

**Identifizierung *cis*-regulatorischer Elemente
der Transkriptionskontrolle
in photosynthetisch aktiven Blattzellen
von *Arabidopsis thaliana***

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Katharina Prusko

aus Heydebreck

Düsseldorf, November 2010

**Identifizierung *cis*-regulatorischer Elemente
der Transkriptionskontrolle
in photosynthetisch aktiven Blattzellen von
*Arabidopsis thaliana***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Katharina Prusko
aus Heydebreck

November 2010

Aus dem Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Pflanzen
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Peter Westhoff

Koreferent: Dr. Daniel Schubert

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2010

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	5
I. Einleitung:	6
I.1. Blattentwicklung und Funktion	6
I.2. Zellspezifisch aktive Sequenzen und <i>cis</i> -Elemente	9
I.3. „Enhancer Trapping“ als Werkzeug zur Detektion spezifisch exprimierter Gene	12
I.4. Zielsetzung.....	15
II. Material / Methoden:	17
II. 1. Material	17
II.1.1. Vektoren und Bakterienstämme	17
II.1.2. Verwendete Primer	18
II.1.3. Datenbanken und Programme.....	18
II.2. Methoden.....	19
II.2.1. Isolation von Gesamt-DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	19
II.2.2. Isolation flankierender Sequenzen mittels iPCR	19
II.2.3. Sequenzierung der PCR-Produkte und Plasmide	21
II.2.4. Herstellung von Konstrukten mittels „Gateway“-Rekombination	21
II.2.5. Herstellung von Konstrukten mit amplifizierten genomischen Fragmenten.....	22
II.2.6. „Genome-Walking“ in <i>Flaveria bidentis</i>	25
II.2.7. Anzucht von <i>E.coli</i>	25
II.2.8. Transformation von <i>E.coli</i>	26
II.2.9. Reinigung von Nukleinsäuren aus <i>E.coli</i>	26
II.2.10. Anzucht von Agrobakterien.....	27
II.2.11. Transformation von Agrobakterien	27
II.2.12. Isolation von Plasmid-DNA aus Agrobakterien	27
II.2.13. Anzucht von <i>Arabidopsis</i>	28
II.2.14. Transformation von <i>Arabidopsis</i>	28
II.2.15. Sichtung der „Enhancer Trap“-Bibliothek von T. Jack	29
II.2.16. <i>In situ</i> -Nachweis der β -Glucuronidaseaktivität in transgenen Pflanzen.....	29
II.2.17. Herstellung von Proteinextrakten für GUS-Fluorimetrie	30
II.2.18. Bestimmung des Gesamtproteingehaltes.....	30
II.2.19. Messung der β -Glucuronidaseaktivität in transgenen Pflanzen.....	30
II.2.20. Nachweis der GFP-Expression in „Enhancer Trap“-Linien.....	31
III. Ergebnisse:	32
III.1. Überprüfung beschriebener Expressionsmuster in „Enhancer Trap“-Linien mit Reporter-genexpression im Blatt.....	32

III.1.1. Linie UCR8: GUS-Expressionsmuster in Leitbündeln und Bündelscheidenzellen	38
III.1.2. Linie UCR9: GUS-Expression in Leitbündeln und benachbarten Zellen	39
III.1.3. Linie UCR10: GUS-Expression in Blattprimordien	40
III.1.4. Linie 1356: GFP-Expression in Bündelscheidenzellen und Schwammparenchym	41
III.1.5. Linie 2443: GFP-Expression im Palisadenparenchym.....	41
III.1.6. Linie J2111: GFP-Expression in den Bündelscheidenzellen	42
III.1.7. Linie 1744: GFP-Expression im Palisadenparenchym.....	42
III.2. Sichtung einer Bibliothek von „Enhancer Trap“- Linien.....	44
III.2.1. Linie 19957/42: GUS-Expression an der adaxialen Blattseite	48
III.2.2. Linie 19956/32: GUS-Expression im Palisadenparenchym und einer Zellschicht oberhalb der unteren Blattepidermis	48
III.2.3. Linie 19956/34: GUS-Expression im Palisadenparenchym und einer Zellschicht oberhalb der unteren Blattepidermis	49
III.2.4. Linie 31009/26: GUS-Expression an der abaxialen Seite des Blattquerschnitts... 49	
III.2.5. Linie 31009/36: GUS-Expression im Palisadenparenchym und Bündelscheidenzellen.....	50
III.2.6. Linie 19960/50: GUS-Expression im Schwammparenchym	50
III.3. Identifizierung der Insertionspositionen der „Enhancer Trap“-Konstrukte in ausgewählten „Enhancer Trap“-Linien.....	51
III.3.1. Position des Ds-Elements in Linie UCR8	51
III.3.2. Position der Ds-Elements in Linie UCR9	52
III.3.3. Position des Ds-Elements in Linie UCR10	52
III.3.4. Position des „Enhancer Trap“-Konstrukts in Linie 2443	53
III.3.5. Position des „Enhancer Trap“-Konstrukts in Linie 4396	54
III.3.6. Position des „Enhancer Trap“-Konstrukts in Linie J2111	54
III.3.7. Position des „Enhancer Trap“-Konstrukts in Linie JR11-2	56
III.3.8. Position des „Enhancer Trap“-Konstrukts in Linie 1744	57
III.3.9. Position des „Enhancer Trap“-Konstrukts in Linie 19956/32.....	58
III.3.10. Position des „Enhancer Trap“-Konstrukts in Linie 19960/50.....	60
III.3.11. Position des „Enhancer Trap“-Konstrukts in Linie 31009/36.....	60
III.4. Überprüfung isolierter flankierender Sequenzen der „Enhancer Trap“-Insertionen auf Vorhandensein von „Enhancer“-Elementen	60
III.4.1. Hypothese 1: Der 5'-Bereich eines benachbarten Gens bewirkt Spezifität der Reporterexpression	60
III.4.1.1. Überprüfung des Stromaufwärtsbereichs des Gens At5g16560 (Linie 19960/50):.....	61
III.4.1.2. Überprüfung des Stromaufwärtsbereichs des Gens At4g00720 (Linie: 19956/32).....	62

III.4.1.3. Überprüfung des Stromaufwärtsbereichs des Gens At4g00730 (Linie: 19956/32).....	63
III.4.1.4. Stromaufwärtsbereiche der Gene At4g01455 und At4g01460 (Linie: UCR8)	63
III.4.2. Hypothese 2: Ein einzelnes benachbartes <i>cis</i> -Element steuert die Expression des Reportergens.....	65
III.4.2.1. Untersuchung der flankierende Sequenz nach den iPCR-Daten aus Linie JR11-2.....	66
III.4.2.2. Untersuchung der flankierenden Sequenz nach den iPCR-Daten aus Linie UCR8	67
III.5. Überprüfung von Stromaufwärtsbereichen von Genen mit beschriebenen Expressionsmustern im Mesophyll- und Bündelscheidenzellen.....	68
III.5.1. Untersuchung des <i>SCR</i> 5'-Stromaufwärtsbereichs.....	68
III.5.2. Untersuchung des <i>CUE1</i> -5'-Stromaufwärtsbereichs	70
III.5.3. Untersuchung des <i>APX2</i> -5'-Stromaufwärtsbereichs	71
III.5.4. Untersuchung des <i>Sultr2;2</i> -Stromaufwärtsbereichs	72
III.5.5. Untersuchung des <i>Sultr3;3</i> -Stromaufwärtsbereichs	73
III.6. Untersuchung des <i>Sultr2;2</i> -Stromaufwärtsbereichs auf das Vorhandensein von „Enhancer“-Elementen.....	74
III.6.1. Deletionsanalyse des <i>Sultr2;2</i> -Stromaufwärtsbereichs	74
III.6.2. <i>In-situ</i> -Nachweis der GUS-Expression von Deletionskonstrukten des <i>Sultr2;2</i> -Promotors	74
III.6.3. Fluorimetrischer Nachweis der GUS-Aktivität in den <i>Sultr2;2</i> -Deletionskonstrukten.....	75
III.6.4. Vergleich der 5'-Stromaufwärtssequenzen der Gene <i>Sultr2;2</i> und <i>Sultr3;3</i>	76
III.6.5. Überprüfung des distalen Fragments des <i>Sultr2;2</i> -Stromaufwärtsbereichs auf „Enhancer -Aktivität.....	78
III.7. Suche nach <i>Sultr2;2</i> -verwandten Gen in <i>Flaveria bidentis</i>	79
IV. Diskussion	81
IV.1. Identifizierung zell- und gewebespezifischer Expressionsmuster in „Enhancer Trap“-Linien in <i>Arabidopsis thaliana</i>	81
IV.2. Überprüfung flankierender Sequenzen der Insertion und der Stromaufwärtsbereiche benachbarter Gene auf das Vorhandensein zellspezifischer „Enhancer“	82
IV.3. Überprüfung von Promotoren bereits beschriebener Gene.....	86
IV.4. Sulfattransporter: Verwandtschaft, Funktion und Expression	87
IV.5. Differentiell exprimierte Gene in <i>Oryza sativa</i> und <i>Sorghum bicolor</i>	92
V. Zusammenfassung	95
VI. Literatur.....	97
VII. Anhang	106

VII.1. Sequenzen der in den iPCR-Reaktionen aus „Enhancer Trap“-Linien isolierten Produkte:	106
VII.2. Sulfattransporter- Sequenz aus <i>Flaveria bidentis</i> :	110
VI.3. Verzeichnis der Proteinsequenzen im phylogenetischen Stammbaum.....	112
VII.4. Verwendete genomische Sequenzen aus <i>Arabidopsis thaliana</i> zur Herstellung von Konstrukten.....	114

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
BS	Bündelscheidenzellen
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
g	Gramm
GFP	grün- fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
GUS	β-Glucuronidase
h	Stunde
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
LB	Leitbündel
MCS	multiple Klonierungsstelle (<i>multiple cloning site</i>)
μl	Mikroliter
M	mol/L
μM	mikromol/L
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonat
mg	Milligramm
Min.	Minute
MS	Murashige & Scoog
MU	4-Methylumbelliferon
MUG	4-Methylumbelliferyl-β-D-Glucuronid
NTP	Nukleosidtriphosphat
p. A.	für die Analyse
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PP	Palisadenparenchym
RubisCO	Ribulosebisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek.	Sekunde
SP	Schwammparenchym
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	Transkriptionsstartpunkt (<i>transcription starting site</i>)
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp

I. Einleitung:

I.1. Blattentwicklung und Funktion

Die uns bekannte große Vielfalt der Blattformen und Funktionen ist ein beeindruckendes Ergebnis der Jahrtausenden andauernden Evolution. Auch wenn es Ausnahmen gibt, wie z. B. Blattdornen oder Fangblätter fleischfressender Pflanzen, ist weiterhin die Photosynthese die Hauptaufgabe der meisten Blätter (Efroni et al., 2010). Die Entwicklung dieser Organe, welche die Sonnenenergie nutzen, um aus Kohlendioxid und Wasser Kohlenhydrate und Sauerstoff zu gewinnen, erfordert eine exakte Steuerung (Braybrook & Kuhlemeier, 2010). Die Blattentwicklung beginnt in der Nähe des Apikalmeristems. Dort finden Zellteilungen in den Tunikaschichten statt und haben die Anlage von meristematischen Bereichen zur Folge, den Blattprimordien. Aus diesen Anlagen entstehen durch weitere Zellteilungen Blätter (Esau, 1953; Sinha, 1999). Inzwischen ist auch bekannt, dass *KNOX*-Gene, die für die Erhaltung der Meristemfunktion notwendig sind, an Orten der Entstehung seitlicher Organe reprimiert sind (Braybrook & Kuhlemeier, 2010).

