

# Protokoll

Spezialpraktikum Genetik

04.05.09 – 18.05.09

Christoph Schwörer

# Inhaltsverzeichnis

## Inhalt

1.	Einleitung.....	3
1.2	Allgemein.....	3
1.3	Beschreibung der Versuche.....	3
1.2.1	Versuch 1: Phänotypisierung von GBF1 knock-out Pflanzen.....	3
1.2.2	Versuch 2: Promotor CAT2: GUS Reportergenanalysen.....	3
1.2.3	Versuch 3: Expressionsanalysen in gbf1 KO Pflanzen .....	3
1.2.4	Versuch 4: Klonierung .....	4
2.	Materialien und Methoden .....	5
2.1	Versuch 1: gbf1 knock out Pflanzen Typisierung.....	5
2.1.1	Versuchsdurchführung .....	5
2.2	Versuch 2: Promotor CAT2: GUS Reportergenanalysen.....	5
2.2.1	Versuchsdurchführung .....	5
2.2.2	Verwendete Mittel .....	7
2.3	Versuch 3 Expressionsanalyse in gbf1 KO Pflanzen.....	8
2.3.1	Versuchsdurchführung .....	8
2.3.2	Verwendete Materialien .....	9
2.4	Versuch 4: Klonierung .....	10
2.4.1	Versuchsdurchführung .....	10
2.4.2	Verwendete Materialien .....	10
3	Ergebnisse.....	12
3.1	Versuch 1: gbf1 knock out Pflanzen Typisierung.....	12
3.2	Versuch 2: Promotor CAT2: GUS Reportergenanalysen.....	25
3.3	Versuch 3: Expressionsanalyse in gbf1 KO Pflanzen .....	28
3.4	Klonierung .....	34
4	Diskussion.....	35
4.1	GBP1 Pflanzen KO Typisierung .....	35
4.2	Versuch 2: Promotor CAT2: GUS Reportergenanalysen.....	35
4.3	Versuch 3: Expressionsanalyse in gbf1 KO Pflanzen .....	35
4.4	Versuch 4: Klonierung .....	35

# 1. Einleitung

## 1.2 Allgemein

Das Thema des Spezialpraktikums Genetik war die Seneszenz bei Pflanzen. Also die Alterserscheinungen wie das Absterben alter Blätter und das Bilden von Knospen und Früchten. Gesteuert werden diese Prozesse genetisch aber auch in Abhängigkeit von der Energiebilanz der Pflanze. Sie sind zudem stark abhängig von Umweltfaktoren wie Hitze, Wassermangel etc. Untersuchungen besagen, dass beim einsetzen der Seneszenz auch der Spiegel der Radikale, in diesem Fall  $H_2O_2$  stark ansteigt. Eine der Katalasen welche für den Abbau von Radikalen zuständig ist, ist CAT2, welches durch ein Auftreten von GBF1 (G-box binding factor 1) nach unten reguliert wird. Zudem liegen Informationen vor welche zeigen, dass CAT2 in älteren pflanzen stark nach unten reguliert wird. Mit den folgenden Versuchen soll nun ein Zusammenhang zwischen der Expression von GBF1 in älteren Pflanzen und deren Seneszenzerscheinungen untersucht werden. Hierzu wurden nun 3 Pflanzereihen verwendet eine Reihe Col0 Wildtyp Arabidopsis Pflanzen und je eine Reihe Ex und Int Pflanzen bei denen das Gen für GBF1 jeweils im Extron oder Intron ausgeschaltet wurde.

## 1.3 Beschreibung der Versuche

### 1.2.1 Versuch 1: Phänotypisierung von GBF1 knock-out Pflanzen

Dieser Versuch bestand aus 2 Teilen. Zum einen sollten die Pflanzen in ihrem Wachstum beobachtet und jede Woche fotografiert werden, zudem sollte ihr Chlorophyllgehalt bestimmt werden. Zum anderen sollte eine Auswahl der Pflanzen mit Abscicinsäure besprüht werden welche die Wirkung von Phytohormonen in Pflanzen unterdrückt und einen natürlichen Wachstumsinhibitor darstellt. Diese sollten dann wiederum im Vergleich zu den Wildtyppflanzen in ihrem Wachstum beobachtet werden.

### 1.2.2 Versuch 2: Promotor CAT2: GUS Reporter genanalysen

Bei diesem Versuch sollten die Protoplasten von transgenen Pcat2:GUS Pflanzen, Arabidopsis thaliana, isoliert werden. Diese Protoplasten sollten anschließend zum einen mit einem leeren 35 S Vektor (PY01) und zum anderen mit einem 35 S:GBF 1 Vektor transformiert werden. Da das Reportergen GUS hinter einem CAT2 Promotor bei Zugabe von GBF1 reduziert exprimiert wird, wurde bei Verwendung des 35S Vektors auch eine Reduktion der GUS Aktivität im Vergleich zur Verwendung des PY01 Vektors erwartet.

### 1.2.3 Versuch 3: Expressionsanalysen in gbf1 KO Pflanzen

Bei diesem Versuch sollten wöchentlich Blattproben der Pflanzen entnommen werden um daraus RNA zu isolieren. Die isolierte RNA sollte dann aufgereinigt und zu cDNA umgeschrieben werden. Mit der cDNA sollte dann eine RT-PCR durchgeführt werden. Zur Kontrolle wurden hierbei Actin Primer verwendet und für den von GBF1 die vorliegenden

GBF1 Primer. Erwartet wurde ein Nachweis von GBF1 in den Col0 Pflanzen in den anderen beiden Reihen wurde kein GBF1 erwartet.

#### **1.2.4 Versuch 4: Klonierung**

Bei diesem Versuch sollte das sich in einem Blueskriptvektor befindliche gbf2 Gen in einen cf203 GFP-Vektor kloniert werden. Dafür sollte der Vektor mit designten Primern mittels PCR amplifiziert und das PCR-Produkt anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt werden. Um das Amplifikat aufzureinigen und den Blueskript-Vektor zu entfernen sollte dann eine Gelextraktion durchgeführt werden. Anschließend sollte sowohl das Amplifikat, als auch der cf203 GFP-Vektor einem Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen KpnI und BamHI unterzogen und ligiert werden. Nach der darauffolgenden Transformation in kompetente E. coli Bakterien sollte zuerst eine Kolonien-PCR, dann eine Plasmid-Mini-Prep durchgeführt werden.

## **2. Materialien und Methoden**

### **2.1 Versuch 1: gbf1 knock out Pflanzen Typisierung**

#### **2.1.1 Versuchsdurchführung**

Die Pflanzen wurden sowohl mit einer Digitalkamera als auch mit einem Flachbettscanner wöchentlich aufgenommen. Hierbei wurde jeweils die ganze Pflanze wie auch jeweils 3 junge, mittelalte und alte Blätter der ersten Rosette gescannt. Zudem wurde Pflanzenmaterial zur späteren Verwendung eingefroren.

Anschließend wurde die Chlorophyllkonzentration der Pflanzen gemessen. Hierzu wurde Pflanzenmaterial in 0,2ml 25mM Kalium Phosphat Puffer (pH 7,0), welcher 2mM EDTA enthielt homogenisiert. Danach wurde 0,8 ml Aceton hinzugegeben und für 1h bei Raumtemperatur stark geschüttelt. Die Lösung wurde anschließend bei 14000 u/min für 30 min zentrifugiert. Der Chlorophyllgehalt des Überstandes wurde danach im Photometer gemessen. Aus der Menge an Pflanzenmaterial und der gemessenen Menge an Chlorophyll wurde nun die Chlorophyllkonzentration errechnet.

Zusätzlich wurden über die komplette Zeit des Praktikums 9 Pflanzen (3 von jeder Pflanzenreihe aus Col0 Int und Ex) in Intervallen mit Abscisinsäure besprüht. Gleichzeitig wurden 9 Pflanzen zur Kontrolle nicht besprüht unter gleichen Bedingungen gehalten.

### **2.2 Versuch 2: Promotor CAT2: GUS Reportergenanalysen**

#### **2.2.1 Versuchsdurchführung**

Von den Verwendeten Pflanzen wurden beim ersten Versuchsdurchlauf 40 mittelgroße und beim 2. Durchlauf 40 große Blätter mit einer Rasierklinge in kleine (ca. 1mm) breite Streifen geschnitten zusammen mit 20 ml Enzymlösung auf eine Petrischale gegeben. Beim ersten Versuchsdurchlauf wurde nun 1 Stunde verdaut, anschließend Vakuuminfiltiert und schließlich 2 weitere Stunden verdaut. Beim zweiten Durchlauf wurde zuerst Vakuuminfiltiert und anschließend für 3h verdaut. Die Vakuuminfiltration lief für 20 min bei 200 mBar. Nun wurde die Lösung mit einem 45µm Filter filtriert und die filtrierte Lösung für 2 min in einem Falcon Tube bei 2500 u\min zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin abpipetiert und das verbleibende Protoplastenpallet in 10ml eiskalter W5 Lösung resuspendiert. Die Lösung wurde für 30 min auf Eis gehalten und anschließend abermals für 2 min bei 2500 u\min abzentrifugiert und in 1,5ml MMg gelöst.

Zur PEG Transfektion wurden 200µl der gelösten Protoplasten zusammen mit 10µg DNA in ein Eppendorf Gefäß umpipetiert und anschließend 220µl PEG Lösung hinzugegeben. Diese Lösung wurde anschließend bei 25°C für 30min inkubiert und danach mit 2ml W5 Lösung versetzt um den Transfektionsprozess anzuhalten. Danach wurde für 2min bei 100g (1500 u\min) abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Lösung wurde nun mit 1ml W5

Puffer versetzt und für 20h im Dunkeln über Nacht inkubiert. Es wurden jeweils 3 Proben mit dem PY01 Vektor, 3 mit dem P35S Vektor sowie eine mit dem CF 203 Vektor angefertigt.

Die inkubierten Lösungen wurden nun für 2 Tests verwendet, ein GUS assay und eine protein quantifiaktion. Die Vorbereitung war hierfür bei beiden Tests gleich. Die Lösung wurde mit 10ml fall buffer versetzt und bei 400g für 5min zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Die Protoplasten wurden nun in ein 1.5ml Eppendorfgefäß überführt und nochmals bei 10000g für 10 sec zentrifugiert, Der Überstand wurde abermals verworfen. Die Protoplasten wurden nun mit 36µl protein extraction buffer und 7µl protease inhibitor gelöst und im Eisbad gemörsert. Die Lösung wurde nun bei 14000 u\min für 10 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt.

Bei der protein quantification wurde nun 5µl Lösung mit 995µl Bradford 1:5 in einer Küvette versetzt und 5min ruhen gelassen. Zudem wurde ein blank mit 995µl Bradford 1:5 und 5µl protein extraction buffer / protease inhibitor Gemisch erstellt. Die vorbereiteten Küvetten wurden nun im Photometer bei einer Wellenlänge von 595nm gemessen.

Zur GUS quantification wurden 2 Messreihen erstellt. Bei beiden wurde 90µl assay buffer mit 10µl Probe versetzt. Anschließend wurde eine Messreihe 60 min bei 37°C inkubiert und danach mit 900µl 0,2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> versetzt um die Reaktion zu stoppen. Die andere Messreihe wurde nicht inkubiert. Zudem wurde wiederum ein blank mit 90 µl Assay buffer 10 µl protein extraction buffer und 900 µl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> erstellt. Von beiden Messreihen und dem blank wurden nun 1µl auf eine Microtiterplatte pippetiert und im Plattenphotometer die Extinkiton bei 355 nm und die Emission 460 bei nm gemessen.

## 2.2.2 Verwendete Mittel

### W5 Lösung (1l):

154 mM NaCl (8,900g)

125mM CaCl<sub>2</sub> (13,873g)

5mM KCl (0,372g)

5mM Glukose (0,990g)

### MMg Lösung (0,5l):

15mM MgCl<sub>2</sub> • 6H<sub>2</sub>O (1,524g)

0,1% MES (0,500g)

0,5 M Mannitol (46,042g)

pH 5,8

autoklaviert

### PEG/Ca Lösung (100ml):

40%PEG 4000 (40g)

0,4M Mannitol (7,285g)

0,1M Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> • 4H<sub>2</sub>O (2,361g)

pH 8-9 mit 1-2 Tropfen KOH

autoklaviert

gefroren aufbewahren

### Essay Buffer:

10ml GUS puffer

7 µl Mercaptoethanol

4mg 4MUG (gelöst in 10 µl DMSO)

### Fall Buffer (500ml):

0,5M Mannitol (45,5 g)

15mM MgCl<sub>2</sub> (3,75 ml 2M MgCl<sub>2</sub>)

0,1% MES (0,5g)

pH 5,8

sterile filtrate

### Extraction Buffer (10ml):

50mM Tris pH 7,5 (0,5ml 1M Tris)

100mM NaCl (1ml 1M NaCl)

0,1% Triton X-100 (10µl Triton 100-X)

Protease Inhibitor (7x)

### GUS Buffer (500ml):

2,05g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

1,27g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

10ml 0,5M EDTA

0,5ml Triton X-100

0,5g N-Lauroylsarcosine Sodium Salz (=0,1%)

## 2.3 Versuch 3 Expressionsanalyse in gbf1 KO Pflanzen

### 2.3.1 Versuchsdurchführung

RNA Aufbereitung: Zur Aufarbeitung der RNA wurde folgendermaßen vorgegangen. Zu Beginn wurde das gefrorene Blattmaterial in, mit flüssigem Stickstoff gekühlten, Reibeschalen gemörsert und mit 1ml Cell-Lysis-Lösung in ein 2ml Eppendorfgefäß überführt und homogenisiert. Zusätzlich wurden 500 µl Protein-DNA-Precipitation Lösung gegeben und nach 10maligem invertieren für 10min ins Eisbad gestellt. Schließlich wurden die Proben für 10min im Kühlraum bei 14000 u\min zentrifugiert.

