OD pai	Ş	Transk	Relative criptionsei	inheiten
Nonstrukt	LINIE	Messung	lemperatur	Probe	Blind	Probe- Blind	Probe	Blind	Probe-Blind	Aktin	patS	patS-Aktin
pat47		7	24°C	3036	1127	1909	4506	1272	3234	-	-	Ł
	ç	_	37°C	2977	1123	1854	2957	1167	1790	0,97	0,55	0,57
	62	c	24°C	7963	2073	5890	7393	2114	5279	-	-	Ł
		V	37°C	7661	2112	5549	5367	2318	3049	0,94	0,58	0,61
		~	24°C	2192	1152	1040	3582	1480	2102	-	-	Ł
	0		37°C	3900	1640	2260	2271	1380	891	2,17	0,42	0,19
	4 0	c	24°C	5802	1710	4092	7860	2311	5549	-	-	Ţ
		V	37°C	3088	1481	1607	8828	2792	6036	0,39	1,09	2,79
		~	24°C	3234	1158	2076	3846	1486	2360	-	~	Ļ
	T L	_	37°C	3142	1179	1963	3186	1344	1842	0,95	0,78	0,82
	0	c	24°C	8479	2699	5780	9988	2828	7160	-	-	Ł
		V	37°C	10644	2941	7703	5619	2422	3197	1,33	0,45	0,34
			24°C	5042	1526	3516	4054	837	3217	-	-	Ł
	L.	_	37°C	3654	1373	2281	3386	832	2554	0,65	0,79	1,22
	<b>1</b> 0	c	24°C	14867	3255	11612	4320	925	3395	-	~	Ļ
		V	37°C	11120	3185	7935	3544	926	2618	0,68	0,77	1,13
		~	24°C	4171	1270	2901	4906	1026	3880	-	~	Ļ
	00		37°C	4313	1475	2838	3795	1058	2737	0,98	0,70	0,72
	00	c	24°C	13057	3228	9829	5292	1072	4220	+	<b>.</b>	Ł
		N	37°C	11256	2720	8536	5341	1061	4280	0,87	1,01	1,17
		Ţ	24°C	1884	802	1082	2476	1199	1277	-	-	٢
	77	_	37°C	3512	1124	2388	5034	1350	3684	2,21	2,88	1,30
		c	24°C	4980	2020	2960	4635	1974	2661	1	Ļ	L L
		V	37°C	9712	2585	7127	4348	2759	1589	2,41	0,60	0,25
pat48		•	24°C	2545	962	1550	6365	1697	4668	4	-	-
	00		37°C	3910	1238	2672	6831	1709	5122	1,72	1,10	0,64
	09	c	24°C	7736	2351	5385	9026	2684	6342	-	-	٢
		7	37°C	7564	2394	5170	15028	3635	11393	0,96	1,80	1,87
		Ţ	24°C	2976	1019	1957	3879	1186	2693	1	1	1
	OF	_	37°C	3838	1265	2573	6333	1399	4934	1,31	1,83	1,40
	00	ç	24°C	9682	2576	7106	1529	545	984	1	1	1
		V	37°C	10182	2284	7898	2431	653	1778	1,11	1,81	1,63

# F Anhang

	ctin				
inheiten	patS-A	-	6,11	-	1.52
Relative triptionse	patS	~	5,07	~	1.08
Transk	Aktin	~	0,83	1	0.71
Ş	Probe-Blind	1224	6203	4362	4720
OD pat	Blind	1164	1699	2197	2348
	Probe	2388	7902	6229	2068
c	Probe- Blind	1646	1360	5604	3961
OD Akti	Blind	993	1008	2155	1833
	Probe	2639	2368	7759	5794
Tomoorofiur		24°C	37°C	24°C	37°C
	Sincean	•	_	c	V
			7	2	_
Konstrukt	VOIDENTAN	pat48			

# Bestimmung relativer Transkriptionseinheiten mit der 2-ΔΔCt Methode **Б**9

Nach einem Hitzestressversuch wurden die Pflanzen beprobt, die Gesamt-RNA isoliert und cDNA synthetisiert. Anschließend erfolgte die spezifische Amplifikation des patS- und Aktin-Gens in der qRT-PCR. Mit Hilfe der 2^{-ΔΔCt} Methode wurde die relative patS-Transkriptmenge anhand von Aktin normalisiert und die ermittelten Werte der Klone unter Hitze im Verhältnis zu den isogenen 24°C Kontrollen bestimmt.