Um den Aufbau eines typischen einfachen Blatts zu demonstrieren und zu studieren, eignet sich die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*. Die Blätter dieser Spezies sind recht einfach gebaut, mit einfachen Trichomen besetzt und weisen Spaltöffnungen überwiegend an der unteren Blattseite auf. Die Epidermis umschließt das Innere des Blatts, welches in mehrere Gewebetypen unterteilt werden kann (Abb. 1). Auf der dem Spross zugewandten Seite (adaxial) befindet sich direkt unter der Epidermis das Palisadenparenchym. Die Morphologie dieser Zellen ist namensgebend. Das Gewebe besteht aus vielen dicht nebeneinander gepackten, säulenförmigen, chloroplastenreichen Zellen, zwischen denen es kaum Lufträume gibt. Das Palisadenparenchym kann aus einer bis drei Zellschichten bestehen (Sitte et al., 1998). Weil sie der Sonne direkt zugewandt sind, fangen diese Schichten das meiste Licht auf und sind das wichtigste photosynthetisch aktive Gewebe im Blatt. Unter dem Palisadenparenchym, an der abaxialen Seite des Blatts, befindet sich das Schwammparenchym, welches ein Gewebe aus locker angeordneten Zellen mit vielen Interzellularräumen bildet. In diesem Gewebe findet vor allem der Gasaustausch statt. Das Versorgungssystem in der Pflanze bilden die Leitgefäße. Hier wird Wasser mit Spurenelementen und Mineralstoffen von den Wurzeln bis zu den Blättern transportiert, während Assimilate den umgekehrten Weg zurück zu den Wurzeln nehmen, wo sie bei einigen Pflanzen in Form von Stärke in Knollen (z. B. Kartoffel, *Solanum tuberosum*) oder

direkt in der Wurzel (Rübe, *Beta vulgaris*) gespeichert werden. Während die Zellen des Xylems die Wasserleitung ermöglichen, leiten die Zellen des Phloems den Pflanzensaft.

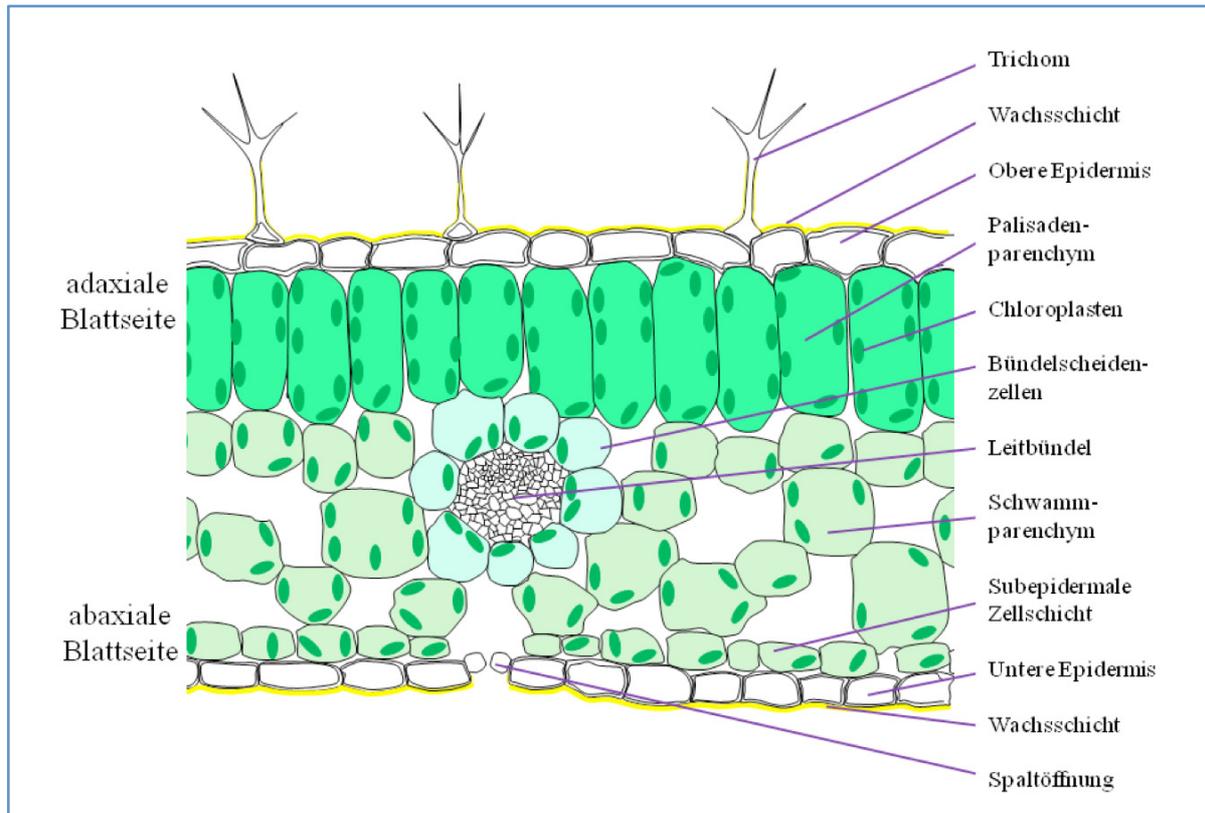


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Blatts von *Arabidopsis* im Querschnitt.

In Blättern von *Arabidopsis* ist das Xylem adaxial im Leitbündel lokalisiert, das Phloem abaxial (Dinny und Yanofsky, 2004). Die Leitbündel sind von einer weiteren Art von spezialisierten Zellen umgeben, den Bündelscheidenzellen. Diese Zellen sind den Leitbündeln direkt benachbart und durch ihre Lage, Morphologie und Stoffwechsel als ein eigener Zelltyp klassifiziert und bilden eine Verbindung zwischen dem Leitgewebe und dem Blattparenchym. In C_3 -Pflanzen fallen diese nicht besonders auf, sind aber bereits mehrfach beschrieben worden (Kinsman & Pyke, 1998; Leegood, 2008). Auch Mutanten wie z. B. *reticulate leaf mutants* zeigen, dass die Bündelscheidenzellen der C_3 -Pflanzen bereits ein eigener Zelltyp sind (Li et al., 1995; Kinsmann & Pyke, 1998). Eine besondere Spezialisierung zeigen dagegen Blätter einiger C_4 -Pflanzen (Sage, 2004). Das Blattgewebe ist bei einigen C_4 -Arten deutlich in Mesophyll und Bündelscheidenzellen unterteilt, so dass eine als „Kranzanatomie“ bezeichnete Anordnung erkennbar ist. Die Anordnung und Arbeitsteilung dieser Gewebetypen entwickelte sich in der Vorzeit als Strategie um Photorespiration weitgehend zu umgehen. C_4 Pflanzen haben eine effizientere Methode entwickelt CO_2 fixieren, als sie bisher in C_3 Pflanzen zu finden war (Hatch & Slack, 1966). Dabei sind mehrere verschiedene C_4 -Photosynthesewege beschrieben worden (Sage, 2004). Das CO_2 -fixierende Enzym RubisCO

ist zu einer frühen Zeit entstanden, als die CO₂-Konzentration in der Atmosphäre noch relativ hoch war (Hayes, 1994). Das Enzym ist in der Lage bei CO₂-Mangel auch O₂ als Substrat zu verwenden. Sinkt der CO₂-Partialdruck in den Blättern von C₃-Pflanzen, so wird O₂ unter Verwendung von Energie und Zuckerabbau fixiert. Photorespiration ist die Folge. Um den Verlust der gespeicherten Energie zu vermeiden, wurde die RubisCO in einigen C₄-Pflanzen in die Bündelscheidenzellen verlagert. Die in den Mesophyllzellen exprimierte Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPC) hat die Aufgabe der Primärfixierung von CO₂ übernommen. Das fixierte CO₂ wird in eine transportfähige Form eingebaut und aus dem Mesophyll in die Bündelscheidenzellen transportiert. Dieses System konzentriert CO₂ am Wirkort der RubisCO, wodurch die Photorespiration nahezu völlig unterdrückt werden kann (Ku et al., 1996). Dort wird das CO₂ wieder freigesetzt und das Pyruvat wieder zurück in die Mesophyllzellen befördert. In den Bündelscheidenzellen fixiert die RubisCO CO₂ in einem sekundären Schritt und arbeitet somit an ihrem Aktivitätsoptimum. Pflanzen des NADP-ME-Typs besitzen einen Chloroplastendimorphismus (Kubicki et al., 1994). In den Bündelscheidenzellen fehlt das Photosystem II, eine wichtige Komponente der Hill-Reaktion. Dies verhindert die Freisetzung von CO₂ am Wirkungsort der RubisCO und wirkt ebenfalls der Photorespiration entgegen (Woo et al., 1970). Die Spezifität der Genexpression spielt hier eine wichtige Rolle.