1ml des Überstandes wurde nun in ein neues 2ml Eppendorfgefäß überführt, mit 1ml 100% Isopropanol versetzt und nach mehrmaligem invertieren für 5min bei max u\min im Kühlraum zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen das Eppendorfgefäß auf einem Filterpapier abgetupft. Nun wurde der restliche 1ml Überstand der Proben zusammen mit 1ml 100% Isopropanol in das bereits verwendete Eppendorfgefäß überführt und wiederum für 5min bei max u\min im Kühlraum zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das verbleibende Pellet mit 1ml 70% EtOH mehrmals invertiert und dann 2min bei max u\min im Kühlraum zentrifugiert. Das verbleibende EtOH wurde verworfen und das zurückbleibende Pellet auf dem Heizblock bei 40°C getrocknet.

Anschließend wurde die verbleibende DNA verdaut. Um dies zu erreichen wurde das Pellet in 6 µl 10x Puffer +MgCL gelöst, mit 4 µl DNaseI versetzt und für 30min bei 37°C auf den Heizblock gelegt. Nun wurde 1µl EDTA 25mM hinzugefügt und für 10min bei 65°C auf dem Heizblock denaturiert. Abschließend wurde jeweils 1µl der Lösung auf dem NanoDrop Gerät gemessen um die RNA Konzentration zu bestimmen und die Proben auf Ein Gel aufgetragen um zu prüfen in welchen Proben die gewünschte RNA zu finden war. Als positivkontrolle und marker wurde hierbei jeweils der Lamda DNA/Hind III Marker, 2 verwendet.

cDNA Umwandlung: Um nun die RNA in cDNA umzuwandeln wurde ein iScript Reaction Mix verwendet. Hierbei wurden 4µl 5x iScript Reaction Mix, 1µl reverser Transcriptase und eine Menge X (wobei  $X = 1\mu\text{g}/\text{RNA Konzentration der entsprechenden Probe}$ ) zusammengebracht und mit autoklaviertem auf 20µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Proben wurden nun für jeweils 5min bei 25°C, 30min bei 42°C und 5min bei 85°C auf dem Heizblock erhitzt.

Semi-quantitative RT PCR: zur Amplifikation der cDNA wurde die DNA 1:10 verdünnt. Anschließend wurden jeweils 2 Versuchsreihen durchgeführt. Jeweils eine mit Actin und eine mit GBF1 Primern. Hierzu wurde jeweils ein MM (s.u.) angesetzt wobei die jeweiligen primer verwendet wurden. Wichtig hierbei war, um eine Gleichverteilung der DNA zu gewährleisten, dass der MM bis auf die Primer jeweils für die Actin und die GBF1 Probe gemeinsam angesetzt wurde dann halbiert und mit den entsprechenden Primern versetzt. Die Proben wurden dann durch das PCR Programm laufen gelassen bei 60°C Annealingtemperatur für 30sec und 72°C Elongationstemperatur für 30sec für insgesamt 25 Zyklen.

Gelelektrophorese: Abschließend wurde jeweils 5µl Probe mit 0,5µl Pufferlösung versetzt und auf ein Agarosegel aufgetragen. An dieses wurde 30min eine Spannung von 100Volt angelegt.



### 2.3.2 Verwendete Materialien

#### MasterMix [MM] (10µl)

1 µl 10xPuffer (high specific)

0,4 µl dNTPs (10mM)

0,1 µl Control TAQ (incl. Polymerase)

0,5 µl verdünnte cDNA (bei Durchlauf 2 wurden 5µl verwendet)

1 µl Primer Forward

1 µl Primer Backward

5,9 µl H<sub>2</sub>O (Bei Durchlauf 2 wurden 1,4 µl verwendet)

#### Agarosegel:

30ml 1x TAE Puffer und 0,3g Agarose zusammen aufkochen

1µl Ethidiumbromid (1%)

Gel gießen und mit 1xTAE Puffer auffüllen.(170ml)

## 2.4 Versuch 4: Klonierung

### 2.4.1 Versuchsdurchführung

Am Anfang wurde die vorhandene GBF2 Sequenz durch eine PCR amplifiziert. Hierbei wurde der 50µl Ansatz(siehe 2.4.2) in folgendem PCR Programm eingesetzt: 2 min bei 95°C, 30 sec bei 95°C, 30 sec Annealing, 1 min Elongation bei 72°C und 7min bei 72°C.

Die DNA wurde nun in 10µl H<sub>2</sub>O gefällt und zusammen mit 1µl loading buffer für 30 min bei 100V auf ein Agarosegel aufgetragen. Anschließend wurde das gewünschte Fragment mit dem QIAquick Gel Extraction Kit Protokoll aus dem Gel geschnitten. Nun wurde zum einen der cf203 Vector und das Template in einem 100µl Ansatz für 3h bei 37°C verdaut und anschließend die Ligation des Vectors und des geschnittenen Templates in einem 10µl Ansatz üernacht bei 4°C durchgeführt.

Zur Transformation wurden nun zuerst 50µl kompetente Zellen und 5µl Ligation für 20 min auf Eis gestellt. Um die Zellen aufnahmefähig für Plasmide zu machen wurden sie 1 Minute 42 C ausgesetzt (Hitzeschock). Nun wurden 250µl LB Medium hinzugegeben und für 1h schüttelnd bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die gesamte Probe auf einer LB<sub>spec</sub> Platte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Insgesamt wurden je Platte 16 Kolonien kepickt und in je 7µl H<sub>2</sub>O in einem PCR Tube gelöst. Zusätzlich wurden die Pippettenspitzen nach jedem Lösten auf einer frischen LB<sub>spec</sub> Platte ausgestrichen. Die gelösten Proben wurden nun zusammen mit einem Mastermix in ein PCR Gerät gegeben.

### 2.4.2 Verwendete Materialien

#### Agarosegel:

30ml 1x TAE Puffer und 0,3g Agarose zusammen aufkochen  
1µl Ethidiumbromid  
Gel gießen und mit 1xTAE Puffer auffüllen.(170ml)

#### 50µl Ansatz:

5µl 10X Puffer  
0,5µl LA Taq (proofreading)  
2µl Template  
2µl dNTP  
2,5µl Primer Forward  
2,5µl Primer Reverse  
35,5µl H<sub>2</sub>O

#### 100µl Ansatz:

50µl Gelextrakt  
10µl 10x Tango/KpnI Puffer  
5µl KpnI  
5µl BamHI

30µl H<sub>2</sub>O

10µl Ansatz:

1µl 10x Puffer

1µl Ligase

1µl verdauter Vektor

7µl Gelextrakt

Mastermix:

0,1µl Polymerase

1 µl 10 x Puffer

0,4 µl dNTPs

0,7 µl Primer Forward

0,7 µl Primer Reverse

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Versuch 1: gbf1 knock out Pflanzen Typisierung