	-					-			
V o o o turinte		Mocon	Tomocrotic	Ct-V	Wert	4	ct	ΔΔCt	<b>2</b> -440T
VOIISII UNI	LIIIe	Messurig	l emperatur	Aktin	patS	Aktin	patS		
pat47		•	24°C	30,11	31,97	70	-	N LL C	030
	0	_	37°C	28,17	30,57	-,44	- 4	0,34	0,03
	0	c	24°C	32,01	32,64	сс с с	1 10	1 70	
		7	37°C	28,79	31,18	0,22	1,40	1,70	0,50
		•	24°C	27,65	25,06		1	1	100
	0		37°C	27,36	26,32	0,23	-1,20	CC, I	0,34
	40	c	24°C	28,57	27,00	1 1		10	
		V	37°C	25,62	25,84	/c'I	-0,22	1,73	0,23
		•	24°C	27,54	27,66	, c	50		0 6.0
	t L	_	37°C	25,74	26,80	-0, 12	- 1,00	0,34	7C'N
	-0	c	24°C	28,13	26,19	7 C C	1000	7	0.45
		7	37°C	27,92	27,14	0,21	-0,30	1,10	0,40
		•	24°C	27,66	26,01	C LI T	10 0	00 7	67.0
	, L	_	37°C	26,13	25,74	1,00	0,21	1,20	0,42
	50 40	c	24°C	28,27	26,48	7	07.0	7	
		7	37°C	27,56	26,96	0,71	-0,40	1,13	U,44
pat48		•	24°C	28,63	31,59		97.0	90.0	900
	00	_	37°C	27,81	30,83	0,02	0,70	0,00	0,30
	00	c	24°C	28,77	31,70	0 60	770	VV U	V _ U
		7	37°C	28,19	31,56	0,00	0, 14	0,44	0,74

Tabelle F5: Relative patS-Transkriptionseinheiten aus Versuchsreihe I

D.	
σ	
$\triangleleft$	
11	

<b>2</b> -ΔΔCT		000	0,00		0,03	66 U	0,32	66 U	70,02
ΔΔCt		2 60	<b>0,</b> 09	2.46	0,40	1 66	1,00	1 66	1,00
5t	patS	1 76	-1,70	00 7	- 1,00		-0,23	0 64	-0,04
ΔQ	Aktin	00 1	00,1	100	1,00	1 26	00,1	~ ~	1,11
Vert	patS	25,21	26,97	26,76	27,60	22,54	22,83	23,05	23,59
Ct-V	Aktin	27,82	25,99	28,62	26,00	27,70	26,34	28,32	27,21
Tomporofile	I elliperatur	24°C	37°C	24°C	37°C	24°C	37°C	24°C	37°C
Moccine	Niessuig	۲	_	c	Z	۲	_	C	۲
			CC	00			20	10	
Konstrukt		pat48							