Die Entstehung der Blattpolarität und ihrer Substrukturen ist durch ein Netzwerk von Aktivitäten verschiedener Gene gesteuert (Byrne, 2005; Chitwood et al., 2007) (Abb. 2). Die Identität der adaxialen Seite wird bereits im Blattprimordium festgelegt, durch Expression der Gene *PHAN* (*PHANTASTICA*) (Waites und Hudson, 1995), *PHB* (*PHABULOSA*) (McConnell et al., 1998), *PHV* (*PHAVOLUTA*) (McConnell et al., 2001), *REV* (*REVOLUTA*) (Talbert et al., 1995; Otsuga et al., 2001), *CNA* (*CORONA*) (Sessa et al., 1998, Green et al., 2005). Werden diese Gene ausgeschaltet, führt dies häufig zu einer fehlerhaften Entwicklung des Blatts. Die Entwicklung der abaxialen Seite wird durch die Funktion von *KANADI* (Kerstetter et al., 2001), miRNA166 und *YABBY* (Siegfried et al., 1999) gesteuert. Allerdings konnte gezeigt werden, dass *YABBY* in Maisblättern adaxial exprimiert wird (Chitwood et al., 2007). Die Polarität der Expression von *YABBY* variiert von Spezies zu Spezies, ist jedoch in der Funktion in der Blattentwicklung konserviert. Neueste Untersuchungen zeigen, dass die Polarität auch durch eine Reihe von Faktoren gesteuert wird, die sich gegenseitig supprimieren (Husbands et al., 2009). In der adaxialen Region des Blattprimordiums wird die mikro-RNA miR390 exprimiert. Diese steuert die Biogenese der TAS3 (TRANS ACTING SIRNA 3) ta-siRNAs welche die Expression von abaxial exprimierten Genen wie *miRNA166*

in der abaxialen Seite verhindern. In Kombination mit dem Effektorcomplex AGO1 und AGO7 (ARGONAUTE) werden ta-siRNAs und tasiR-ARFs gebildet und die Expression der ARF (AUXIN RESPONSE FAKTOREN)-Faktoren in der adaxialen Seite supprimiert (Allen et al., 2005; Husbands et al., 2009). Die Entwicklung der proximo-distale Achse wird durch *Knox*-Gene gesteuert (Byrne et al., 2001; Chitwood et al., 2007).

Missexpression von Entwicklungsgenen, führt oft zu gravierenden Veränderungen in der Blattmorphologie. Daher ist hier eine zell- und gewebespezifische Expression der Gene notwendig. Mutanten wie *scr* (*scarface*) oder *mp* (*monoptereos*) zeigen, dass es auch Gene gibt, welche die Gefäßentwicklung steuern (Dengler & Kang, 2001).

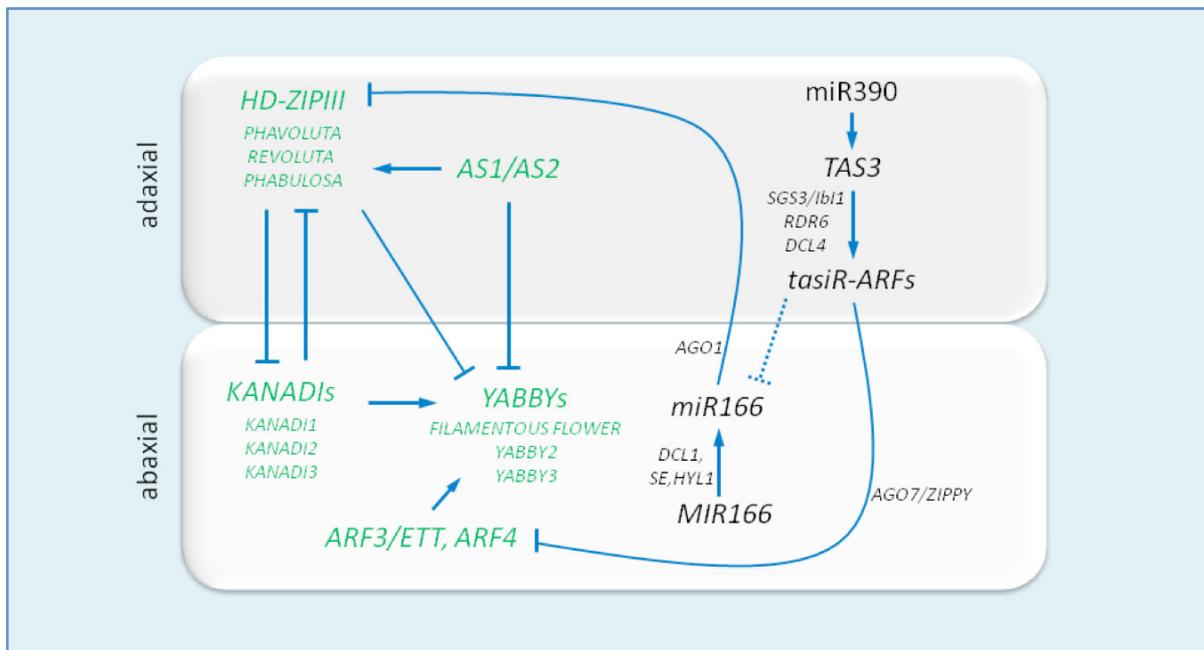


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Interaktionen zwischen Genen bei der Etablierung der adaxial-abaxialen Polarität im Blatt von *Arabidopsis thaliana*. Grün: Interaktionen auf Proteinebene, Schwarz: Interaktionen auf sRNA (small RNA) –Ebene. Gestrichelte Linien zeigen vermutete Interaktionen (Chitwood et al., 2007).

Der MYB-Transkriptionsfaktor APL (ALTERED PHLOEM DEVELOPMENT) legt die Phloemidentität fest (Bonke et al., 2003). Sowohl in der Entwicklung als auch im reifen Blatt gibt es Gene die zell- oder gewebespezifisch exprimiert werden müssen, um die Funktion der Gewebe zu erhalten. Neben der spezifischen Expression der Photosynthesegene in den C₄-Pflanzen und der für die normale Entwicklung essentiellen Gene, gibt es Gene, die zellspezifisch exprimiert werden, um die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und Spurenelementen aufrecht zu erhalten.

I.2. Zellspezifisch aktive Sequenzen und cis-Elemente

Ein typisches eukaryotisches Gen, das irgendwo in einem DNA-Strang zu finden ist und zum Beispiel ein Protein kodiert, enthält eine genaue Information, welche die Zelle benutzt, um ein

funktionsfähiges Protein zu synthetisieren. Genauer betrachtet handelt es sich bei dieser Information jedoch nur um eine konservierte Basenabfolge, die meist mit einem Translationsstart beginnt und einem Translationsstopp endet. Für die Transkriptionsmaschinerie einer Zelle ist die kodierende Einheit des Gens in Abwesenheit seiner flankierenden regulatorischen Sequenzen völlig nutzlos. Erst durch das Vorhandensein einer Reihe von Erkennungssequenzen und Modulen, durch welche festgelegt wird, ob ein Gen abgelesen wird und wie sein räumliches und zeitliches Expressionsmuster gesteuert wird, sowie durch welche Faktoren es aktiviert werden kann, wird die kodierende Einheit zu einem funktionsfähigen Gen (Wray et al., 2003). In der Regel befinden sich die meisten für die Transkription notwendigen Erkennungssequenzen in einigen wenigen Kilobasenpaaren im Stromaufwärtsbereich von Genen. Während die kodierenden Einheiten der Gene in der Evolution sehr konserviert geblieben sind, ist es meist sehr schwierig konservierte Module in den Stromaufwärtsbereichen von Genen zu finden.

Zwei wichtige Komponenten in den Stromaufwärtsbereichen von Genen lassen sich bisher nicht aus der Sequenz herleiten. Eine der beiden Komponenten ist der Kernpromotor. Es handelt sich hierbei um einen Bereich von etwa hundert Basenpaaren im Bereich -60 bis +40 relativ zur Position des Transkriptionsstartpunkts. Hier befinden sich alle Erkennungssequenzen, die für die Bindung der allgemeinen Transkriptionsfaktoren und des RNA-Polymerase II Holoenzymkomplexes notwendig sind. Der Kernpromotor ist in der Lage eine basale Expression zu bewirken (Shahmuradov et al., 2005). Bei der Transkriptionsinitiation binden die Proteine des Transkriptionskomplexes an den Kernpromotor. Weitere regulatorische Module werden an die Stelle herangezogen, wodurch DNA-Schleifen „Loops“ gebildet werden (Abb.3). Weit entfernte „Enhancer“ können hierbei herangezogen werden. Ein bekannter Bestandteil des Kernpromotors ist die TATA-Box, die sich im Bereich von -45 bis -25 bp relativ zum Transkriptionsstartpunkt (TSS: *transcription starting site*) befindet. Allerdings kommt sie nur in 30-50% der bisher bekannten pflanzlichen Promotoren vor (Shahmuradov et al., 2005). In mehr als 80% der Promotoren von Säugetiergenen, die Proteine kodieren, fehlt die TATA-Box ebenfalls (Anish et al., 2009; Sandelin et al., 2007). Gene dieser Art besitzen oft multiple TSS, die zu einer Diversität und Komplexität des Transkriptoms und Proteoms von Säugetieren beitragen (Sandelin et al., 2007). Bei TATA-losen Genen erfolgt die Transkriptionsinitiation an einer Transkriptionsinitiationsregion (Inr: *transcription initiation region*) in der Nähe des Transkriptionsstartpunktes oder am DPE (*downstream promotor element*) welches sich Stromaufwärts des TSS befindet.

Die Nächsten 200 bis 300 bp der Stromaufwärtssequenz des Gens beinhalten den proximalen Promotor, welcher Elemente für die Bindung von Transkriptionsfaktoren enthält, sowie Modulen, die Spezifität vermitteln.

Die zweite bedeutende Komponente des Stromaufwärtsbereichs ist der distale Promotor. Hier befinden sich weitere Steuerelemente des Gens, zu denen weitere Bindestellen für Transkriptionsfaktoren zählen. Hier sind „Enhancer“ lokalisiert, welche die Genexpression verstärken, sowie „Silencer“, durch welche die Genexpression stillgelegt werden kann. Die genaue Lage dieser Elemente ist schwer vorhersagbar. Oft existieren mehrere „Enhancer“-Module im Stromaufwärtsbereich, die unterschiedlich aktiv sein können. Es sind bisher nur wenige „Enhancer“-Elemente bekannt, die eine zell- oder gewebespezifische Expression steuern. In den meisten Fällen sind Sequenzen von mehreren Kilobasenpaaren isoliert worden, die eine zellspezifische Reporterexpression bewirken können.