Col0 4W von oben



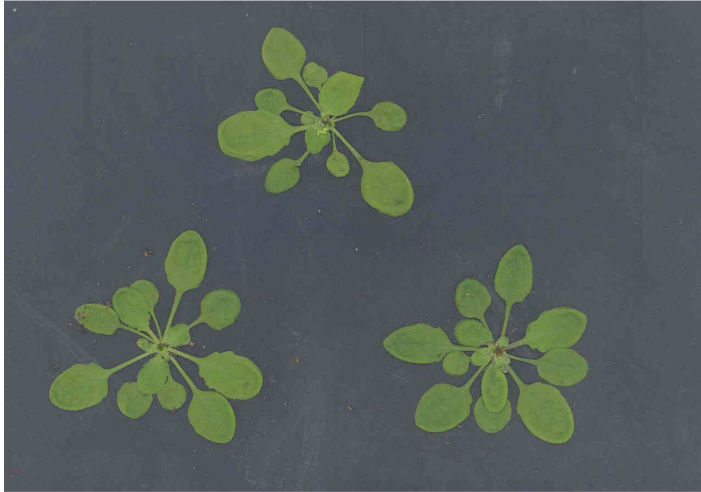
Col0 4W von unten



Ex 4w von oben



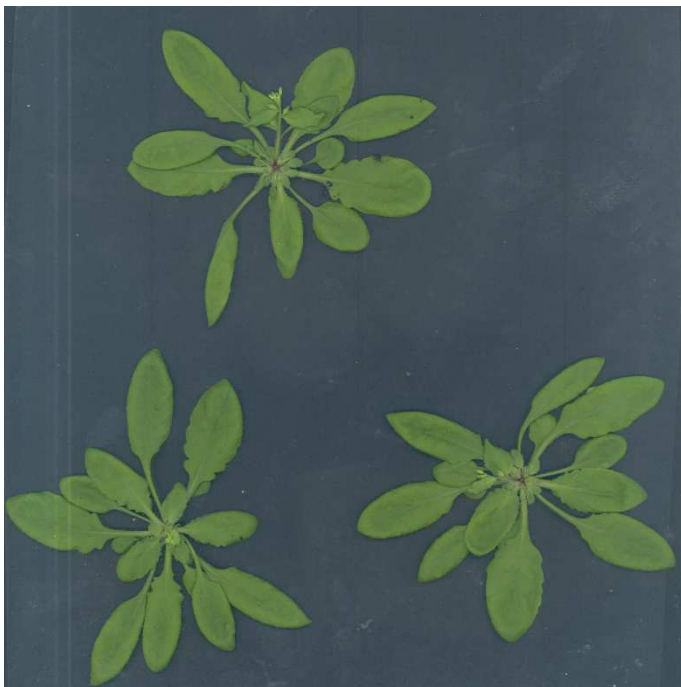
Ex 4W von unten



Int 4W von oben



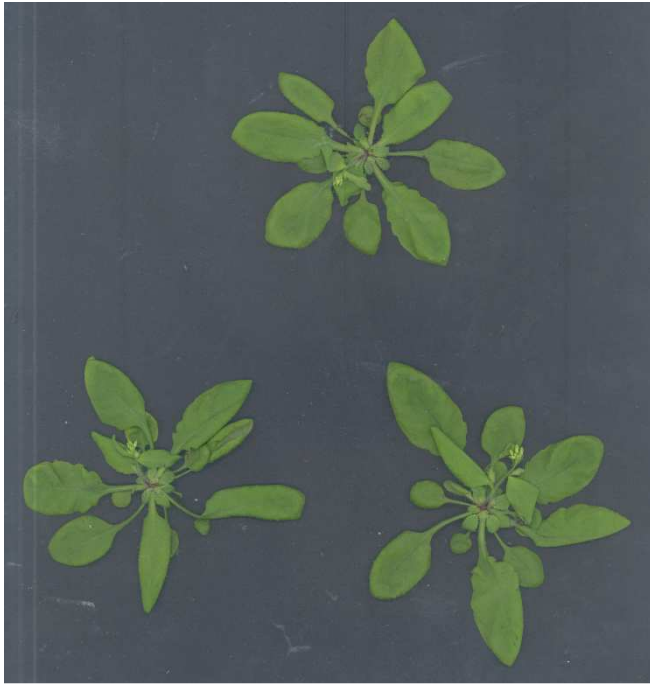
Int 4W von unten



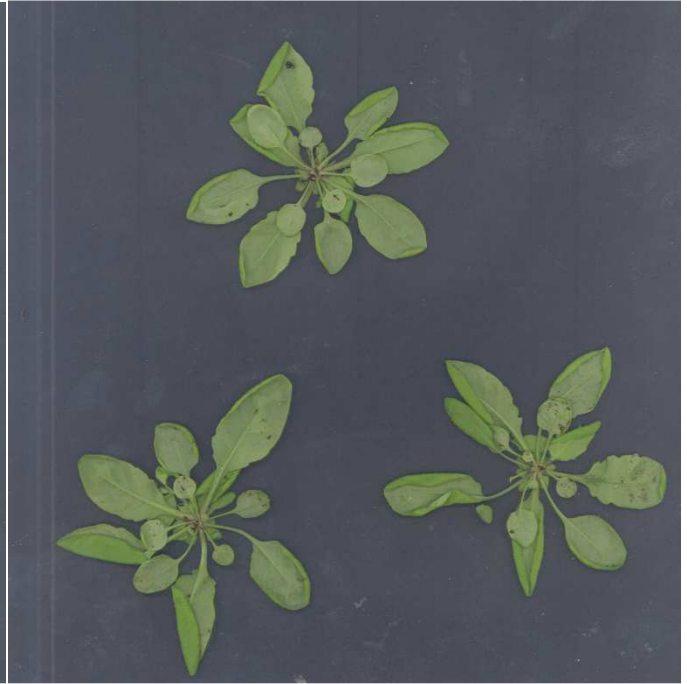
Col0 5W von oben



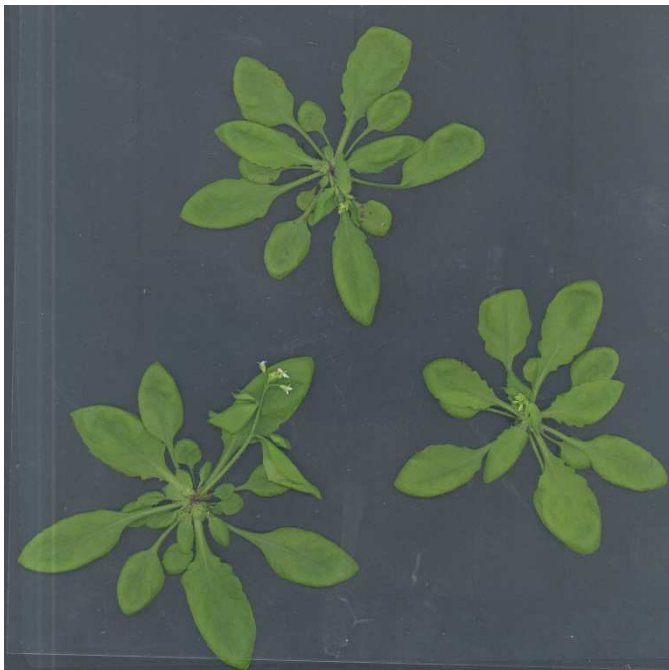
Col0 5w von unten



Ex 5W von oben



Ex 5W von unten

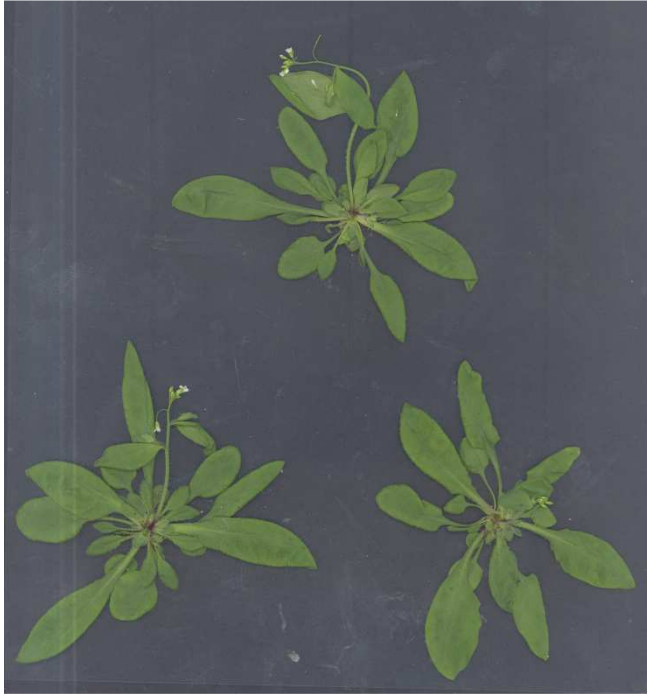


Int 5W von oben



Int 5W von unten





Col0 6W von oben



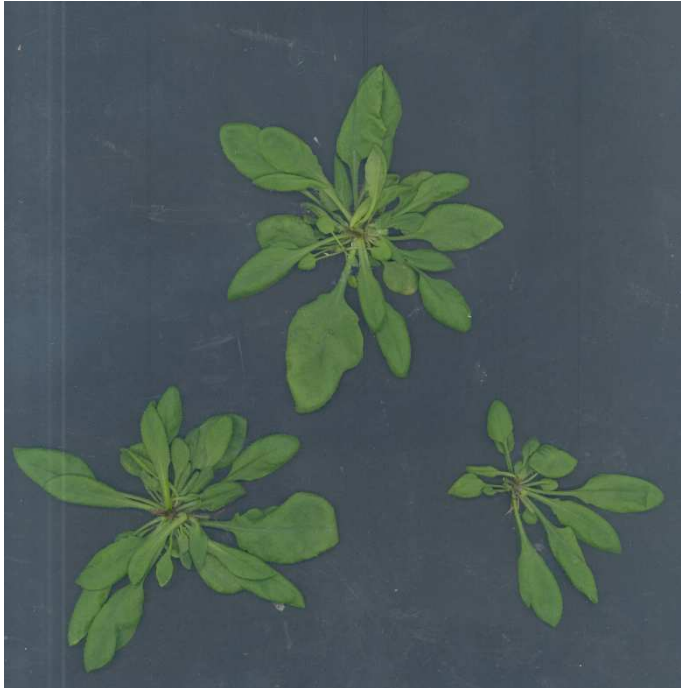
Col0 6W von unten



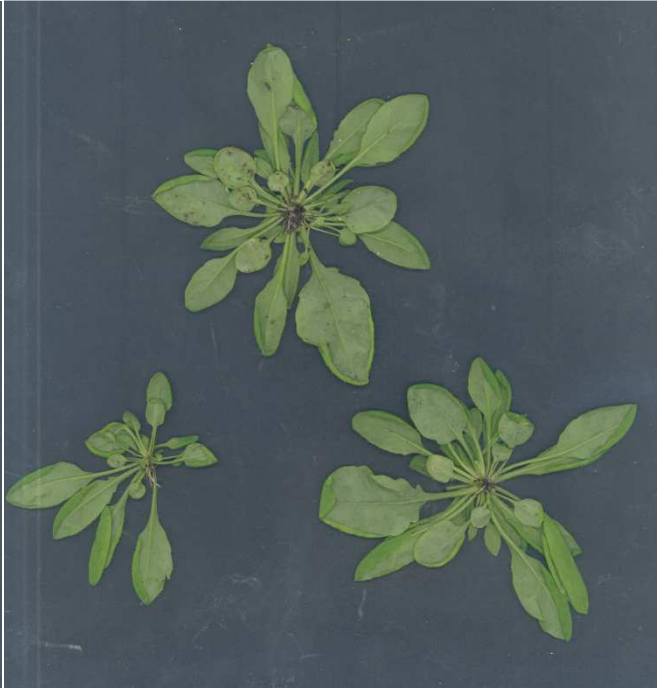
Col0 6W einzelne Blätter von oben



Col0 6W einzelne Blätter von unten



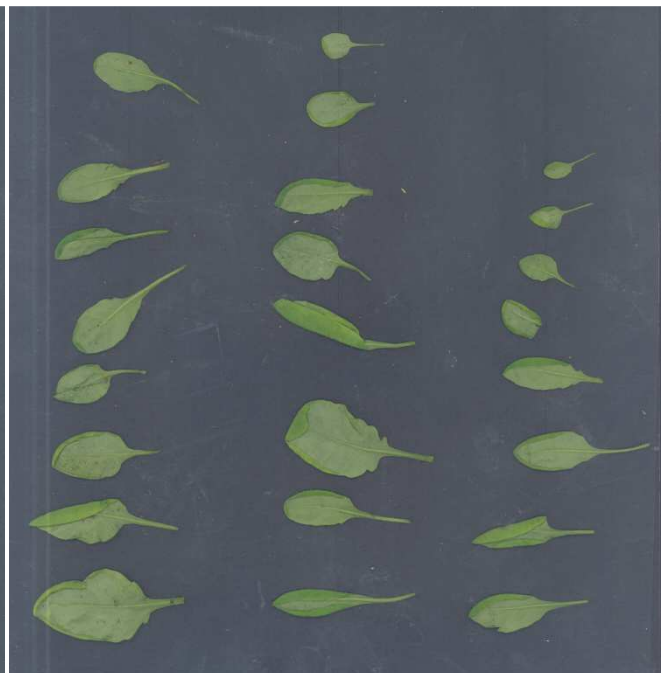
Ex 6W von oben



Ex 6W von unten

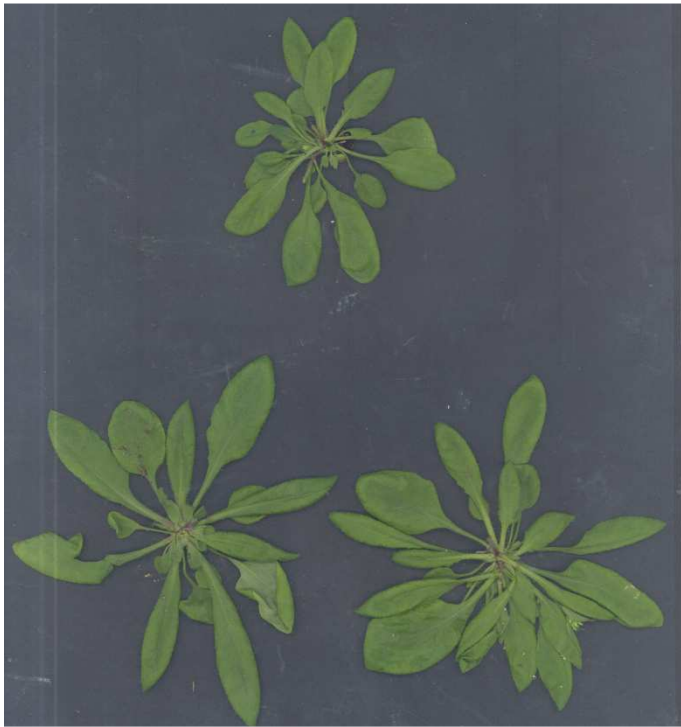


Ex 6W einzelne Blätter von oben

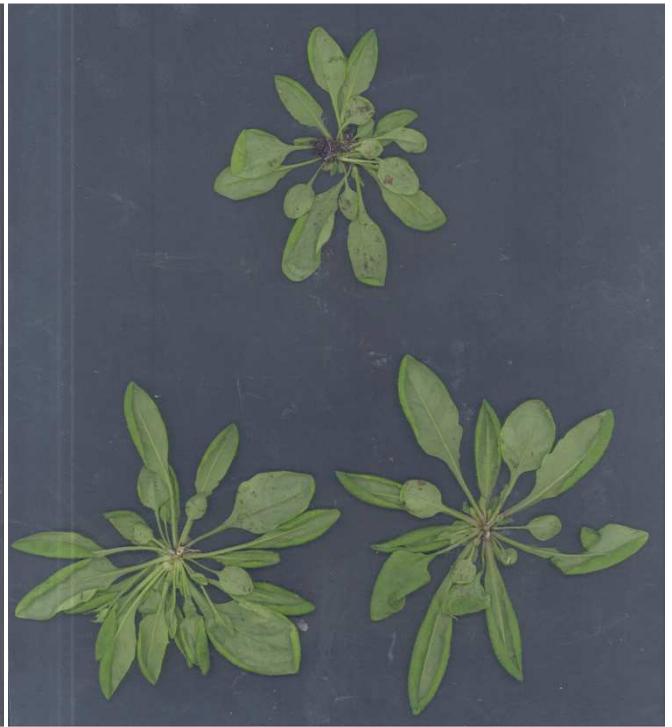


Ex 6W einzelne Blätter von unten

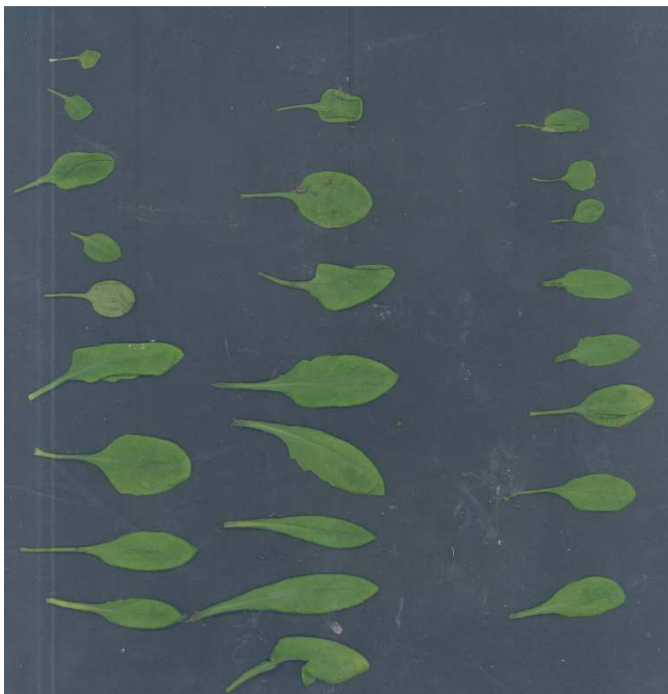




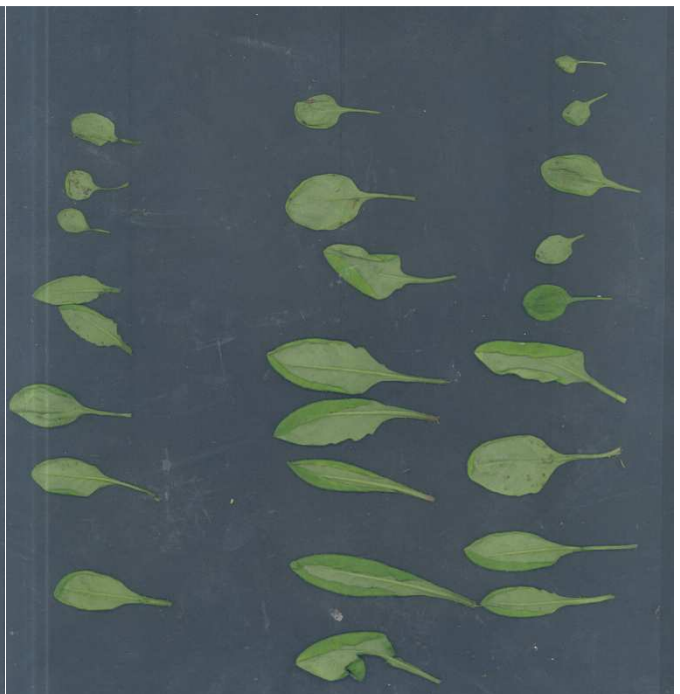
Int 6W von oben



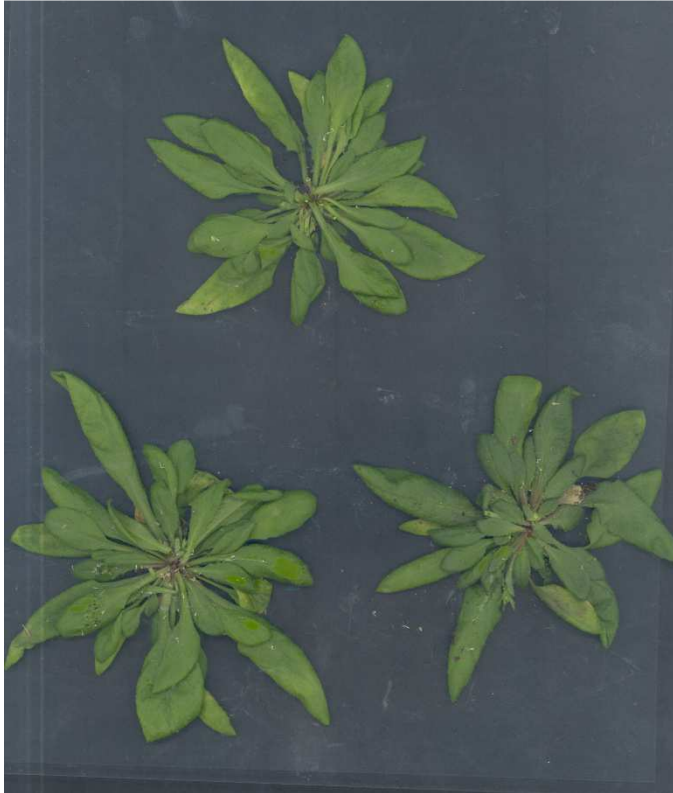
Int 6W von unten



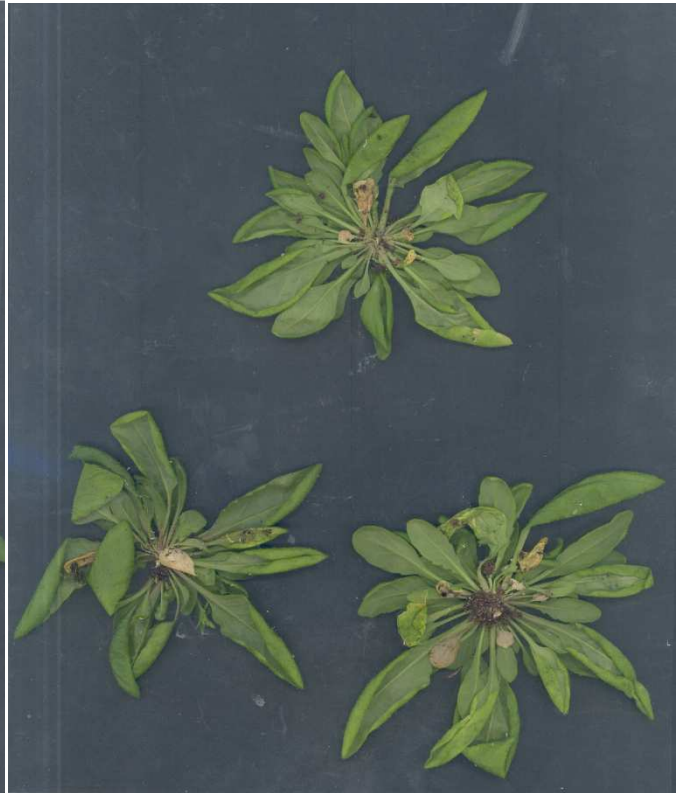
Int 6W einzelne Blätter von oben