Tabelle F6: Relative patS-Transkriptionseinheiten aus Versuchsreihe II

	advances and a state								
Konstructu	2	Moccus	Tommoratur	Ct-V	Vert	Δ	ct	AACt	<b>2</b> -ΔΔCt
		Ninesawi	i ellibei atui	Aktin	patS	Aktin	patS		
pat47		*	24°C	27,85	24,50	°C 7		310	сс U
	çç	_	37°C	26,62	25,42	1,23	-0,32	2, 13	0,23
	C7	c	24°C	29,22	25,77	C 10	00	7 16	30.0
		۷	37°C	29,05	27,06	0, 17	-1,23	I,40	0,30
		•	24°C	28,54	25,03	CC 7		30.1	
	0		37°C	27,22	25,07	7C,1	-0,04	0C,I	0,03
	43	c	24°C	29,52	25,71	~ ~		01	<b></b>
		И	37°C	28,08	25,85		-0, 14	1,00	0,33
	t.	•	24°C	27,75	24,86	10	6	00 7	77 0
	0	_	37°C	26,68	25,07	1,07	-0,21	1,20	0,41
	V L	•	24°C	27,50	21,93	00 7		30.1	0 10
	40 4		37°C	26,12	21,61	00,1	0,3Z	1,00	0,40
		~	24°C	28,41	21,06		0.05	69 U	U GE
	00	_	37°C	28,63	21,91	-0,22	-0,03	0,03	co'o
	00	c	24°C	27,05	19,75	11	7	1 60	0.05
		7	37°C	26,64	20,87	0,41	-1,12	1,00	0,00
pat48	00	•	24°C	28,20	27,01	00	77	00	70.0
	59		37°C	23,21	23,90	4,33	o,	I,00	0, <i>21</i>
		•	24°C	27,82	26,78		со с	20.0	77 0
	OE	_	37°C	24,62	23,95	0,2,0	2,00	0,57	0,11
	06	c	24°C	28,04	26,81	100	90 C	01.0	0 7.7
		۷	37°C	24.70	23.95	t 2 2	2,00	0,40	0,12

137

## F Anhang

V and with the		Meee	Tomoccotur	Ct-V	Vert	Þ	ct	ΔΔCt	<b>2</b> - ^{ΔΔCT}
VOLISIL UKI	LINE	Messaud	l emperatur	Aktin	patS	Aktin	patS		
pat48		T	24°C	28,16	28,52	7 0 C	5 04	70 C	0 10
		_	37°C	25,29	22,58	2,01	0,04	-0,01	0,40
	0	c	24°C	28,09	25,51	000	7 67	2 2 5	10.20
		7	37°C	28,77	22,84	-0,00	2,07	-0,00	10,20
# F10 Luminometrische Bestimmung relativer Licht Einheiten

## Tabelle F7: Relative Lichteinheinheiten aus Versuchsreihe I

Luminometrische Doppelbestimmung der Relativen Licht Einheiten (RLE) von *in vitro* Kulturen und Pflanzen in Erde (*) unter Kontrollbedingungen bei einer Sensitivität von 175. Die ermittelten Werte wurden auf einem µg des Gesamt löslichen Proteins (GLP) bezogen.

	2	>						SR	I/AQ2					
	Ξ	>	- 2	*	'	6	- -	*~	-	17	.4	22	1	26
	M	Ę	Μ1	M2	M1	M2	M	M2	M1	M2	Ā	M2	M1	M2
RLE	26,07	26,13	63678,82	65372,59	8272,17	8517,34	73172,01	69325,65	29891,90	27790,06	70727,84	68481,76	7,41	2,93
MM	26,	10	6452	5,71	8394	4,75	7124	18,83	2884	0,98	0969	04,80	5,	17
GLP [µg]	68,	50	116	,50	56,	00	11(	5,5	38,	50	32,	,25	73	38
RLE/GLP	0,3	38	553	,87	149	,91	611	,58	749	,12	215	8,29	0	07