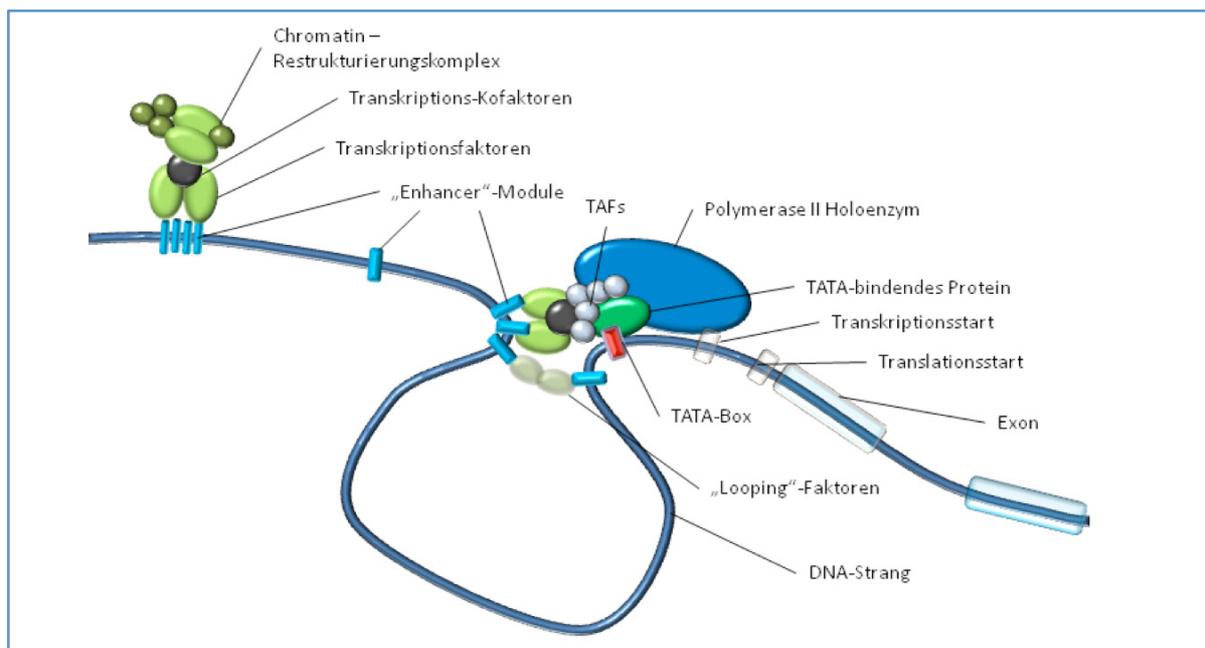


Abbildung 3: Prinzip der Transkriptionsinitiation. (Wray et al., 2003). Zusammenlagerung der Transkriptionsmaschinerie an einem Kernpromotor und Wechselwirkung mit „Enhancer“-Elementen unter Ausbildung einer Schleifenstruktur in der DNA.

Nachdem zwei Gene aus *Flaveria trinervia* untersucht worden sind, die differentiell in Mesophyll und Bündelscheidenzellen exprimiert werden, konnten Regionen in den 5'-Stromaufwärtsbereichen dieser Gene gefunden werden, die eine zellspezifische Genexpression steuern. Eines der Gene ist die C₄-Phosphoenolpyruvat-Carboxylase aus *Flaveria trinervia*, die im Blatt mesophyllspezifisch exprimiert wird. Durch Vergleich der C₃-Form des Gens aus *Flaveria pringlei* und anderen verwandten Flaverien konnte im 5'-Stromaufwärtsbereich des Gens ein Bereich gefunden werden, der als MEM1 bezeichnet worden ist (*mesophyll expression module 1*) (Gowik et al., 2004). In der C₄-Pflanze *Flaveria*

trinervia bestand die MEM-Region aus 41 bp. Der Vergleich mit verwandten Pflanzen der Gattung *Flaveria* hat gezeigt, dass dieser Bereich in zwei Module unterteilt werden kann, die je nach Spezies durch eine Sequenz von etwa hundert Basenpaaren getrennt sind. In den C₄-Formen existiert in der MEM-Region ein CACT-Motiv, welches essentiell für die mesophyllspezifische Expression der C₄-Form des Gens ist (Gowik et al., 2004).

Ebenso wurde im Stromaufwärtsbereich des *GLDPA*-Gens (Glycin-decarboxylase-untereinheit P) ein Bereich gefunden, der genügt, um eine Reporterexpression in den Bündelscheidenzellen von *Arabidopsis* zu bewirken (Engelmann et al., 2008). Der in sieben Bereiche eingeteilte Promotor enthält im distalen Bereich 1 und 2, in einer Entfernung von etwa 1,5 kb vor dem Transkriptionsstartpunkt Elemente, welche die Transkription verstärken. Die Elemente für Spezifität befinden sich stromaufwärts, in der Nähe des Transkriptionsstartpunktes. Es sind im Fall des *GLDPA*-Promotors noch zusätzliche Versuche notwendig, um den Bereich weiter einzugrenzen.

Bisher sind auch in *Arabidopsis* nur wenige „Enhancer“ gefunden worden. Es sind Stromaufwärtsbereiche von ein oder zwei Kilobasenpaaren bekannt, die Zellspezifität steuern. Ein „Enhancer“-Element ist beschrieben worden, der zellspezifische Reporterexpression im Eiapparat (Eizelle und Synergiden) bewirkt. Der nur 77 bp große Bereich befindet sich zwischen den Genen At4g37530, einer Peroxidase und At4g37540, einem LOB-Domänen Protein (*lateral organ boundaries*) (Yang et al., 2005). Desweiteren ist ein kryptischer „Enhancer“ bekannt, der eine Reporterexpression in Spaltöffnungen steuert (Plesch et al., 2000).

Die Suche nach einem zellspezifischen „Enhancer“-Element ist genauer betrachtet auch eine Suche nach einem zellspezifisch aktiven Transkriptionsfaktor, der an eine Erkennungssequenz bindet und dem Zielgen eine Zellspezifität verleiht, sowie nach einer Erklärung, welches interne oder externe Signal diesen Transkriptionsfaktor zellspezifisch macht.

I.3. „Enhancer Trapping“ als Werkzeug zur Detektion spezifisch exprimierter Gene

Die Markierung von Genen mit Hilfe von Reportergenkonstrukten, ist zuerst in *Drosophila* erfolgreich durchgeführt worden, unter der Verwendung des in diesem Organismus natürlich vorkommenden, transponierenden P-Elements (Bellen et al., 1989; Bellen 1999; O’Kaine et al., 1987). Inspiriert von diesem System, wurde ebenfalls eine für Pflanzen verwendbare Methode der Genmarkierung entwickelt (Koncz et al., 1989), die zur Herstellung zahlreicher Reportergenkonstrukte geführt hat (Campisi et al., 1999; Haseloff 1999; Springer 2000). Das

Prinzip der „Enhancer“- Falle basiert auf der Verwendung eines Reportergens mit einem Minimalpromoter. Wird ein Wirtsorganismus, wie zum Beispiel *Arabidopsis thaliana* transformiert, dann inseriert das Konstrukt stabil ins Genom der Pflanze. Inseriert es in die Nähe eines „Enhancers“, so wird die Reporterexpression von diesem aktiviert. Gehört der „Enhancer“ zu einem benachbarten Gen, dann wird das Konstrukt im gleichen Muster wie das Gen exprimiert. Ebenso können „Gene Traps“ verwendet werden. Der Unterschied zu einem „Enhancer Trap“-Konstrukt bestand darin, dass hier anstatt eines Minimalpromotors vor dem Reportergen, ein 3'-Spleiß-Akzeptor verwendet worden ist. Dieser ermöglicht die Expression des Konstrukts, in Form eines Fusionsproteins, sobald dieses in ein Intron eines Gens inseriert. Außerdem wurden auch sogenannte „Promotor Traps“ entwickelt, Reportergenkonstrukte ohne Promotor, die aktiviert werden, sobald die Insertion in ein Exon eines Gens erfolgt (Springer 2000). In *Arabidopsis thaliana* sind bisher zahlreiche Linien mit spezifischen Expressionsmustern hergestellt worden (Campisi et al., 1999; Geisler et al., 2002). Diese Linien werden verwendet, um spezifisch exprimierte Gene zu finden und vor allem die *cis*-Elemente, welche diese Expression steuern. Eine stabile Transformation von Pflanzen ist jedoch nicht immer möglich, denn es sind bisher nicht viele Vektorsysteme bekannt. Die Transformation von *Arabidopsis* ist dagegen vergleichsweise einfach. Genutzt wird hier ein in der Natur vorkommender Weg der Infektion durch ein Bodenbakterium (De la Riva et al., 1998). *Agrobacterium tumefaciens* ist ein natürlich vorkommender Prokaryot, der Tumore und Wurzelhalsgallen an befallenen Pflanze verursacht. Infizierte Pflanzen bilden Kalli, aus welchen Opine freigesetzt werden. Es handelt sich hierbei um Aminosäuren, die den parasitierenden Bakterien als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle dienen. Infiziert werden die Pflanzen meist durch Verletzungen, wie sie z. B. durch Insekten hervorgerufen werden. Dabei dringen die Bakterien an den verletzten Stellen ein und übertragen einen Teil ihrer DNA in die Pflanzenzellen. Möglich wird dies durch das Vorhandensein des Ti-Plasmids (Tumorinduzierendes Plasmid) und der darauf kodierten Vir-Gene (Hooykaas & Shilperoot, 1992). Um dieses Bakterium als Vektor zu nutzen, wurde das Plasmid „entschärft“, indem die Tumorgene entfernt wurden. Stattdessen können je nach Verwendungszweck beliebige DNA-Fragmente in die T-DNA-Region eingebaut werden. Meist handelt es sich um Selektionsmarker und ein Reportergen, die es ermöglichen, eine erfolgreiche Transformation zu detektieren. Die Transformation von *Arabidopsis* ist in der Durchführung einfach. Blühende *Arabidopsis*-Pflanzen werden in einer Agrobakterienlösung getaucht (Clough & Bent 1998). Ziel der Transformation mit Hilfe dieser „Floral-Dip“-Methode sind die Ovarien.

Das Saatgut dieser Pflanzen kann dann auf das Vorhandensein eines Selektionsmarkers selektiert werden.

Es werden „Enhancer Trap“-Konstrukte verwendet, die sich in ihrem Aufbau sehr voneinander unterscheiden. Einfach strukturierte Konstrukte tragen neben einem Selektionsmarker (oft Kanamycin-, Glufosinat- oder Hygromycin-Resistenzgene) nur ein GUS-Reportergen, vor das ein Minimalpromotor fusioniert worden ist (Abb. 4a). Das Fragment inseriert einmalig in das Genom und bleibt stabil integriert. Das von Poethig & Haseloff verwendete Konstrukt (<http://enhancertraps.bio.upenn.edu/>) bietet die Möglichkeit der Transaktivierung (Abb. 4b). Neben einem Reportergen und dem Selektionsmarker trägt das Konstrukt ein VP16-GAL4-Fusionsprotein. VP16 ist eine Domäne des Transkriptionsaktivatorproteins VP16 aus *Herpes simplex* (Sadowski et al., 1988), das unter der Kontrolle des Minimalpromotors steht und die Expression von GAL4 in der Pflanze ermöglicht. GAL4 ist ein Hefetranskriptionsaktivator. Das detektierbare Reportergen steht unter der Kontrolle eines UAS-Moduls (*upstream activating sequence*), welches einem „Enhancer“ entspricht. Hier muss ein benachbarter „Enhancer“ zunächst die GAL4-Expression anschalten, die wiederum die Reportergenexpression aktiviert. Wird eine solche „Enhancer Trap“-Linie mit einem Konstrukt transformiert, das vor dem Reportergen ein UAS-Modul trägt, so lässt sich dieses im Muster der Reportergenexpression koexprimieren oder es können Gene gezielt in den exprimierenden Zellen ausgeschaltet werden. In diesem Konstrukt wurde *mgfp-5-ER* als Reportergen verwendet (Haseloff, 1999). Es ist eine Modifikation des ursprünglich aus der Quallenart *Aequora victoria* stammenden GFP-Proteins (*green fluorescing protein*).