Int 6W einzelne Blätter von oben



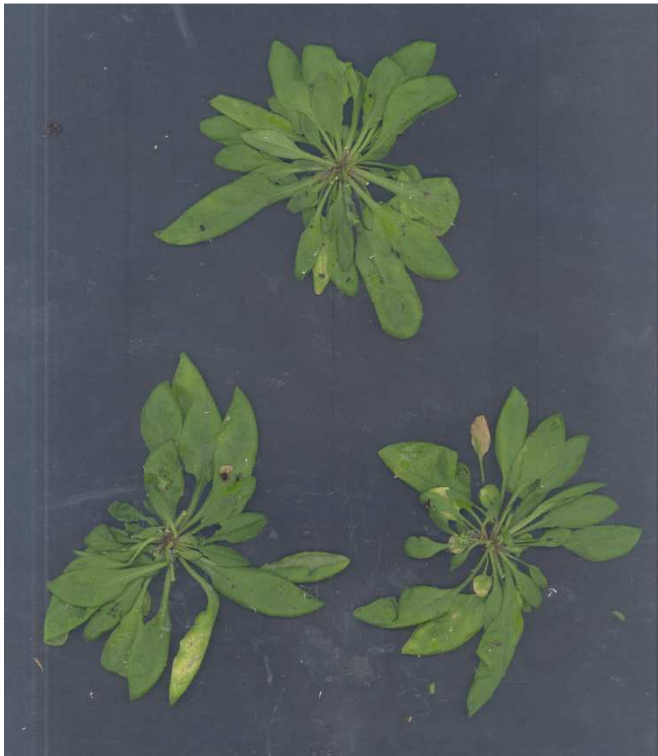
Col0 7W von oben



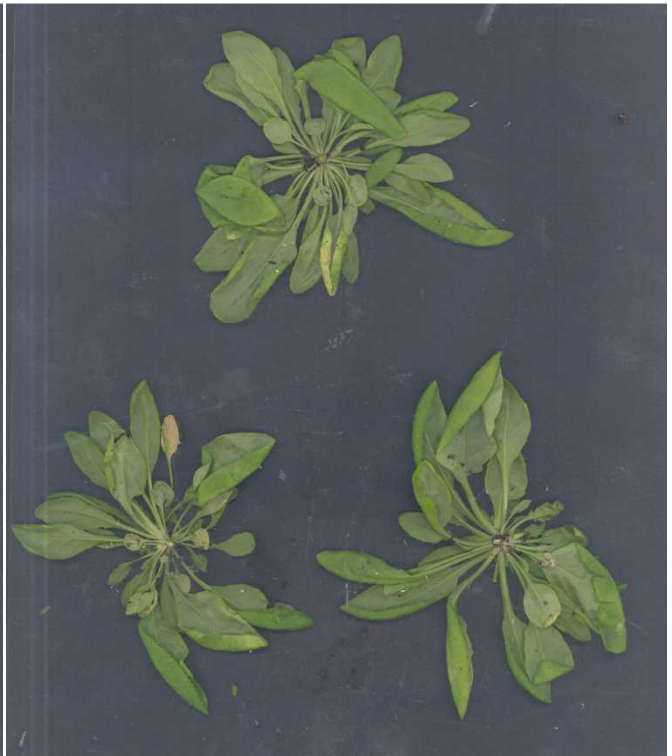
Col0 7W von unten



Col0 7W von oben



Ex 7W von oben

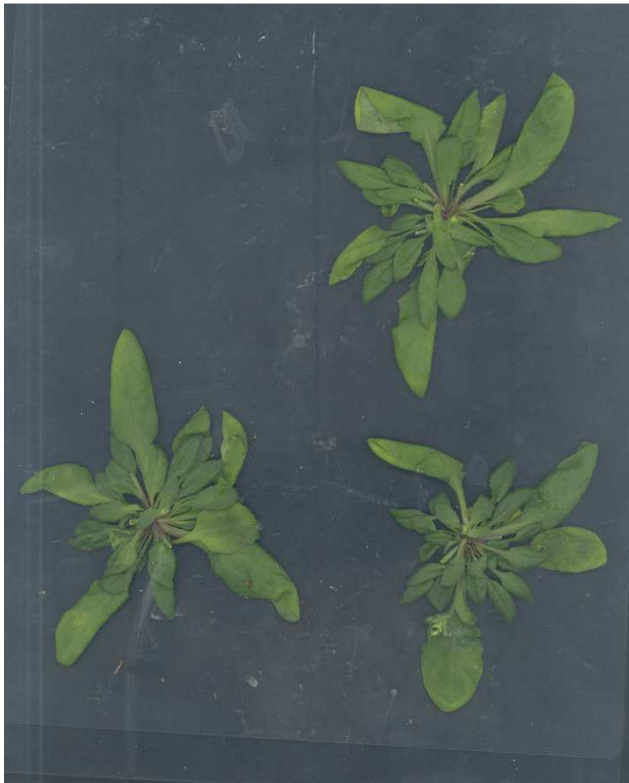


Ex 7W von unten

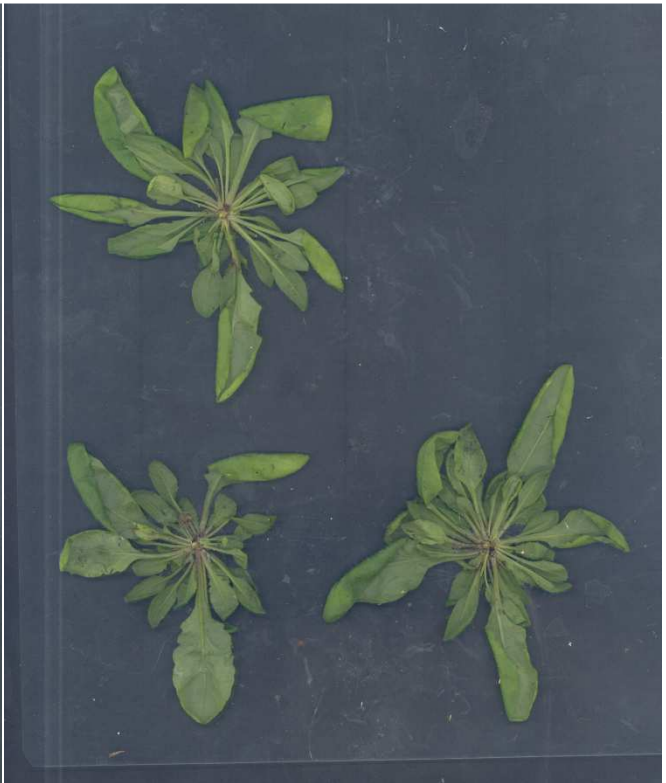


Ex 7W einzelne Blätter von oben

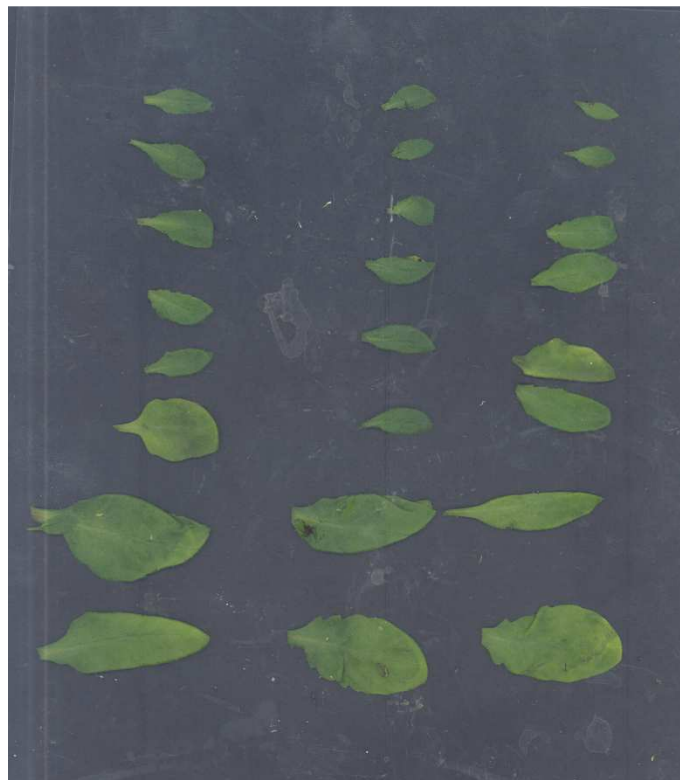




Int 7W von oben



Int 7W von unten



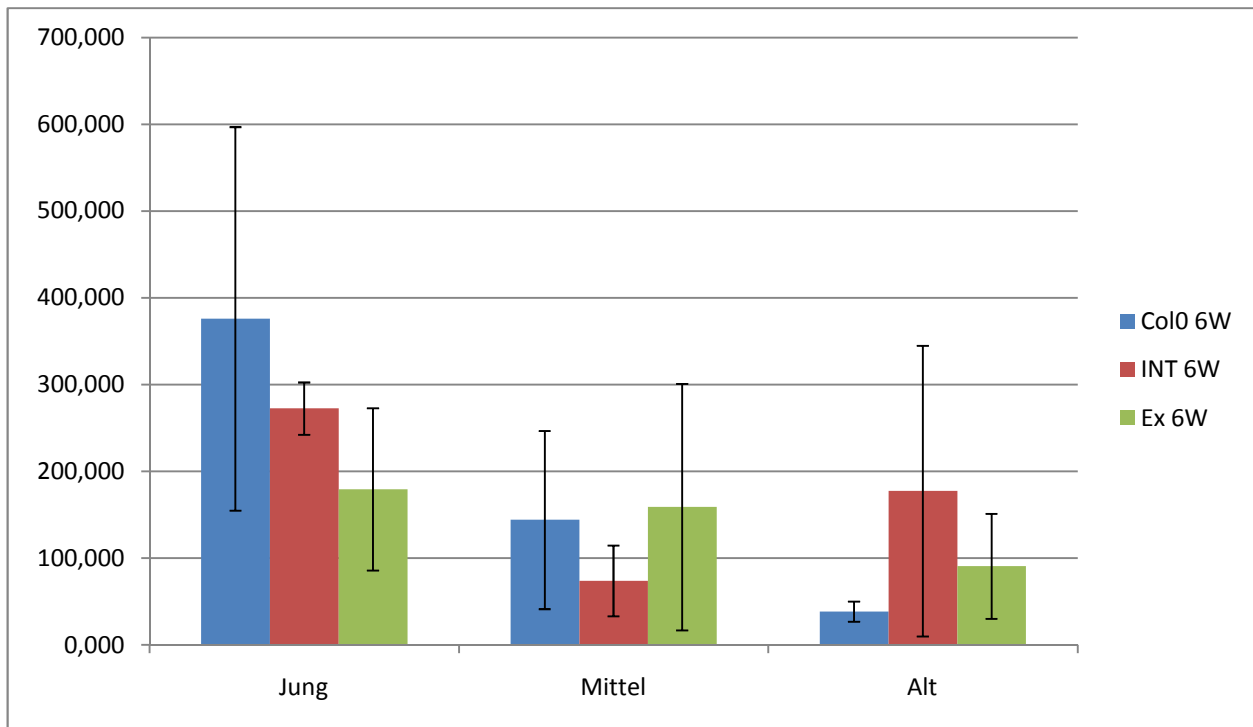
Int 7W einzelne Blätter von oben

Oben Abgebildet sind die Bilder der Pflanzen über den Wachstumszeitraum von Woche 4 bis 7. Es sind jeweils 2 Bilder von je 3 Pflanzen der Reihen Col0, Int und Ex. Die Blattmenge und die Zunahme der Blattmenge über den betrachteten Zeitraum ist bei allen 3 Reihen gleich stark. Achtet man nun auf Seneszenzerscheinungen wie z.B. braune und abgestorbene Blätter und Vergleicht die verschiedenen Reihen untereinander so fällt auf, dass alle 3 Versuchreihen die gleichen Erscheinungen in gleichem Ausmaß zeigen oder nicht zeigen. Nachfolgend abgebildet sind nun die Ergebnisse der Messung des Chlorophyllgehaltes der einzelnen Reihen in der 6. Woche.