-31         -32         -33         -33         -5 *         -11         -14         -14           M1         M1         M1         M1         M2         M2         M1         M2         M2         M1         M2         M2         M1         M2         M2         M2				SRI	4Q2						S	RI/Luc43			
M1         M1         M1         M2         M1         M2		•	31	ი -	32	1	33	SRI/F		-	* 2	·	-	÷	4
RLE         25363,51         24417,89         18544,97         17912,48         18841,27         13163,30         24,09         27,61         40603,2673         40026,7921         762,65         757,32         36,22         36,5           MW         24890,70         18228,73         16002,29         25,85         40315,03         759,99         36,40           GLP [µg]         65,88         58,38         32,13         12,25         104,00         47,25         154,75           RLE/GLP         377,82         312,24         498,05         2,11         387,64         16,08         0,24		M1	M	M1	M2	M	M2	M	M2	M1	M2	M1	M2	Ы	M2
MW         24890,70         18228,73         16002,29         25,85         40315,03         759,99         36,40           GLP [µg]         65,88         58,38         32,13         12,25         104,00         47,25         154,75           RLE/GLP         377,82         312,24         498,05         2,11         387,64         16,08         0,24	RLE	25363,51	24417,89	18544,97	17912,48	18841,27	13163,30	24,09	27,61	40603,2673	40026,7921	762,65	757,32	36,22	36,57
GLP [µg]         65,88         58,38         32,13         12,25         104,00         47,25         154,75           RLE/GLP         377,82         312,24         498,05         2,11         387,64         16,08         0,24	MM	248(	90,70	1822	8,73	1600	12,29	25,	85	4031	5,03	759	,99	36,4	o.
RLE/GLP         377,82         312,24         498,05         2,11         387,64         16,08         0,24	GLP [µg]	65	,88	58,	38	32,	13	12,	25	104	.,00	47,	25	154,	75
	RLE/GLP	37	7,82	312	,24	496	3,05	5,	1	387	,64	16,	08	0,2	4

						SRI/L	-uc43					
		15		22	-	23		26	ຕ '	9	1	57
	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2
RLE	33,07	30,70	87507,02	85374,37	53,62	39,01	48315,84	49048,48	3,75	0,93	7,12	2,85
ΜW	31	89	0969	4,80	46,	32	4868	2,16	2,3	34	4,9	66
GLP [µg]	62	,25	32,	25	43,	50	66,	50	96,	50	85,	25
RLE/GLP	0,5	51	2158	3,29	1,(	<u> </u>	732	,06	0,0	02	0,0	90
RLE/GLP	0	51	215{	3,29	1,(	<u> </u>		732	732,06	732,06 0,0	732,06 0,02	732,06 0,02 0,0

### Tabelle F8: Relative Lichteinheiten aus Versuchsreihe II

Luminometrische Doppelbestimmung der Relativen Licht Einheiten (RLE) von in vitro Kulturen und Pflanzen in Erde (*) nach einem Hitzestressversuch bei einer Sensitivität von 125. Die ermittelten Werte wurden auf einem µg des Gesamt löslichen Proteins (GLP) bezogen.

	SDIJE						SRI	AQ2			
					9 -					7 *	
	24°C	37°0	~	24°(	0	37	ပ	24°	ç	37°	U
M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2
RLE 1,4	7 1,11	0,61	0,71	188,70	187,53	1,65	2,50	16394,33	ı	6646,63	,
MM	1,29	1,26		188,	12	2,(	38	•		-	
GLP [µg]	82,80	124,8	30	168,8	30	176	,30	36,8	30	26,3	0
RLE/GLP	0,02	0,01		1,1		0,0	01	445	50	252,	72

						SRI/A	Q2					
		.4	22 *			- 31	-			- 32	2	
	24	ပ	37°	U	24'	ç	37°(	0	24°	, v	37°	U
	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2
RLE	40431,50	ı	220,03		2428,23	2547,13	222,57	217,78	2540,74	2532,77	9,89	10,59
MM			'		2487	7,68	220,5	18	2536	,76	10,2	14
GLP [µg]	34,	30	21,6	30	92,	30	117,5	30	67,5	30	96,5	0
RLE/GLP	1175	3,76	10,(	60	26,	95	1,86		37,6	39	0,1	

		SRI	/AQ2					<b>SRI/L</b>	uc43			
		•	33				5				1 *	
	24	ပ	37	ູ	24	ပ	37	ပ	24°(	0	37°	с С
	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2
RLE	4916,85	4948,68	421,89	428,15	180,49	177,84	213,60	218,00	12038,05		130,51	
MM	493	2,77	426	5,02	179	,16	215	,80	-		-	
GLP [µg]	77,	80	122	2,80	92,	30	139	,80	12038	,05	130	51
RLE/GLP	63,	40	3,	46	1,5	34	1,5	54	516,(	35	4,5	3