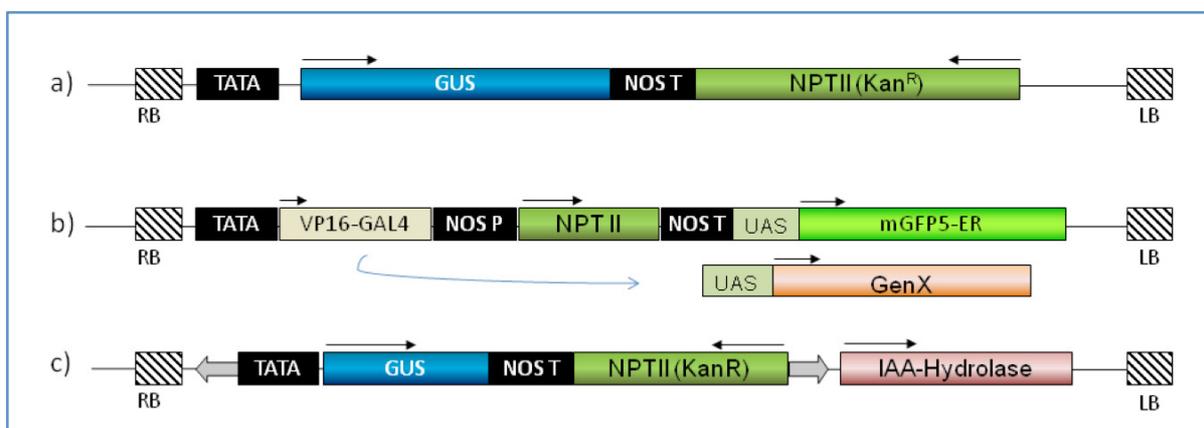


Abbildung 4: Schematische Darstellung der zur Herstellung von „Enhancer Trap“-Linien verwendeten Konstrukte. T. Jack (Campisi et al., 1999) (a); S. Poethig/J. Haseloff (<http://enhancertraps.bio.upenn.edu/>) (b). Ein blauer Pfeil deutet auf die Möglichkeit der Transaktivierung eines zweiten transformierten Konstrukts; P. Springer und R. Martienssen (Springer, 2000; <http://genetraps.cshl.org/>) (c).

Dem GFP-Protein ist eine Signalsequenz angefügt worden, die es für den Transport in das Endoplasmatische Retikulum bestimmt (Haseloff et al., 1995). Ein kryptisches Intron wurde herausgeschnitten, um ein Fehlspleißen in Pflanzen zu verhindern (Haseloff et al., 1997). Durch eine Modifikation der Proteinsequenz wurden die Fluoreszenzeigenschaften verändert. Die ursprünglichen zwei Anregungsmaxima des GFP-Proteins, bei 395 nm und 475 nm, erreichen im modifizierten Protein die gleiche Amplitude, mit einem Emissionsmaximum von 509 nm (Siemering et al., 1996).

Die Herstellung von „Enhancer Trap“-Konstrukten mit Hilfe mobiler genetischer Elemente ist eine weitere, jedoch komplizierte Methode (Springer, 2000). Das aus Mais bekannte Ac/Ds-System (Ac: Activator, Ds: Dissociation; McClintock, 1950) wurde ebenfalls in *Arabidopsis* verwendet, um „Enhancer Trap“-Linien herzustellen. Dafür wurde es so modifiziert, dass es kontrolliert werden kann (Long et al., 1993). Das Ac-Element, welches ein Transposase-Gen trägt, ist hier stabil in das Genom integriert und nur das Ds-Element kann transponieren. Bei diesem Verfahren werden das Ac-Element und das Ds-Element jeweils unter Verwendung einer T-DNA und des Agrobakteriums in *Arabidopsis* transformiert. Es werden dabei zwei Linien hergestellt, die ein stabil im Genom inseriertes Ac oder ein Ds-Element besitzen. Um das Ds-Element (Abb. 4c) zu mobilisieren, werden beide Linien gekreuzt. Anschließende Kreuzungen sind notwendig, um das Ac-Element zu entfernen. Beide Konstrukte enthalten das *IAAH*-Gen (Indolaceamidhydrolase) als Selektionsmarker. Nachkommen dieser Pflanzen, in denen das Ds-Element transponiert ist und das Ac-Gen fehlt, sind NAM (Naphtalenacetamid)-resistent und Kanamycinresistent (Sundaresan et al., 1995).

I.4. Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war es, zellspezifische „Enhancer“ zu identifizieren, die eine palisadenparenchym-, schwammparenchym- oder bündelscheidenspezifische Expression im Blatt von *Arabidopsis thaliana* steuern. Es wurden dazu zwei Strategien gewählt.

Die erste Strategie war, „Enhancer Trap“-Linien von *Arabidopsis thaliana* zu nutzen, um zellspezifische „Enhancer“ zu finden. Dafür wurden „Enhancer Trap“-Linien mit zellspezifischen Reportergen-Expressionsmustern gesucht und die Positionen der „Enhancer Trap“-Insertionen bestimmt. Flankierende Sequenzen des inserierten „Enhancer Traps“ sollten auf das Vorhandensein von *cis*-regulatorischen Elementen untersucht werden.

Die zweite Strategie war Promotoren bereits bekannter zellspezifisch exprimierter Gene zu verwenden, um zellspezifische „Enhancer“ zu finden.

Flankierende Sequenzen der Insertionsereignisse, sowie bekannte Promotoren sollten mit einem GUS Reportergen fusioniert werden, um die Expressionsmuster zu untersuchen.

Eine klassische Deletionsanalyse wurde gewählt, um die Position des „Enhancers“ in einem DNA-Fragment zu bestimmen.

II. Material / Methoden:

II. 1. Material

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien waren von p.A.-Qualität. Bezogen wurden diese von folgenden Firmen:

MERK	(Darmstadt)
AppliChem GmbH	(Darmstadt)
BIOMOL GmbH	(Hamburg)
VWR	(Leuven)
Sigma-Aldrich Chemie GmbH	(Steinheim)
Carl Roth GmbH	(Karlsruhe)
ROTH	(Karlsruhe)
Amersham Biosciences	(Freiburg)

Restriktionsenzyme und modifizierende Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen:

Fermentas GmbH	(St. Leon-Rot)
Boehringer	(Mannheim)
NEB	(Frankfurt am Main)
Invitrogen	(Carlsbad)

II.1.1. Vektoren und Bakterienstämme

Die Klonierung von PCR-Fragmenten erfolgte mit Hilfe des „TOPO TA Cloning Kit“ for Sequencing (Invitrogen), sowie des „pJET1.2/blunt GeneJETPCR Cloning Kit“ (Fermentas).

Verwendete Vektorplasmide:

pCR [®] 4-TOPO [®]	(Invitrogen)
pCR [®] 2.1- TOPO [®]	(Invitrogen)
pJET1.2/blunt	(Fermentas)
pGEM [®] -T Easy Vektor	(Promega, Madison, USA)
pDONR [™] 221	(Invitrogen)
pBI121	(Clontech, Paolo Alto, USA)
pMDC164	(Curtis und Grossniklaus, Plant Physiology 2003)

Verwendete Bakterienstämme:

E. coli:

One Shot [®] Top10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80, <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i> (Invitrogen)
DH5 α	(<i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> (Φ 80, <i>lacZ</i> Δ M15), <i>hsdR17</i> (<i>rk⁻mk⁺</i>), <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> (Bethesda Research Laboratories, 1986)

DB3.1 F- gyrA462 endA1 Δ (sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB-, mB-) supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(SmR) xyl-5 λ - leu mtl1 (Invitrogen)

Agrobacterium tumefaciens:

AGL1 (EHA 101, recA::bla, pTIBo542 Δ T, Mop+, CbR (Hood et al., 1986; Lazo et al., 1991))

II.1.2. Verwendete Primer

In dieser Arbeit wurden Primer verwendet, die von den Firmen Biolegio (Nijmegen, Niederlande), Invitrogen (Karlsruhe) oder Sigma Aldrich (München) synthetisiert worden sind. Die verwendeten Primer sind in den entsprechenden Kapiteln beschrieben.

II.1.3. Datenbanken und Programme

Die in dieser Arbeit verwendeten Programme und Internetquellen wurden in Tabelle 2 zusammengefasst.

Internetadresse	Beschreibung
Informationen zu „Enhancer Trap“-Linien und Konstrukten	
http://seeds.nottingham.ac.uk/Nasc/detail/2005/bglines.lasso	NASC (<i>Nottingham Arabidopsis Stock Center</i>) Informationen zu „Enhancer Trap“-Linien
http://enhancertraps.bio.upenn.edu	Informationen zu Linien von S. Poethig
http://genetraps.cshl.org/traps.html	Informationen zu Linien von Springer und Martienssen
Datenbanken, Informationen über Gene	
http://www.arabidopsis.org	TAIR (<i>The Arabidopsis Information Resource</i>)
http://www.ncbi.nlm.nih.gov	NCBI (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)
http://plants.ensembl.org/	Ensembl Genomes Browser
http://www.phytozome.net	Phytozome
http://www.greenphyl.cirad.fr/cgi-bin/greenphyl.cgi	GreenPhyl
http://signal.salk.edu/cgi-bin/atta	ATGED (<i>Arabidopsis Transcriptome Genomic Express Database</i>)
http://efp.ucr.edu/	eFP-Viever
http://sorghumdiversity.org/cgi-bin/sorghum/searches/webform/genelocus_search	Sorghum-Datenbank
Phylogenetische Analyse und Sequenzvergleiche	
http://www.genomatix.de/cgi-bin/dialign/dialign.pl	Genomatix, DiAlign
http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	BLAST (<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)
Sequenzuntersuchungen/Promotoranalyse	
http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE	PLACE (<i>Database of Plant Cis-acting Regulatory DNA-Elements</i>)
http://bioportal.bic.nus.edu.sg/tres/	TRES: TRANSFAC Matrix Scan (<i>Transcription Regulatory Element Search</i>)
http://www.plantpan.mbc.nctu.edu.tw/	PlantPAN (<i>Plant Promoter Analysis Navigator</i>)

Tabelle 1: Verwendete Datenbanken und Programme.

DNA-Sequenzen wurden mit dem Programm Vektor NTI 7 analysiert (Invitrogen Life Science Software). Zusätzlich wurde auch das Programm MacMolly®Tetra, Version 3.8, Soft Gene GmbH (Schöneberg et al., 1998) verwendet. Chromatogramme wurden mit dem

Programm 4 Peaks Version 1.7.2 ausgewertet (A. Griekspoor & T. Groothuis, www.mekentosj.com, 2006).