Col0 6W	Chlorophyllgehalt		c (mg/l)= (D x 1000)/34,5 (0,1/Gew)*c		
		Gew. in g	D652		
Pflanze 1	Jung	0,01	2,142	62,087	620,870
	Mittel	0,06	2,061	59,739	99,565
	Alt	0,08	0,742	21,507	26,884
Pflanze 2	Jung	0,01	1,088	31,536	315,362
	Mittel	0,06	1,47	42,609	71,014
	Alt	0,1	1,736	50,319	50,319
Pflanze 3	Jung	0,04	2,639	76,493	191,232
	Mittel	0,01	0,902	26,145	261,449
	Alt	0,07	0,914	26,493	37,847
Mittelwert: Standartab	Jung				
	Jung	Mittel	Alt		
	375,821	144,010	38,350		
	221,108	102,703	11,725		

INT 6W	Chlorophyllgehalt		c (mg/l)= (D x 1000)/34,5 (0,1/Gew)*c		
		Gewicht in g	D		
Pflanze 1	Jung	0,02	1,988	57,623	288,116
	Mittel	0,1	2,028	58,783	58,783
	Alt	0,01	1,278	37,043	370,435
Pflanze 2	Jung	0,02	2,011	58,290	291,449
	Mittel	0,1	1,47	42,609	42,609
	Alt	0,1	2,56	74,203	74,203
Pflanze 3	Jung	0,02	1,64	47,536	237,681
	Mittel	0,04	1,655	47,971	119,928
	Alt	0,03	0,902	26,145	87,150
Mittelwert: Standartabw	Jung	Mittel	Alt		
	272,415	73,773	177,262		
	30,127	40,781	167,417		

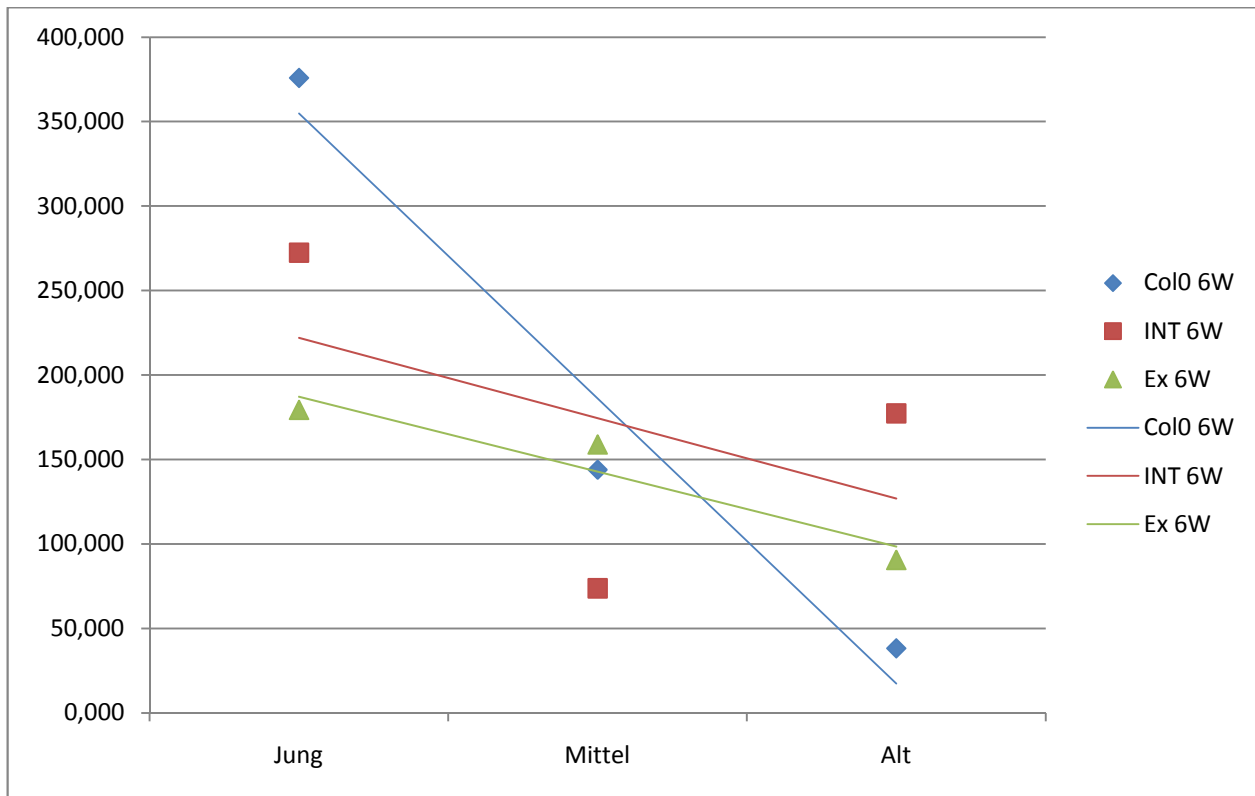
Ex 6W	Chlorophyllgehalt		c (mg/l)= (D		
		Gewicht in g	D	x	(0,1/Gew)*
Pflanze 1	Jung	0,01			
	Mittel	0,01	1,088	31,536	315,362
	Alt	0,03	1,655	47,971	159,903
Pflanze 2	Jung	0,02	0,781	22,638	113,188
	Mittel	0,06	0,781	22,638	37,729
	Alt	0,08	1,351	39,159	48,949
Pflanze 3	Jung	0,02	1,693	49,072	245,362
	Mittel	0,03	1,278	37,043	123,478
	Alt	0,08	1,736	50,319	62,899
	Jung	Mittel	Alt		
Mittelwert:	179,275	158,857	90,584		
Standartabw	93,461	142,157	60,436		



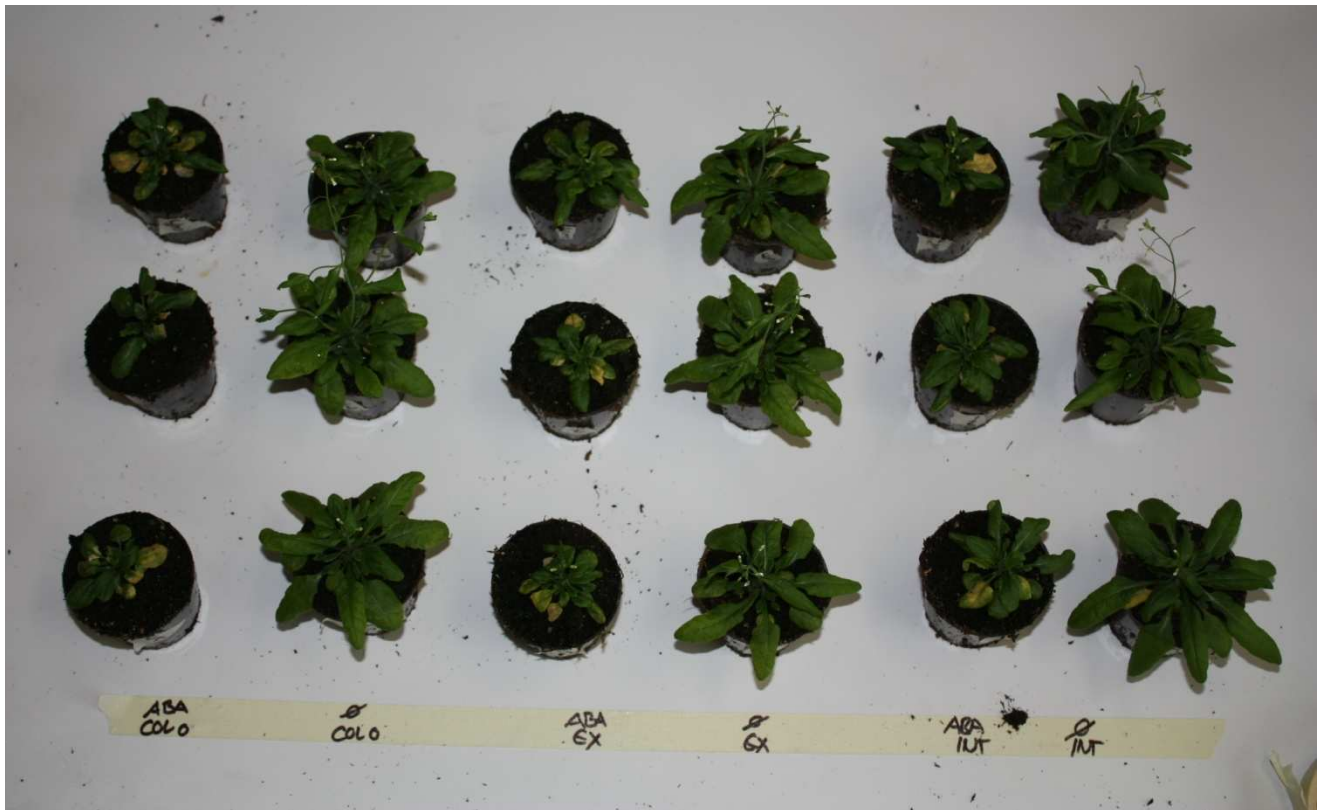
Chlorophyllkonzentration nach Alter und Reihe mit Standartabweichung

Betrachtet man den Chlorophyllgehalt und dessen Abnahme nach Alter der Blätter so lässt sich sagen, dass die Abnahme in der Col0 Reihe stärker ausfällt. Dies lässt auf einen funktionierenden GBF1 Knockout schließen. Knockout da hierbei das Chlorophyll in älteren Blättern nicht so schnell abgebaut wird wie in Wildtyppflanzen.

Die 2te Chlorophyll Messung lässt sich aufgrund fehlender Gewichtsmessungen des Blattmaterials nicht auswerten



Regressionsgerade der Chlorophylkonzentration



Mit und ohne ABA besprühte Pflanzen im Vergleich vom 05.05.2009



Mit und ohne ABA besprühte Pflanzen im Vergleich vom 18.05.2009

Man erkennt deutlich die Wachstumsinhibitorische Wirkung der Abscisinsäure. Die behandelten Bpflanzen weisen ein deutlich geringeres Wachstum auf als die Unbehandelten. Im Vergleich der 3 Pflanzenreihen zeigt sich die Wirkung auf die Col0 Pflanzen am deutlichsten.



### 3.2 Versuch 2: Promotor CAT2: GUS Reportergenanalysen

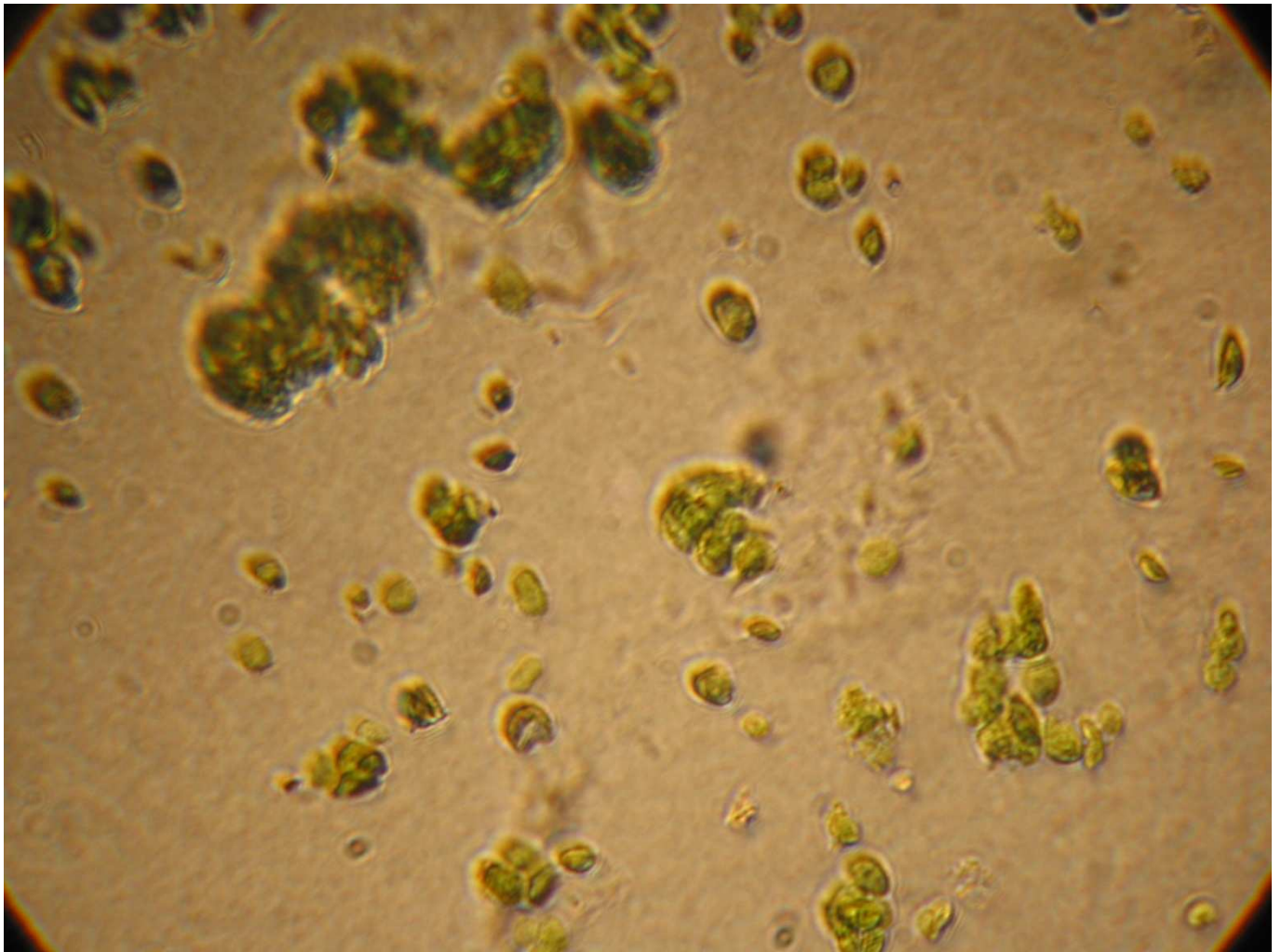


Abbildung der Isolierten Protoplasten. Man deutlich erkennen, dass hierbei genügend funktionelle Protoplasten isoliert wurden.