σ	
σ	
$\triangleleft$	
ш	

				SRI/L	uc43			
		1	22 *				9	
	24	ပံ	37	7°C	24	ç	37°	с С
	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2
RLE	84377,69		11780,42	ı	4548,16	5051,79	512,16	509,60
MM	1			I	4799	9,98	510,	88
GLP [µg]	30,	30	27	7,80	510	,88	100,	80
<b>RLE/GLP</b>	278/	4,74	42;	3,76	52,	00	5,0	7

### Tabelle F9: Relative Lichteinheiten aus Versuchsreihe III

Luminometrische Doppelbestimmung der Relativen Licht Einheiten (RLE) von in vitro Kulturen nach einem Hitzestressversuch bei einer Sensitivität von 125. Die ermittelten Werte wurden auf einem µg des Gesamt löslichen Proteins (GLP) bezogen.

-6         -32         -32         -33 $24^{\circ}C$ $37^{\circ}C$ $24^{\circ}C$ $37^{\circ}C$ $-33$ M1         M2         M2         M1         M2         M2         M1         M2         M2         M2         M1         M2         M2							SRI	AQ2					
			'	9			ლ '	2			1	33	
M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M2M1M3M1M3M3M1M3M3M3M3M3M3M3M3M3M3M3M3M3M3M3M3M3M3M3M3M3M3M3M3M3M3M3M3M3M3M3M3M3M3M3M3M3M3M3 <th></th> <th>24</th> <th>t°C</th> <th>37</th> <th>ပံ</th> <th>24</th> <th>ပ</th> <th>37</th> <th>ပံ</th> <th>24</th> <th>ő</th> <th>37</th> <th>ပ</th>		24	t°C	37	ပံ	24	ပ	37	ပံ	24	ő	37	ပ
RLE         591,14         594,92         6,73         7,33         1931,70         1939,06         932,66         945,57         4098,96         3925,14         1055,96         983,217           MW         593,03         7,03         1935,39         939,12         4012,05         1019,59         719,59           GLP [µg]         44,25         45,50         7,6,75         38,00         10,46         7,80           RLE/GLP         13,4         0,15         25,22         24,71         383,50         130,80		M1	M2	M	M2	M	M2	M1	M2	٩	M2	M	M2
MW         593,03         7,03         1935,39         939,12         4012,05         1019,59           GLP [µg]         44,25         45,50         76,75         38,00         10,46         7,80           RLE/GLP         13,4         0,15         25,22         24,71         383,50         130,80	RLE	591,14	594,92	6,73	7,33	1931,70	1939,06	932,66	945,57	4098,96	3925,14	1055,96	983,217
GLP [µg]         44,25         45,50         76,75         38,00         10,46         7,80           RLE/GLP         13,4         0,15         25,22         24,71         383,50         130,80	MW	59;	3,03	7,	03	193	5,39	936	9,12	4012	2,05	101	9,59
RLE/GLP 13,4 0,15 25,22 24,71 383,50 130,80	GLP [µg]	44	1,25	45.	,50	76,	75	38	00,	10,	46	7,6	30
	RLE/GLP	1	3,4	0,	15	25,	22	24	.71	383	,50	130	,80

				SRI/I	-uc43			
		1	2				36	
	24	ى د	37	ပံ	24	ပိ	37	ပံ
	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2
RLE	1289,80	1290,91	10,41	25,52	9471,13	8785,43	800,47	877,25
MW	129(	0,36	17,	,97	912	8,29	836	3,87
GLP [µg]	43,	00	78,	,00	50,	50	80	,50
RLE/GLP	30,	01	0,2	23	180	,76	10	,42

### Tabelle F10: Relative Lichteinheiten aus Versuchsreihe IV

Luminometrische Doppelbestimmung der Relativen Licht Einheiten (RLE) von *in vitro* Kulturen nach einem Hitzestressversuch bei einer Sensitivität von 125. Von jeder Pflanze wurde die RLE in zwei unabhängigen Blattproteinextrakten bestimmt. Die ermittelten Werte wurden auf einem µg des Gesamt löslichen Proteins (GLP) bezogen.