Die Berechnung des Phylogenetischen Stammbaums der Sulfattransporter wurde von Oliver Deusch (Institut für Ökologische Pflanzenphysiologie) durchgeführt. Das Alignment wurde mit dem Programm MUSCLE erstellt (Edgar, 2004). Zur Erstellung des Stammbaums wurde dabei das Programm PhyML (Guindon et al., 2003) benutzt, unter Verwendung der Maximum-Likelihood Methode und integrierter Bootstrap-Analyse. Es wurden 1000 Replikate gerechnet. Die Höhe des Bootstrap-Wertes zeigt die Häufigkeit an, mit der ein Ast berechnet worden ist und damit die Nähe der Verwandtschaft. Visualisiert wurde der Stammbaum im Programm FigTree Version 1.1.1 (Tree Figure Drawing Tool, A. Rambaut, Edinburgh)

II.2. Methoden

II.2.1. Isolation von Gesamt-DNA aus *Arabidopsis thaliana*

Die Isolation von Gesamt-DNA für inverse PCR erfolgte nach Chen & Dellaporta (1994). Etwa 2 g Pflanzenmaterial wurden unter flüssigem Stickstoff aufgeschlossen. Das Pulver wurde in 8 ml Extraktionspuffer (7 M Harnstoff, 0,3 M NaCl, 1 % [w/v] Sarkosyl, 0,02 M EDTA, 0,05 M Tris, pH 8,0) aufgenommen, unter Rühren resuspendiert und in ein SS34-Zentrifugenröhrchen überführt. Die Suspension wurde 5 Min. bei 37°C inkubiert und anschließend mit 8 ml Phenol/Chloroform versetzt. Nach gründlichem Mischen wurden die Proben 10 Min. bei 5000 Upm zentrifugiert, um eine Phasentrennung zu erreichen. Die DNA wurde aus der wässrigen Phase, in einem 30 ml Corex-Röhrchen, mit 8 ml Isopropanol gefällt. Anschließend wurde das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen, um Salze zu entfernen. Nach Lufttrocknung des Pellets wurde die DNA in 500 µl Tris-Puffer pH 8,0 rückgelöst. Nach einer anschließenden RNase-Behandlung wurde die DNA mit Phenol/Chloroform gereinigt, gefällt und nach dem Trocknen in 100 µl 10 mM Tris-Puffer pH 8,0 rückgelöst.

Für die Amplifizierung von langen Fragmenten wurde die DNA nach der Methode von Fulton et al. (1995) isoliert. Für Test-PCRs wurde DNA nach Edwards et al. (1991) isoliert.

II.2.2. Isolation flankierender Sequenzen mittels iPCR

Um die Insertionspositionen der „Enhancer Trap“-Konstrukte zu bestimmen, wurde genomische DNA mit dem entsprechenden Restriktionsenzym geschnitten und anschließend Phenol/Chloroform gereinigt. 500 ng der geschnittenen DNA wurden dann mit der T4-Ligase

in einem Volumen von 250 µl vier Stunden bei RT ligiert. Die Reaktion wurde durch eine Inkubation für 15 Min. bei 65°C gestoppt und mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 6,5) und 3 Volumen 96% Ethanol für eine halbe Stunde bei -70°C gefällt. Das DNA-Pellet wurde einmal mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 15 µl sterilem H₂O rückgelöst. Je 5 µl davon wurden in der PCR eingesetzt. Die in Tabelle 2 aufgelisteten Primer wurden verwendet, um die Insertionspositionen der „Enhancer Trap“-Konstrukte in den *Arabidopsis*-Linien zu finden.

Primer	Sequenz 5'→3'	Bemerkungen
P. Springer		
Primer 5RA	TACCTCGGGTTCGAAATCGATC	Primer für die linke Grenze der T-DNA
Primer 5FA	ACGGAAACGGGATATACAAAACGG	
Primer 5FI	GTAGAGCTAGTTTCCCGACCGT	
Primer 5RI	TACGATAACGGTCCGTACGGG	
J. Haseloff/ S. Poethig		
LB1*	TTGATTTATAAGGGATTTTGCCGA	Primer für die linke Grenze der T-DNA
2443A	CCTTCACCCTCTCCACTGACAG	
LB3*	CCACCCCAGTACATTA AAAACGTC	
RP3	AGTGAATTAATTCCCGATCTAGTAA	
RP4	GACACCGCGCGGATAATTTATCCTA	
FP4	AACCACCATCAAACAGGATTTTCGCCT	
RP1	CACTTCGGCTTCTTCTTGGAGCACTT	Primer für die rechte Grenze der T-DNA
RP2	CGATGGAGGACAGGAGCTTCATTGT	
FP1	TTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATT	
FP2	AACAAAATATAGCGCGCAA ACTAGGATA	
T. Jack		
oligo 156 rev	GATCCGTCGTATTTATAGG	Primer für die linke Grenze der T-DNA
oligo 155*	ATAACGCTGCGGACATCTAC	
oligo 86*	TCGGGCCTAACTTTTGGTG	Primer für die rechte Grenze der T-DNA
oligo 96*	AGTGCCAAGCTTGCATGC	

Tabelle 2: Verwendete Primer zur Identifizierung der Insertionsposition der „Enhancer Trap“-Konstrukte. *: Primer, die von den Herstellern der Konstrukte beschrieben worden sind.

Um die Insertionsposition in Linie UCR8 zu bestimmen, wurde die DNA mit der Restriktionsendonuklease Kpn2I (T/CGGA) geschnitten. Für die Positionsbestimmung in Linie UCR10 wurde Bsp68I (TCG/CGA) gewählt. In der ersten iPCR wurden die Primer „5RA“ und Primer „5FA“ verwendet. Das PCR-Produkt wurde anschließend 1:50 mit bidestillierten Wasser verdünnt. Ein Mikroliter der Verdünnung wurde in der zweiten PCR mit den Primern „5RI“ und „5FI“ eingesetzt.

Um die Insertionspositionen in den Linien von S. Poethig und J. Haseloff zu bestimmen, wurden je nach Linie unterschiedliche Primerkombinationen verwendet. Die mit EcoRI (G/AATTC) geschnittene und ligierte DNA aus Linie 2443 wurde in der iPCR-Reaktion mit den Primern „2443A“ und „LB1“ eingesetzt. Die DNA aus Linie 4396 wurde mit BclI (T/GATCA) geschnitten. Für die rechte Grenze der T-DNA wurden in der ersten iPCR-Reaktion die Primer „RP1“ und „FP1“ verwendet, in der zweiten die Primer „FP2“ und

„RP2“. Um die Positionsbestimmung an der linken Grenze durchzuführen, wurden die Primer Primer „RP3“ und „LB1“ sowie „FP4“ und „RP4“ verwendet. Für die Positionsbestimmung in den Linien J2111 und JR11-2 wurde AvaIII (ATG/CAT) gewählt. In der iPCR wurden „LB1“ und „RP3“ benutzt, „LB3“ und „RP3“ in iPCRII.

Zur Bestimmung der Insertionsposition in den Linien von T. Jack wurden die Produkte der ersten iPCR-Reaktion kloniert. Für die Identifizierung der Insertionsposition in Linie 1996/32 wurde die Endonuklease BamHI (G/GATCC) gewählt, um die DNA zu schneiden. Anschließend wurden die iPCR Produkte mit den Primern „oligo 86“ und „oligo 96“ erzeugt. DNA der Linie 19960/50 wurde mit dem Enzym Taq I (T/CGA) geschnitten, wie auch mit XhoI (C/TCGAG) in einem zweiten Restriktionsansatz. In der iPCR wurden die Primer „oligo 156 rev“ sowie „oligo155“ verwendet. Die DNA der Linie 31009/36 wurde mit den Restriktionsenzymen AccI und XhoI geschnitten und die Primer „oligo 156 rev“ sowie „oligo155“ in der iPCR benutzt.

II.2.3. Sequenzierung der PCR-Produkte und Plasmide

PCR-Produkte und Plasmide wurden von der Firma AGOWA (Berlin) sequenziert.

II.2.4. Herstellung von Konstrukten mittels „Gateway“-Rekombination

Um genomische Sequenzen vor das GUS-Gen des pMDC164 und des GpBI121-Vektors zu klonieren wurde das Gateway-Protokoll, wie im Handbuch von Invitrogen beschrieben, befolgt (Version E, 2003). Das System verwendet den Rekombinationsmechanismus aus dem Phagen Lambda (Landy, 1989, Ptashne, 1992). Die Rekombination findet spezifisch an den 15 bp langen *att*-Stellen statt (*attachment*). Es können die Rekombinationsstellen *attB* (aus *E.coli*) mit *attP* (aus Lambda-Phagen) reagieren (BP-Reaktion), sowie *attL* mit *attR* (LR-Reaktion). Das Reaktionsvolumen der Rekombinationsansätze wurde halbiert. Primer wurden mit den vorgeschriebenen *attB*-Rekombinationssequenzen im 5'-Bereich synthetisiert. Die PCR-Produkte wurden über ein 1%-Agarosegel gereinigt und in der BP-Reaktion eingesetzt. Dafür wurde der pDONRTM221-Vektor verwendet (Invitrogen). Die Reaktion wurde für mehrere Stunden oder über Nacht bei RT aufbewahrt. Durch Zugabe von 1 µl Proteinase K wurde die Reaktion gestoppt. Nach Inaktivierung des Enzyms wurden die BP-Reaktionen in DH5α oder TOP10- Zellen mittels Hitzeschock bei 42°C transformiert. Die Plasmide wurden auf Kanamycin selektiert. Für die LR-Reaktion wurde das Konstrukt im pDONRTM221-Vektor linearisiert. Weil der gewählte Eingangsvektor und die Zielvektoren eine Kanamycinresistenz als Selektionsmarker hatten, wurde vor der LR-Reaktion der pDONRTM221-Entry-Klon mit der Endonuklease Eam1105I geschnitten. Dies sollte

verhindern, dass in der LR-Reaktion nicht rekombinierte pDONRTM221-Plasmide als Hintergrund wachsen. Der LR-Ansatz wurde mit LR-Klonase-Mix versetzt und mehrere Stunden oder über Nacht bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde wie beschrieben gestoppt, in *E.coli* transformiert und selektiert.

II.2.5. Herstellung von Konstrukten mit amplifizierten genomischen Fragmenten

Flankierende Sequenzen der Insertion, sowie Stromaufwärtsbereiche der benachbarten Gene, wurden unter Verwendung der Phusion-Polymerase (Finnzymes, Finland) aus genomischer DNA amplifiziert (Tab.3).