DU530 S/N: 9706U3000072 1.04  
08-MAY-09 12:41:38 PROTEIN ASSAY Bradford Group 0353  
Wavelength: 595.0 nm  
Formula: A=a+bC a: 0.0430 b: 0.0361

Sample	Net A	Dil X	ug/mL
0001	0.097	200.00	298.14
0002	0.094	200.00	281.09
0003	0.106	200.00	351.08
0004	0.086	200.00	240.83
0005	0.097	200.00	299.08
0006	0.075	200.00	175.95

Ergebnisse der Bradford Messung

35S	35S	35S	Py01	Py02	Py03	Blank
577425	680432	61627	616945	619922	612286	558312
500170	563390	60455	616249	584727	555998	

Ergebnisse des Gus Essay

Zur Berechnung der spezifischen GUS Aktivität wurde folgende Formel verwendet:

$$A_{GUS} \text{ (nmol/mg x min)} = (K_{MU} \text{ (nM)} \times V_{Kü} \text{ (ml)} \times VF \times UF \text{ (1l/1000ml)}) / (PM \text{ (mg)} \times t \text{ (min)})$$

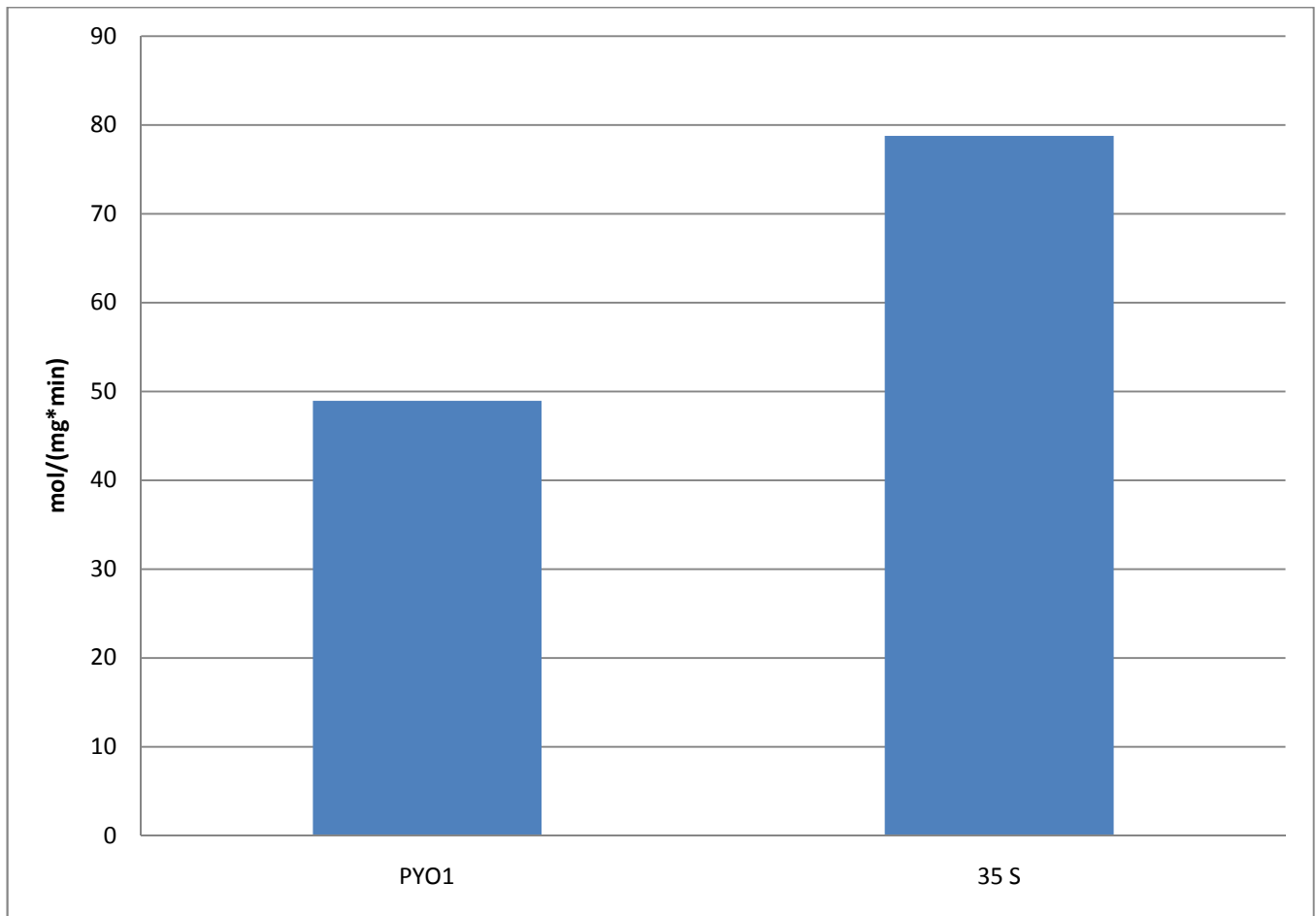
Wobei:

AGUS	spezifische GUS-Aktivität	nmol/(mg x min)
K <sub>MU</sub>	gemessene MU Konzentration	nM
V <sub>Kü</sub>	Volumen in Küvette	ml
VF	Verdünnungsfaktor	
UF	Umrechnungsfaktor	1l / 1000ml
PM	Proteinmenge im Ansatz	mg
T	Reaktionszeit	min

Welche mit eingesetzten Werten zu folgendem Ergebnis führt:

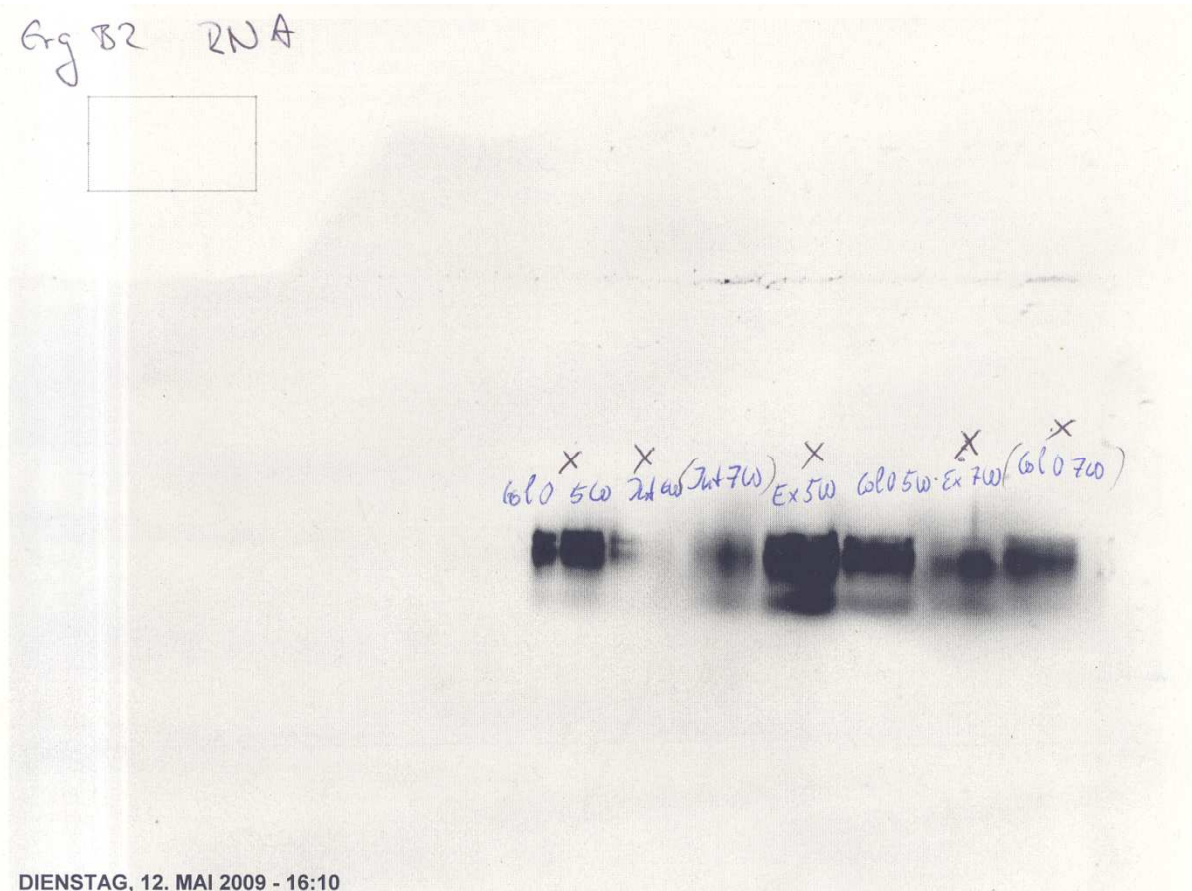
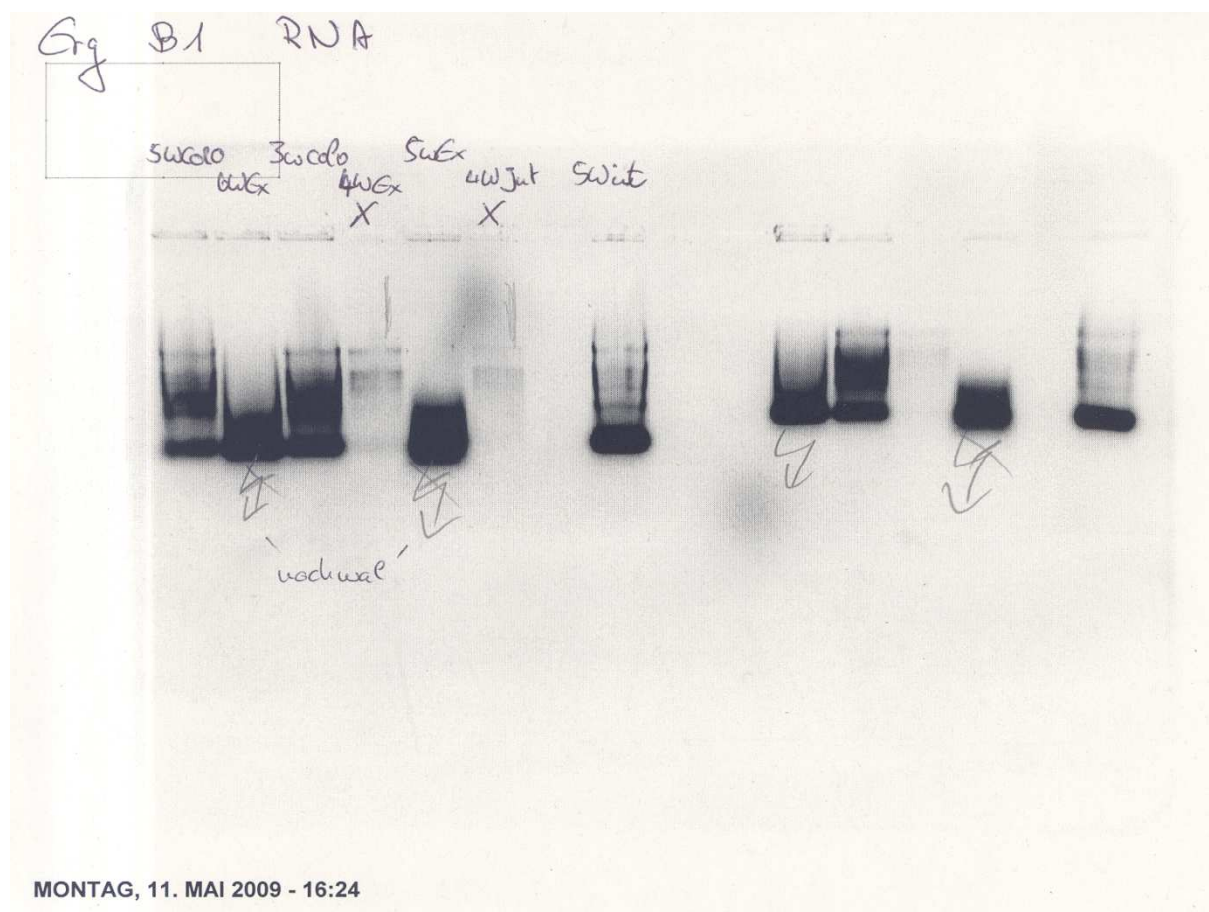
	K <sub>MU</sub>	V <sub>KÜ</sub>	VF	UF	PM	T	A <sub>GUS</sub>
35 S	77255	0,2	100	0,001	0,29814	60	86,37441
35 S	117042	0,2	100	0,001	0,28109	60	138,7954
35 S	11717	0,2	100	0,001	0,35108	60	11,12472
PYO1	696	0,2	100	0,001	0,24083	60	0,9633351
PYO1	35195	0,2	100	0,001	0,29908	60	39,225848
PYO1	56288	0,2	100	0,001	0,17595	60	106,63636