				SRI/A	Q2-6			
		24	°C			37	°C	
	Bla	tt 1	Bla	tt 2	Bla	tt 1	Bla	tt 2
	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2
RLE	424,07	399,94	248,47	242,32	2,04	2,21	5,03	2,93
MW	412	2,01	245	245,50 2,13		3,	99	
<b>GLP</b> [µg]	6,8	80	6,	21	6,2	21	5,	13
RLE/GLP	60,	,63	39	,51	0,	34	0,	78
MW		50	,07			0,	56	

				SRI/A	Q2-31			
		Bla	tt 1			Bla	tt 2	
	24	°C	37	°C	24	°C	37	°C
	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2
RLE	5173,75	4758,00	4198,00	4281,77	105,66	102,73	683,64	653,01
MW	496	5,88	423	9,89	104	4,2	668	3,33
<b>GLP</b> [μg]	10	,30	5,	38	1,:	30	9,	30
	400		700		00	46	74	00
RLE/GLP	482	2,30	/ 80	5,33	80,	,40	/ 1	,90
MW		635	5,35			76	,18	

				SRI/Lu	c43-26				
		Bla	tt 1			Bla	tt 2		
	24	°C	37	°C	24	°C	37	°C	
	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	
RLE	2894,53	2925,88	4290,96	4068,21	712,04	723,40	92,82	93,34	
MW	291	0,21	4179,59		717,73		93,	93,08	
<b>GLP</b> [μg]	5,46		6,96		8,80		1,21		
					00				
RLE/GLP	532	2,04	600	),37	01	,61	70	,02	
MW		566	5,61			79	,22		

# F11 Datenübersicht Molekulare Analyse und Proteinanalytik

Tabelle F11: Molekulare Analyse und Proteinanalytik der untersuchten SRI/47 und SRI/48 Linien

(n), Anzahl der unabhängigen Wiederholungen; +, positiv; n. gt., nicht getestet; n.d., nicht detektiert; unv., unverändert; red. reduziert; k.A., keine Aussage

V occeturite	Linie	T-DNA	DNA-	pat-	10 mg/	/L L-Pt	pat-mRN	A (qRT-PCR)	Pat-P	rotein	Pat-Al	ktivität	Pat-Gehalt
VOIISIUNI		(Km100)	PCR	Kopienzahl	24°C	37°C	24°C	37°C	24°C	37°C	24°C	37°C	[ng Pat / mg GLP]
pat47	9	+	+	n. gt.	+ (3)	+ (3)	n. gt.	n. gt.	+ (3)	unv. (3)	+ (3)	unv. (3)	29,46 ±8,27
	8	+	+	n. gt.	+ (3)	+ (3)	n. gt.	n. gt.	+ (3)	unv. (3)	+ (3)	unv. (3)	14,80 ±3,18
	18	+	+	n. gt.	+ (3)	+ (3)	+	red.	n.d. (3)	n.d. (3)	n.d. (3)	n.d. (3)	8,16
	22	+	+	n. gt.	+ (3)	+ (3)	n. gt.	n. gt.	+ (3)	unv. (3)	+ (3)	unv. (3)	18,95 ±12,59
	23	+	+	-	+ (3)	+ (3)	+	red.	+ (3)	red. (3)	+ (3)	red. (3)	29,43 ±6,23
	26	+	+	n. gt.	+ (3)	+ (3)	n. gt.	n. gt.	+ (3)	unv. (3)	+ (3)	unv. (3)	15,83 ±4,40
	35	+	+	n. gt.	+ (3)	+ (3)	n. gt.	n. gt.	+ (3)	unv. (3)	+ (3)	unv. (3)	n. gt.
	46	+	+	2	+ (3)	+ (3)	+	red.	+ (3)	red. (3)	+ (3)	red. (3)	n. gt.
	49	+	+	-	+ (3)	+ (3)	+	red.	+ (3)	red. (3)	+ (3)	red. (3)	n. gt.
	51	+	+	n. gt.	+ (3)	+ (3)	+ (2)	red. (2)	+ (3)	red. (3)	+ (3)	red. (3)	n. gt.
	54	+	+	-	+ (3)	+ (3)	+ (2)	red. (2)	+ (3)	unv. (3)	+ (3)	unv. (3)	n. gt.
	55	+	+	-	+ (3)	+ (3)	n. gt.	n. gt.	+ (3)	unv. (3)	+ (3)	unv. (3)	n. gt.
	57	+	+	-	+ (3)	+ (3)	n. gt.	n. gt.	+ (3)	unv. (3)	+ (3)	unv. (3)	n. gt.
	60	+	+	2	+ (3)	+ (3)	+	k. A.	+ (3)	unv. (3)	+ (3)	unv. (3)	n. gt.
	62	+	+	-	+ (3)	+ (3)	n. gt.	n. gt.	+ (3)	unv. (3)	+ (3)	unv. (3)	n. gt.
	63	+	+	-	+ (3)	+ (3)	n. gt.	n. gt.	+ (3)	unv. (3)	+ (3)	unv. (3)	n. gt.
	77	+	+	-	+ (3)	+ (3)	n. gt.	n. gt.	+ (3)	unv. (3)	+ (3)	unv. (3)	n. gt.
pat48	5	+	+	n. gt.	+ (3)	+ (3)	n. gt.	n. gt.	+ (3)	red. (3)	+ (3)	red. (3)	32,86 ±9,00
	9	+	+	n. gt.	+ (3)	+ (3)	n. gt.	n. gt.	+ (3)	unv. (3)	+ (3)	unv. (3)	31,99 ±8,42