Nr.	Sequenz 5'→3'	Verwendung
		UCR8
1	<u>AGAAAGCTGGGTATTACCTTCTGTTTTGTCATGTT</u>	Klonierung des 2,9 kb langen Stromaufwärtsbereichs von At4g01455 in pMDC 164.
2	<u>AAAAAGCAGGCTTGAACTCTAGAAGCAACGAG</u>	
3	<u>AAAAAGCAGGCTATTAAAGGTTGCTTCTAGAGT</u>	Klonierung des 6,4 kb langen Stromaufwärtsbereichs von At4g01460 in pMDC 164.
4	<u>AGAAAGCTGGGTAATTAGCTTCAACAAAGAAAAAAG</u>	
5	<u>ATTACCGGTTCTCAGAGGATTGGTGGTGGATAA</u>	Klonierung der 2,9 langen flankieren Sequenz der Insertion in pBIMCS3 (mit -60+1).
6	<u>ATAATCGATTTACCTTCTGTTTTGTCATGT</u>	
		J2111
7	<u>ATAATCGATTATACCGGTAAGATATCCGGGTATCTA</u>	Klonierung des 2 kb langen Stromaufwärtsbereichs von At5g17850 in pBI121.
8	<u>ATACCCGGGAAATCCCATCAATCAGCTAAG ACCTGG</u>	
		JR11-2
9	<u>ATAACCGGTAGAAAAAGAGAAAGTGAAAAGCTTCG</u>	Klonierung der 1 kb langen flankierenden Sequenz der Insertion in pBI121MCS2 (mit -60 +1)
10	<u>ATAATCGATATGTCTCCGTAGACGTTTTTC</u>	
		19956/32/7
11	<u>GGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTCGCTTTA</u> <u>TTCACCAACC</u>	Klonierung des 2,7 kb langen Stromaufwärtsbereichs von At4g00720 in pMDC 164
12	<u>GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCAAGACTGGC</u> <u>GCGTGCG</u>	
13	<u>GGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAATAAATACA</u> <u>AGAGAAGAAACT</u>	Klonierung des 1,9 kb langen Stromaufwärtsbereichs von At4g00730 in pMDC 164
14	<u>GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAGAGATCTTC</u> <u>GAGTCATGTTGAC</u>	
		19960/50/1
15	<u>GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCTCACCGACG</u> <u>TACGTTCGTGTCC</u>	Klonierung des 5,1 kb langen Stromaufwärtsbereichs von At5g19560 in pMDC 164 und GpBI121
16	<u>GGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTTCTCTTG</u> <u>CTATTGCTGCCAC</u>	
17	<u>ATAGGCGCGCCGATTTTATTCGTTGATTATACAGTAA</u>	Klonierung der 4,3 kb langen flankierenden Sequenz der Insertion in pBIMCS2II
18	<u>TTAGCGATCGCCTAGAAGGTGAAACCAACATTCT</u>	

Tabelle 3: Primer zur Amplifizierung flankierender genomischer Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana*.

Zu den amplifizierten Stromaufwärtsbereichen gehörte jeweils die Sequenz stromaufwärts des Translationsstartpunkts ATG. Verwendet wurde die isolierte DNA aus dem Wildtyp von *Arabidopsis thaliana* (Columbia). Sequenzen, die in einen Gateway-Eingangsvektor rekombiniert werden sollten, wurden mit Primern amplifiziert, an deren 5'-Enden attB-

Sequenzen angefügt worden sind. Teilweise wurden die attB-Sequenzen in zwei aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen angehängt. In der ersten PCR-Reaktion wurde nur ein Teil der attB-Sequenz angehängt, welcher in der zweiten PCR vervollständigt worden ist (Invitrogen, Gateway-Handbuch Version E, 2003). Dies sollte eine unspezifische Bindung des Primers während der PCR-Reaktion vermindern. Die attB-Sequenzen wurden in den folgenden Tabellen unterstrichen. Für die Klonierung von Sequenzen in den pBI-Vektoren wurden Restriktionsschnittstellen verwendet, die an die 5'-Enden der Primersequenzen angehängt worden sind (unterstrichen).

Um die Expressionsmuster bekannter 5'-Stromaufwärtsbereiche von Genen zu überprüfen, die als zell- oder gewebespezifisch exprimiert beschrieben worden sind, wurden die in Tabelle 4 aufgelisteten Primer verwendet. Die Sequenzen wurden aus genomischer DNA des Wildtyps von *Arabidopsis thaliana* (Columbia) amplifiziert.

Nr.	Sequenz 5'→3'	Verwendung für Amplifizierung:
19	<u>GGGGACAAGTTTGTAGAAAAAGCAGGCTTCTCTATGAAAAGTG</u> <u>GAAATTTACCTGGAA</u>	SCR 5'-Bereich (Zielvektor:GpBI121)
20	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGGAGATTGAAGGGTT</u> <u>GTTGGTCTGTG</u>	
21	<u>ATAAAGCTTTCTCTATGAAAAGTGGAAATTTACCTGGAA</u>	SCR 5'-Bereich (pBI121)
22	<u>TATCCCGGGGAGATTGAAGGGTTGTTGG</u>	
23	<u>ATAGCGATCGCCAAGAAGAGGAAAACCGTTACC</u>	APX2 5'-Bereich (pBI121MCS2II)
24	<u>ATACCCGGGTTTTTTCAAATTCGCTTCCTTCTG</u>	
25	<u>AATCCCGGGCACCCTGTTATCACCTTC</u>	CUE1 5'-Bereich (pBI121)
26	<u>ATAATCGATACGCATTATAACATTT</u>	
27	<u>AAAAAGCTTGCTAATTCCTTAGTCATCTTCGTTTGAC</u>	Sultr2;2 5'-Bereich (pBI121)
28	<u>ATACCCGGGTCAGCTCTCTCTCTAGATATATATTAAC</u>	
29	<u>ATAAAGCTTAGAGCCACGCGAATACATTAAC</u>	Sultr3;3 5'-Bereich (pBI121)
30	<u>ATACCCGGGTTAATTGGTTTTTCCTAAGAATTTTTG</u>	

Tabelle 4: Verwendete Primer zur Amplifizierung beschriebener 5'-Genbereiche mit zellspezifischer Expression.

Um Deletionskonstrukte des Stromaufwärtsbereichs des Sulfattransporters *Sultr2;2* zu erstellen (Abb. 70 und Abb. 74), wurden die in Tabelle 5 aufgelisteten Primer benutzt:

Nr.	Sequenz 5'→3'	Verwendung:
31	<u>ATACCCGGGTCAGCTCTCTCTCTAGATATATATTAAC</u>	Rückprimer für Konstrukte Sa, Sb, Sd und Sf
32	<u>TAAAAGCTTATGCATCCAAAACATGGCGCCTTCC</u>	Vorwärtsprimer für Konstrukt Sa
33	<u>TTAAAGCTTCTGATCATCTAACATTGTTGGTATGC</u>	Vorwärtsprimer für Konstrukt Sb
34	<u>TTAAAGCTTATCTCAAGCATGAGTGATAATTTCAAC</u>	Vorwärtsprimer für Konstrukt Sd
35	<u>ATAGGCGCGCCGCATACCAACAATGTTAGATGATCAG</u>	Rückwärtsprimer für Konstrukt Se und Teilsequenz im Konstrukt Sf
36	<u>ATTGGCGCGCCGATTGTAGAAATGATTATAACATTC</u>	Vorwärtsprimer für Konstrukt Sf

Tabelle 5: Primer zur Herstellung von Deletionskonstrukten des Sultr2;2- 5'-Bereichs. Unterstrichen wurden die verwendeten Schnittstellen.

Zu Beginn der Arbeiten wurden die isolierten genomischen Sequenzen, welche die „Enhancer Trap“- Konstrukte flankierten, in Gateway-Vektoren kloniert. Aufgrund der geringen Rekombinationseffizienz von Fragmenten einer Größe von mehr als drei Kilobasenpaaren,

sowie Resistenzmarkern, unter der Kontrolle eines 35S-Promotors, wurde nach Alternativen gesucht. Dafür ist der pBI121 Vektor modifiziert worden. Um die Klonierung zu erleichtern, wurden Multiple Klonierungsstellen eingefügt (Tab. 6).

Zur Erstellung eines Gateway-kompatiblen Vektors wurde die 1,7 kb lange Gateway-Kassette aus dem Vektor pMDC164, mit den Primern 37 und 38 (Tab. 6), in einer PCR-Reaktion isoliert und aufgereinigt. Der pBI121-Vektor wurde mit den Endonukleasen HindIII und SmaI geschnitten, die Vektorenden mit der Phusion-Polymerase aufgefüllt, das Vektorgerüst gereinigt und das PCR-Fragment in den Vektor ligiert.

Um einen Minimalpromotor (-60+1-Bereich des 35S-Promotors) einzufügen, wurde dieser aus der DNA einer „Enhancer Trap“-Linie von T. Jack amplifiziert (Campisi et al., 1999). Dafür wurden die Primer 39 und Primer 41 für pBI121MCS2 und Primer 40 und 41 für pBI121MCS3 verwendet. Die PCR-Produkte wurden nach Aufreinigung über eine Mini-Säule (Qiagen, Hilden) mit HindIII und XmaI geschnitten und in einen HindIII/XmaI- geschnittenen pBI121-Vektor kloniert. Um den pBI121-Vektor mit Minimalpromotor zusätzlich mit einer MCS auszustatten, in der Endonukleasen schneiden, die eine Erkennungssequenz von acht Basenpaaren besitzen, wurden die die Oligonukleotide 42 und 43 verwendet und in einen HindIII/AscI- geschnittenen pBIMCS2-Vektor ligiert. Hier handelte es sich um Schnittstellen, die aufgrund ihrer Länge, selten in der Pflanzen-DNA schneiden. Um eine MCS (*multiple cloning site*) ohne Minimalpromotor einzufügen, wurden zwei komplementäre Oligonukleotide synthetisiert, zu einem Doppelstrang zusammengefügt und in den HindIII/XmaI restringierten Vektor ligiert. Der resultierende Vektor pBI121MCS4 wurde unter Verwendung der Oligonukleotide 44 und 45 erstellt. In den pBI121MCSH2BYFP-Vektor wurde die MCS, bestehend aus den Oligonukleotiden 46 und 47 ligiert.