	Mittelwert	Standard abweichung
35 S	78,764845	52,398346
PYO1	48,941846	43,684454

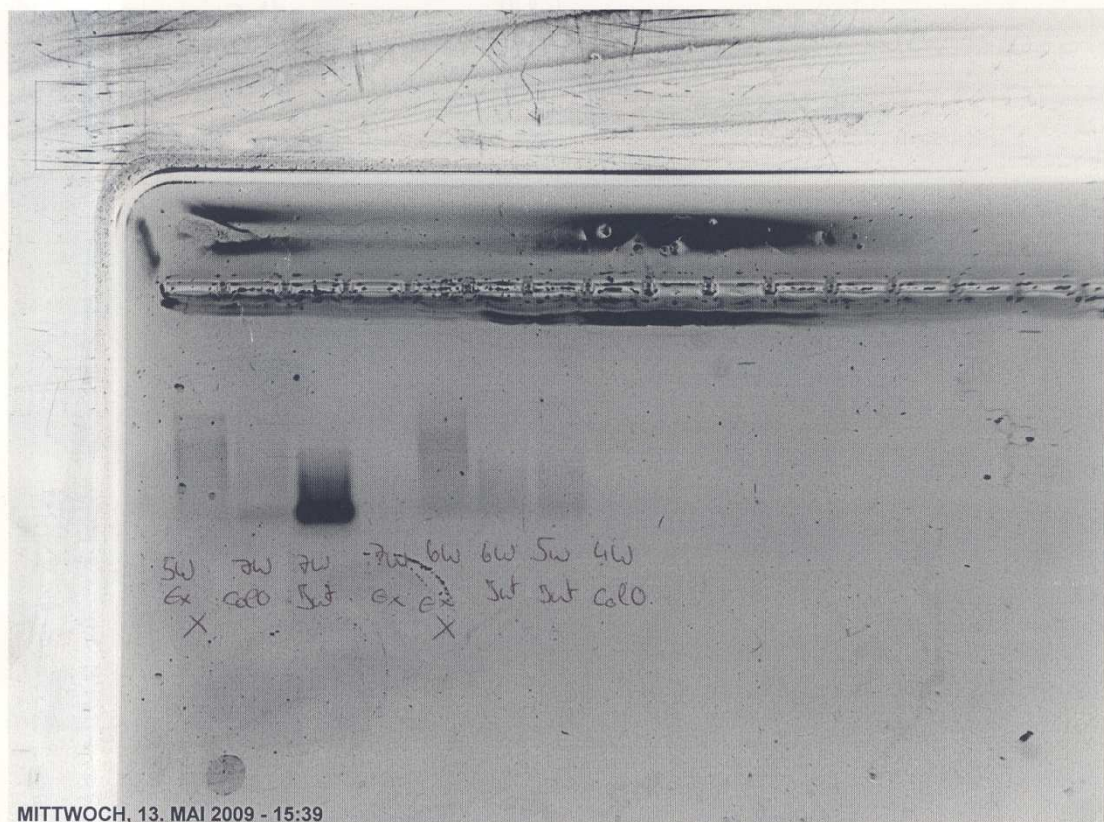


Die Annahme, dass das, hinter einen CAT2 Promoter geschaltete, Reportergen GUS bei Zugabe von GBF1 reduziert exprimiert wird, konnte mit den vorliegenden Ergebnissen leider nicht bestätigt werden. In den hier abgebildeten Ergebnissen ist sogar gegenteiliges der Fall. Hier wurde GUS bei denjenigen Protoplasten die einen leeren Vektor ohne GBF1 Gen enthielten weniger stark exprimiert als bei denjenigen mit vorhandenem GBF1 Gen.

### 3.3 Versuch 3: Expressionsanalyse in gbf1 KO Pflanzen

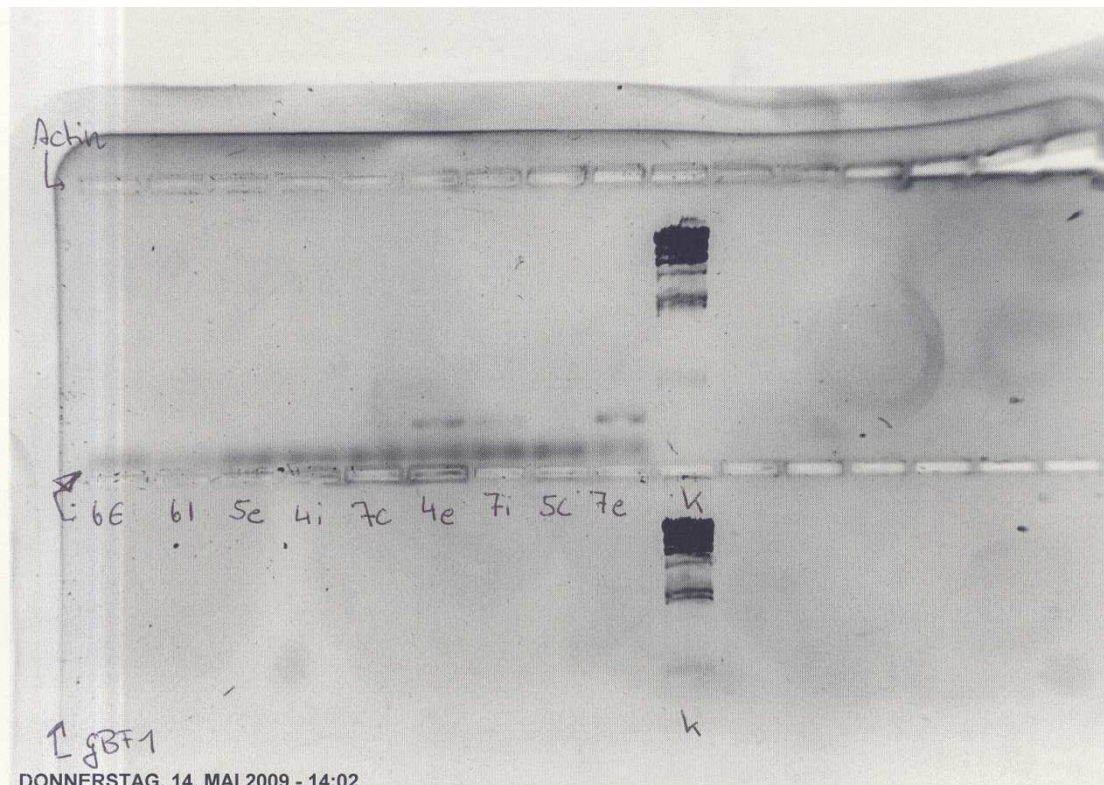






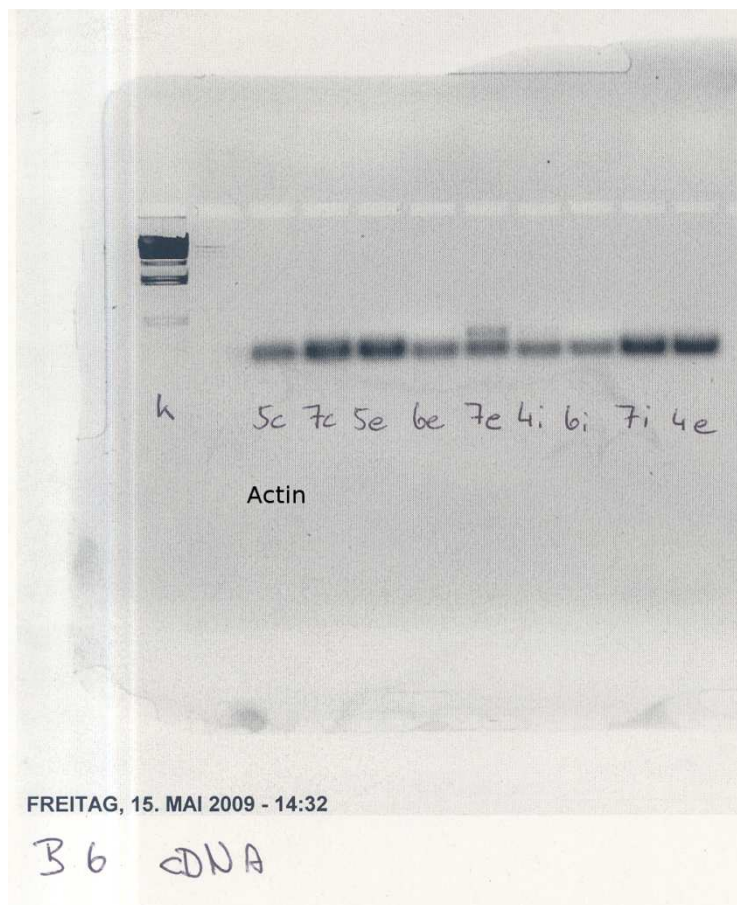
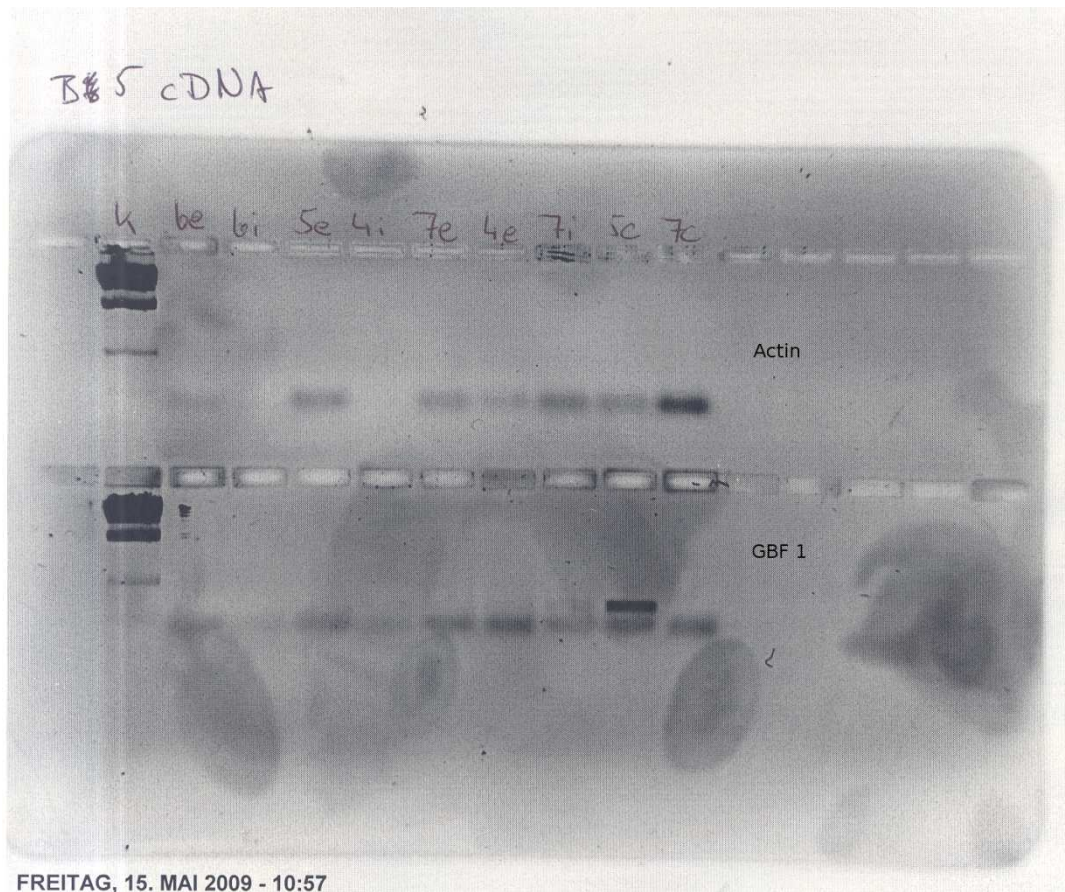
MITTWOCH, 13. MAI 2009 - 15:39

Erp83 RNA

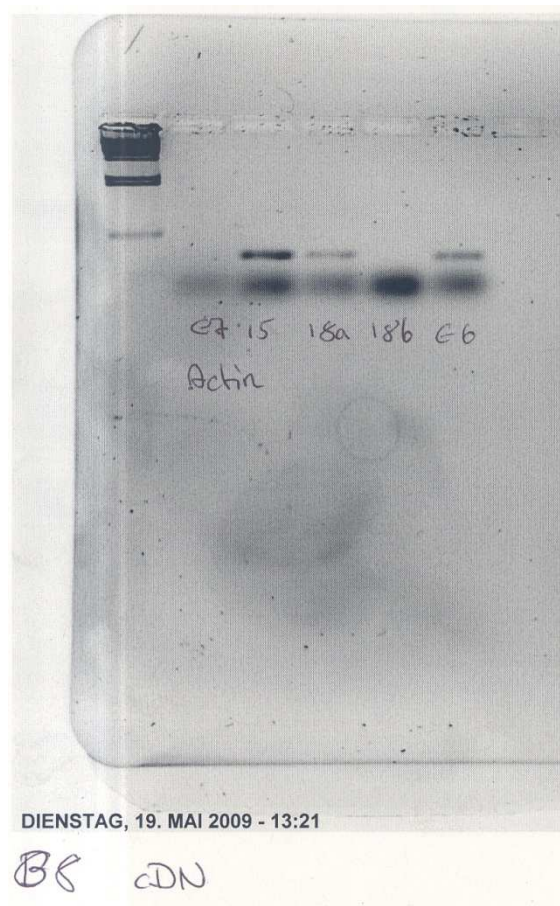
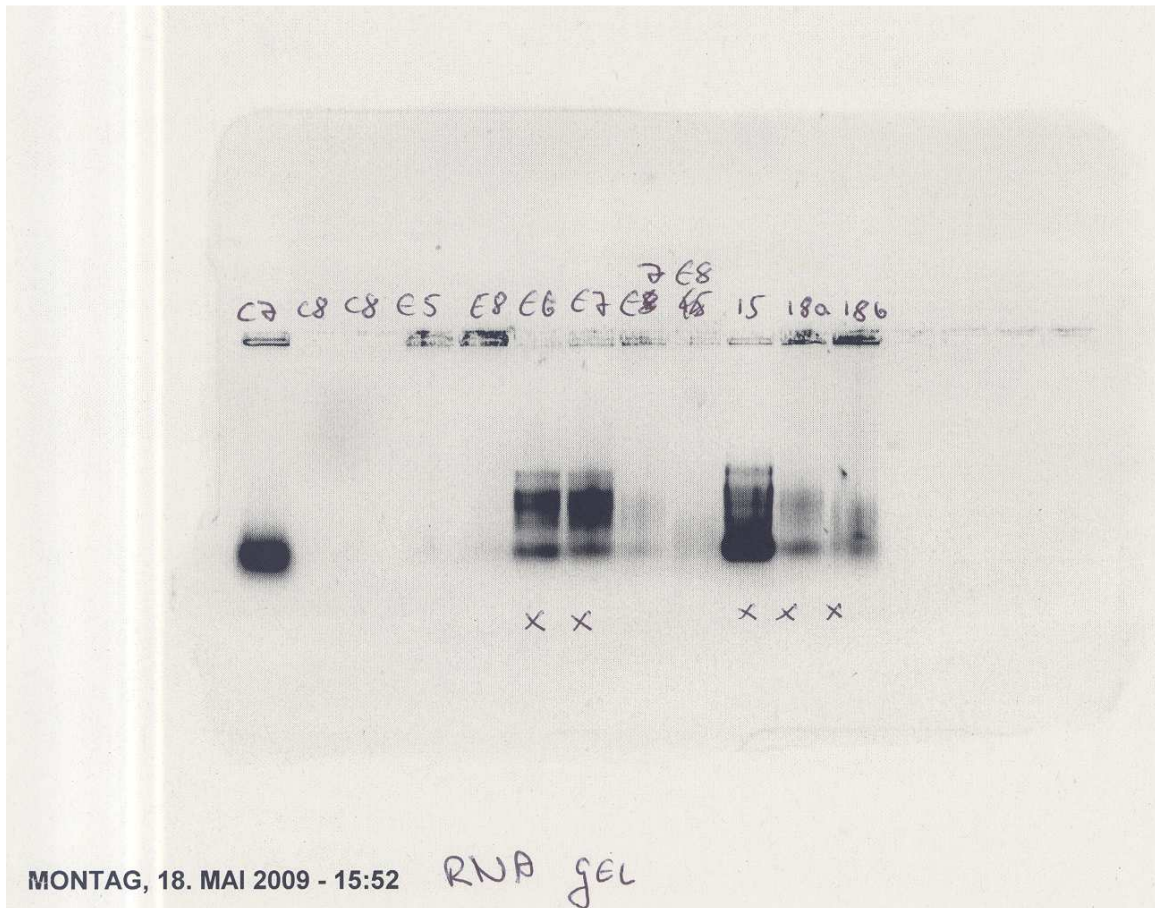