143

Konstrukt	Linie	T-DNA	DNA-	pat-	10 mg/	'L L-Pt	pat-mRN.	A (qRT-PCR)	Pat-P	rotein	Pat-Al	<pre>ctivität</pre>	Pat-Gehalt
		(Km100)	PCR	Kopienzahl	24°C	37°C	24°C	37°C	24°C	37°C	24°C	37°C	[ng Pat / mg GLP]
pat48	14	+	+	n. gt.	+ (3)	+ (3)	n. gt.	n. gt.	+ (3)	unv. (3)	+ (3)	unv. (3)	33,71 ±7,57
ı	19	+	+	n. gt.	+ (3)	+ (3)	n. gt.	n. gt.	+ (3)	unv. (3)	+ (3)	unv. (3)	36,71 ±7,80
I	20	+	+	n. gt.	+ (3)	+ (3)	n. gt.	n. gt.	+ (3)	unv. (3)	+ (3)	unv. (3)	13,57 ±2,98
I	21	+	+	n. gt.	+ (3)	+ (3)	n. gt.	n. gt.	+ (3)	unv. (3)	+ (3)	unv. (3)	12,05 ±3,19
L	22	+	+	n. gt.	+ (3)	+ (3)	n. gt.	n. gt.	+ (3)	unv. (3)	+ (3)	unv. (3)	20,44 ±4,97
L	30	+	+	-	+ (3)	+ (3)	+	unv.	+ (3)	red. (3)	+ (3)	n.d. (3)	1,04
1	39	+	+	ę	+ (3)	+ (3)	+ (2)	red. (2)	+ (3)	n.d. (3)	+ (3)	n.d. (3)	n.gt.
1	42	+	+	-	+ (3)	+ (3)	n. gt.	n. gt.	+ (3)	unv. (3)	+ (3)	unv. (3)	n.gt.
L	86	+	+	2	+ (3)	+ (3)	n. gt.	n. gt.	+ (3)	unv. (3)	+ (3)	unv. (3)	n.gt.
1	93	+	+	2	+ (3)	+ (3)	n. gt.	n. gt.	+ (3)	unv. (3)	+ (3)	unv. (3)	n.gt.
I	95	+	+	2	+ (3)	+ (3)	+	unv.	+ (3)	unv. (3)	+ (3)	unv. (3)	n.gt.
I	97	+	+	n. gt.	+ (3)	+ (3)	+	red.	+ (3)	unv. (3)	+ (3)	unv. (3)	n. gt.
<u> </u>	101	+	+	-	+ (3)	+ (3)	n. gt.	n. gt.	+ (3)	unv. (3)	+ (3)	unv. (3)	n. gt.

### Tabelle F12: Molekulare Analyse und Proteinanalytik der untersuchten SRI/AQ2 und SRI/Luc43 Linien

(n), Anzahl der unabhängigen Wiederholungen; +, positiv; n. gt., nicht getestet; red. reduziert; k.A., keine Aussage

		T-DNA		<i>luc</i> -mRNA	Pat-Al	ktivität
Konstrukt	Linie	(Km100)	DNA-PCR	(RT-PCR)	24°C	37°C
AQ2	2	+	+	+	+ (1)	n. gt.
	6	+	+	+	+ (4)	red. (3)
	8	+	+	+	+ (1)	n. gt.
	17	+	+	+	+ (2)	red. (1)
	22	+	+	+	+ (2)	red. (1)
	26	+	+	+	- (1)	n. gt.
	31	+	+	+	+ (3)	red. (2)
	32	+	+	+	+ (3)	red. (2)
	33	+	+	+	+ (3)	red. (2)
luc43	5	+	+	+	+ (3)	k. A. (2)
	11	+	+	+	+ (2)	red. (1)
	14	+	+	+	- (1)	n. gt.
	15	+	+	+	- (1)	n. gt.
	22	+	+	+	+ (2)	red. (1)
	23	+	+	+	- (1)	n. gt.
	26	+	+	+	+ (4)	red. (3)
	36	+	+	+	- (1)	n. gt.
	37	+	+	+	- (1)	n. gt.

### Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir geholfen haben, diese Dissertation zu erstellen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Inge Broer für die Bereitstellung des Themas, die vielen anregenden und ergiebigen Diskussionen, die bei der Entwicklung der hier vorliegenden Arbeit sehr geholfen haben, das Korrekturlesen dieser Arbeit und die mir gewährte sehr gute Unterstützung und Betreuung.

Weiterhin möchte ich mich ganz lieb bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Agrobiotechnologie für die freundliche Zusammenarbeit und Unterstützung sowie das angenehme Arbeitsklima bedanken.

Vor allem möchte ich mich bei den Mitgliedern der "Hitze-Gruppe" Jana Huckauf und Nadine Knöchel bedanken. Mein besonderer Dank gilt dabei Jana, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand, in schlechten Zeiten immer aufmunternde Worte fand und in den Jahren der Zusammenarbeit mir auch ein guter Freund geworden ist. Bei Nadine möchte ich mich für die konstruktiven Diskussionen bedanken, die ebenfalls bei der Entwicklung der hier vorliegenden Arbeit geholfen haben. Weiter möchte ich mich bei Christoph Unger für die vielen spannenden Diskussionen, die Unterstützung und das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken. Mein weiterer Dank gilt Kerstin Thoss und Marko Kranz für die Unterstützung bei den molekularbiologischen Analysen sowie Sonja Konopka für die Hilfe im Gewächshaus. Für die vielen anregenden Diskussionen bei Kaffee und Kuchen möchte ich mich bei Heike Mikschofsky, Maja Hühns, Cornelia Ganz, Carla Struzyna-Schulze, Tina Hausmann, Patricia Horn und Henrik Nausch bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei der Arbeitsgruppe um Frau Prof. Christiane Gatz, die mir bei den Gelshift-Analysen mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, dir mir stets hilfreich zur Seite Stand und mich in meiner Arbeit unterstützte.

Bei meinen Freunden möchte ich mich für die Abwechslung in den wenigen freien Stunden bedanken.

Allen nicht genannten Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, danke ich ebenfalls recht herzlich.

### Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet habe und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, den 20. April 2011

Tobias Latzkow