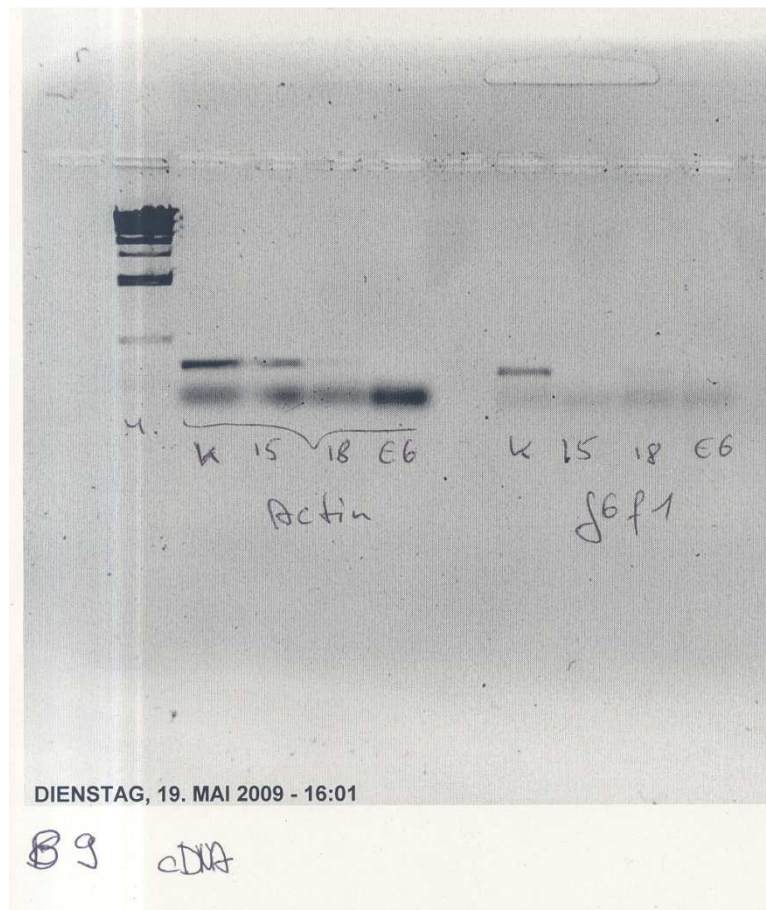
DONNERSTAG, 14. MAI 2009 - 14:02

Erp304 cDNA









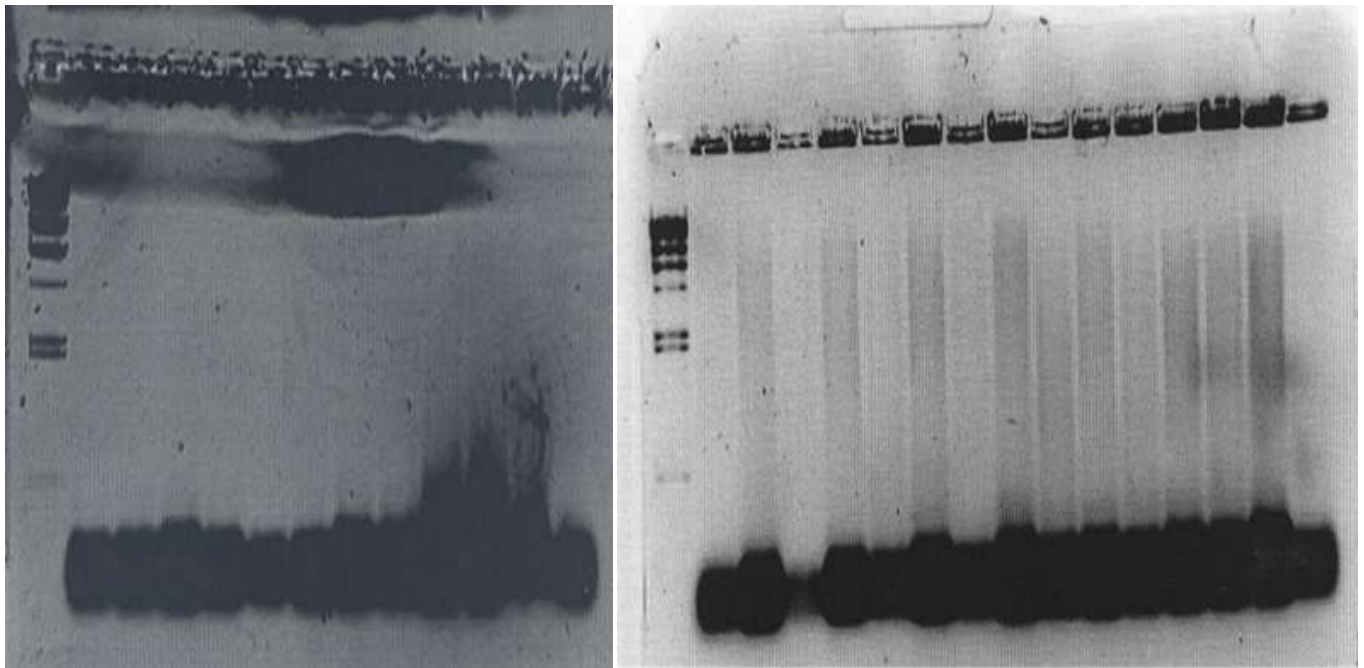
Oben abgebildet sind alle im Verlauf des Versuchs produzierten Gelbilder. Die mit „RNA“ beschrifteten Bilder sind jeweils die Kontrollen zum prüfen ob verwendbare RNA vorhanden war. Die mit X markierten Proben wurden hierbei jeweils für verwendbar befunden zur Umwandlung in cDNA weiter verwendet. In manchen Fällen erkennt man hierbei die zwei obersten Banden welche die vorhandene 18S und 25S RNA darstellen. Die immer sichtbaren starken dunklen Banden ganz unten bilden jeweils die defekte degradierte RNA. Die mit cDNA markierten Bilder sind die jeweils nach der RT PCR aufgetragenen Proben. Die verwendeten Primer sind hierbei auf dem Bild vermerkt. Die untersten Banden stellen auf diesen Bildern die komplementären Primer dar die sich aneinander gelagert haben und keine Expression darstellen. Falls darüber eine zweite Bande zu sehen ist so stellt dies eine jeweilige positive Expression der dem Primer entsprechenden cDNA dar. Einzig der Fall der verwendeten Probe „Col 5C“ auf Bild B5 stellt sich als unerklärbar dar da hier eine GBF1 Bande aber keine Actin Bande zu sehen ist, welche aber zu sehen sein sollte. Das Ergebnis wird daher nicht als positiv bewertet. Die einzige positive Bewertung für eine GBF1 Expression stellt die Probe Int 8W von Bild B9 dar, da hier eine Actin Expression sowie eine sehr geringe GBF1 Expression zu sehen ist. Dies dürfte aber aufgrund des Knockouts in den Int Pflanzen nicht der Fall sein.



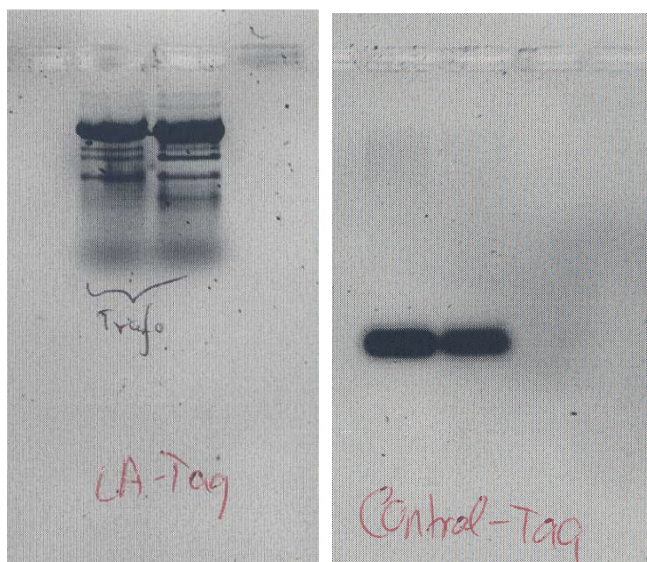
Eine Zusammenstellung der Auswertung der Bilder und der gemessenen RNA-Konzentration und Reinheit findet sich in folgender Tabelle:

Probe	RNA Isoliert	RNA Konzentration	Reinheit (260/280)	Actin	GBF1
Col0 4W					
Col0 5W	positiv	0,256	n.v.		
Col0 6W					
Col0 7W					
Int 4W	positiv	0,66	n.v.		
Int 5W	positiv	873,2	2,1	positiv	
Int 6W	positiv	0,066			
Int 7W	positiv	0,66	n.v.	positiv	
Int 8Wa	positiv	210,4	1,76	positiv	positiv
Int 8Wb	positiv	122,7	1,94		
Ex 4W	positiv	0,66	n.v.	positiv	
Ex 5W	positiv	0,07	2,01		
Ex 6W	positiv	230,4	2,1	positiv	
Ex 7W	positiv	0,91	1,95	positiv	

### 3.4 Klonierung



Man erkennt deutlich, dass keine einzelnen Banden erkennbar sind und die Kolonie PCR somit in diesem Fall fehlgeschlagen ist.



Abgebildet sind die Ergebnisse der PCR auf die Miniprep. Auch hier sieht man an den fehlenden Banden bei Verwendung der Control TAQ, dass die Klonierung nicht funktioniert hat, die PCR als solche aber sehr wohl wie man an den deutlich sichtbaren Banden bei Verwendung der LA-TAQ sieht.

## 4 Diskussion

### 4.1 GBP1 Pflanzen KO Typisierung

Da sowohl Pflanzenwachstum als auch Seneszenzerscheinungen in allen 3 Pflanzereihen gleich war lassen sich leider keine Aussagen treffen. Möglicherweise treten hier die erwarteten Effekte aber auch erst in späteren Wochen auf. Die erhaltenen Ergebnisse entsprachen beim Chlorophyllgehalt als auch beim Pflanzenwachstum der mit Aba besprühten Pflanzen jedoch den Erwartungen. Die Ergebnisse der zweiten Chlorophylmessung waren leider aufgrund fehlender Messungen nicht auswertbar.

### 4.2 Versuch 2: Promotor CAT2: GUS Reportergenanalysen

Die Ergebnisse in diesem Versuch konnten die Erwartungen leider nicht erfüllen. So waren die meisten Messungen aufgrund von Fehlern nicht auswertbar obwohl die isolierten Protoplasten gut aussahen. Es wird vermutet dass bei den letzten Messungen Pippetierfehler aufgetreten sind oder Gefäße und Beschriftungen vertauscht wurden. Dies kann aber nicht bestätigt werden.

### 4.3 Versuch 3: Expressionsanalyse in gbf1 KO Pflanzen

Auch dieser Versuch konnte die Erwartungen nicht erfüllen und die Theoretischen Ergebnisse nicht bestätigen. Zu einem großen Teil wird das auf die Minderwertige RNA nach Isolierung zurückzuführen sein. Hier wurden eventuell prozedurale Fehler gemacht wie z.B. ein zeitweises auftauen des Blattmaterial führte. Dies wiederum erzeugte Stress für Pflanzen und führte womöglich zu einer Ausschüttung von Nukleasen. Zudem zeigen die Ergebnisse ein Vorhandensein des GBF1 Gens in den KO Pflanzen was wiederum an den Ergebnissen zweifeln lässt, da dies

### 4.4 Versuch 4: Klonierung

Dieser Versuch ist fehlgeschlagen. Zum einen waren die verwendeten LB<sub>Spec</sub> Platten zeitweise nicht auffindbar und zum anderen evtl auch zu alt da nicht wie erwartet einzelne Resistente Kolonien gewachsen sind sondern ein ganzer Rasen. Zudem können Fehler bei der Plasmidisolierung aufgetreten sein, was das totale Fehlen der Plasmide bei der Miniprep erklären würde-