Nr.	Sequenz 5'→3'	Verwendung/ erstellter Vektor
37	GTGCCAAGCTCTAGTTAATTAAG	Amplifizierung der att-Kassette aus pMDC 164/ GpBI121
38	GAGGCGCGCCAAGCTATCG	
39	ATTAAGCTTACCGGTAGTACTGGCGCGCCCCACTATCCTTCGC	Amplifizierung des -60+1 Minimalpromotors/ pBI121MCS2 (HindIII/AgeI/Acc113I/AscI)
40	ATTAAGCTTACCGGTAGTACTAGGCCTCCCACTATCCTTCGC	Amplifizierung des -60+1 Minimalpromotors/ pBI121MCS3 (HindIII/AgeI/Acc113I/StuI)
41	ATACCCGGGTCTCTCCAAATGAAATGAAC	Rückprimer / pBI121MCS2 und 3
42	AGCTTGCATCGCGCCGGCCGG	Erstellung einer MCS / pBI121MCS2II (HindIII/AsiSI/FseI/AscI)
43	CGCGCCGGCCGGCCGGCGATCGCA	
44	AGCTTGCATCGCGCCGGCCGGCCGGCGCGCC	Erstellung einer MCS/ pBI121MCS4 (HindIII/AsiSI/FseI/AscI)
45	CCGGGGGCGCGCCGGCCGGCCGGCGATCGCA	
46	AGCTTGCATCGCGCGCGCCCCGGGT	Erstellung einer MCS/ pBI121MCSH2BYFP (AsiSI/AscI/XmaI/XbaI)
47	CTAGACCCGGGGCGCGCCGGCGATCGCA	

Tabelle 6: Oligonukleotide und Primer für Modifizierung des pBI121-Vektors. Unterstrichen wurden die verwendeten Schnittstellen.

Der pBI121 Vektor wurde zunächst mit den Endonukleasen HindIII und SacI restringiert und das Vektorgerüst über ein Agarosegel gereinigt. Die H2BYFP-Kassette wurde an den Schnittstellen XbaI und SacI herausgeschnitten. In einer Triple-Ligation wurden die drei Komponenten über die Kompatiblen enden HindIII, XmaI und SacI ligiert. Weil die HindIII Schnittstelle mehrmals in der H2BYFP-Kassette vorkommt, kann diese für Klonierungen nicht verwendet werden.

II.2.6. „Genome-Walking“ in *Flaveria bidentis*

Um zu überprüfen, ob der nächste Verwandte des *Sultr2;2*-Gens aus *Arabidopsis* in *Flaveria bidentis* im gleichen Muster exprimiert wird, wurde versucht, Stromaufwärtsbereiche des Sulfattransporters aus dieser Pflanze zu isolieren. Basierend auf Kontigs einer Pyrosequenzierung (Gowik & Westhoff unveröffentlicht) wurden genspezifische Primer für „Genome Walking“ erstellt. Für den Versuch wurde eine von S. Schulze (Inst. für Entw. und Mol. Biol. d. Pfl.) erstellte DNA-Bibliothek wiederverwendet. Diese Methode basiert auf der Verwendung bekannter genomischer Sequenzen, wie z. B. cDNA-Sequenzen, die genutzt werden, um flankierende unbekannte Sequenzen zu isolieren. Genomische DNA wird mit Enzymen geschnitten, die glatte Enden produzieren. Anschließend wird ein Adaptor bekannter Sequenz ligiert, in dem Bindestellen für Primer liegen. Mit Hilfe von Adaptorprimern und genspezifischen Primern wird die zwischen den Primern vorhandene Sequenz amplifiziert. Die Entstehung unspezifischer Produkte wird durch die Struktur des Adaptors unterdrückt (User Manual, Clontech, Palo Alto USA).

Die in der Tabelle 7 notierten Primer wurden in diesem Versuch verwendet.

Nr.	Sequenz 5'→3'
48	TGGTTCAATGAACTTGGATTGAGTCCT
49	CATCCGCTCTCGTTAGATCACTATC

Tabelle 7: Primer für „Genome Walking“ in *Flaveria bidentis*.

Die PCR-Produkte wurden im pJET2.1 blunt-Vektor kloniert und sequenziert.

II.2.7. Anzucht von *E.coli*

Für die Vermehrung von *E. coli* –Zellen wurde LB-Medium verwendet (*lysogeny broth*, Bertani 1951, Bertani 2004), hergestellt aus 10 g/l BactoTrypton, 5 g/l Hefe-Extrakt und 10 g/l NaCl, eingestellt auf pH 7,2. Selektionsplatten enthielten zusätzlich 1,5 % Agar-Agar (Serva) und Antibiotikallösungen, die über einen Filter von 0,22 µm Porengröße steril filtriert und dem Medium nach dem Autoklavieren hinzugefügt wurden. Die Selektion der pJET-, TOPO-, und pGEM-Vektoren erfolgte auf LB-Platten, mit 50 µg/ml Ampicilin. Der pBI121-

Vektor, sowie seine Derivate, wie auch der pMDC164-Vektor, wurden auf LB-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin selektiert.

II.2.8. Transformation von *E.coli*

Für die Klonierung und Vermehrung von Plasmiden wurden chemisch kompetente *E.coli* Stämme DH5α und DB3.1 verwendet. Diese wurden nach einer Modifikation der Kalziumchloridmethode hergestellt (Cohen et al., 1972) und anschließend in Anlehnung an die Methode von Morrison (1977), bei -80 °C für spätere Verwendung gelagert. Eine Vorkultur von 40 ml SOB-Medium (2 % Bacto-Trypton, 0,5 % Hefe-Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl) wurde unter sterilen Bedingungen mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Hauptkultur angeimpft und bis zu einer OD₅₅₀ von 0,5 inkubiert, was einer Zelldichte von 5x10⁷ Zellen/ml entsprach. Die Kultur wurde 10-15 Min. auf Eis abgekühlt. Alle Schritte erfolgten unter sterilen Bedingungen. Die Kultur wurde bei 3000 Upm und 4°C 5 Min. abzentrifugiert und das Sediment in 1/3 Volumen RF1-Medium, bezogen auf das Volumen der Hauptkultur, aufgenommen. Das RF1-Medium setzte sich zusammen aus 100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂ x 4H₂O, 10 mM CaCl₂ x 2 H₂O, 15 % (w/v) Glycerin, 30 mM Kaliumacetat und wurde durch einen Filter von 0,22 µm Porengröße sterilfiltriert. Nach einer Inkubation von 15 Min. auf Eis wurde die Suspension erneut abzentrifugiert und in 1/12 Volumen RF2-Medium, bezogen auf das Ausgangsvolumen, resuspendiert. Das RF2-Medium bestand aus 10 mM MOPS (Morpholinopropansulfonsäure), 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂ x 2H₂O und 15 % Glycerin und wurde nach Einstellen des pH-Wertes (pH 6,8) mit verdünnter NaOH-Lösung, ebenfalls sterilfiltriert. Die Suspension wurde 15 Min. auf Eis inkubiert und anschließend in 100 µl Aliquote aufgeteilt, die sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Nach Zugabe von Plasmid-DNA wurden die Zellen mehrere Minuten auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 90 Sek. bei einer Temperatur von 42°C im Wasserbad. Danach wurden die Transformationsansätze sofort auf Eis abgekühlt. Nach dem Hitzeschock wurden 400 µl LB-Medium zugegeben und die Zellen eine Stunde zur Aktivierung der Resistenz bei 37°C inkubiert. Die Selektion erfolgte auf LB-Platten mit Antibiotika.

II.2.9. Reinigung von Nukleinsäuren aus *E.coli*

Plasmid-DNA wurde aus 5 ml LB-Kultur nach dem Prinzip der Alkalischen Lyse isoliert (Birnbiom & Doly, 1979). Die Lösungen I bis III wurden jedoch in einer Zusammensetzung, wie im Jetstar- Protokoll der Firma Genomed beschrieben, verwendet. Lösung I bestand aus

50 mM Tris und 10 mM EDTA (HCl ad pH8,0). Lösung II enthielt 200 mM NaOH und 1.0 % SDS (w/v). Lösung III bestand aus 3,1 M Kaliumacetat (Essigsäure ad pH 5,5). Die Kultur wurde in mehreren Portionen in einem Eppendorfgefäß jeweils 1 Min. bei 13000 Upm in einer Tischzentrifuge sedimentiert und das Pellet in 100 µl Lösung I, die mit 100 µg/ml RNase versetzt worden ist, resuspendiert. Es wurden 200 µl Lösung II hinzugefügt und das Eppendorfgefäß mehrfach invertiert. Bei diesem Schritt erfolgte eine Zellysis, wobei die Suspension klar, aber viskos wurde. Um das Lysat zu neutralisieren, wurden 150 µl Lösung III hinzugefügt und das Eppendorfgefäß mehrfach invertiert. Das hierbei entstandene weiße Präzipitat, welches aus Zellbestandteilen und Proteinen bestand, wurde von der klaren DNA-Lösung durch eine Zentrifugation von 10 Min., bei 13000 Upm und Raumtemperatur getrennt. Der Überstand wurde jeweils in ein neues Eppendorfgefäß übertragen und durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 2,5 Volumen absoluten Ethanol gefällt. Die Proben wurden mehrfach invertiert und 10 Min. bei 13000 Upm abzentrifugiert. Die Plasmid-Pellets wurden einmal mit 70 % igem Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet und in 50 µl 1 x TE-Puffer (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH8,0) rückgelöst. Für Sequenzierung wurden ausgewählte Klone über Mini-Säulen der Firma Qiagen (Hilden) gereinigt. Plasmide geringerer Kopiezahl wurden zum Teil aus 100 ml LB-Kultur unter Verwendung der Jetstar Plasmid Midi-Säulen (Genomed GmbH, Löhne) isoliert.

II.2.10. Anzucht von Agrobakterien

Für die Anzucht von Agrobakterien wurde entweder das bereits beschriebene LB-Medium oder das YEB-Medium verwendet, bestehend aus 0,5 % Pepton, 0,1 % Hefeextrakt, 0,5 % Fleischextrakt, 0,5 % Saccharose, 2 mM MgSO₄, 2 mM MgCl₂. Nach Transformation des pBI121-Vektors und seiner Derivate in AGL1 erfolgte eine Selektion auf YEB oder LB-Medien mit 30 µg/ml Kanamycin und 50 µg/ml Carbenicillin.

II.2.11. Transformation von Agrobakterien

Die Transformation von Plasmiden in den Agrobakterienstamm AGL1 erfolgte nach dem Elektroporationsprotokoll zum Elector Cell Manipulator® 600 (BTX Inc., USA). Die Zellen wurden auf YEB- oder LB-Selektionsplatten ausgestrichen.

II.2.12. Isolation von Plasmid-DNA aus Agrobakterien

Die Isolation von Plasmid-DNA aus Agrobakterien erfolgte mit dem „Plasmid Miniprep-Kit“ (Qiagen). Nachdem ein Aliquot der Kultur für die Lagerung als Stammkultur entnommen worden ist, wurden die Zellen aus den restlichen 5 ml Kultur, in einem Eppendorfgefäß

portionsweise sedimentiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Bakteriensediment in 250 µl Puffer P1 (mit RNase) resuspendiert. Die Lysis erfolgte durch Zugabe 250 µl Puffer P2. Nach einer Inkubation von 5 Min. bei Raumtemperatur wurde die Lösung durch Zugabe von 500 µl Puffer N3 neutralisiert. Die weiteren Schritte erfolgten wie im Protokoll zum „Plasmid Miniprep-Kit“ beschrieben. Eluiert wurde das Plasmid mit 50 µl EB-Puffer, der auf 70°C vorgewärmt wurde. 15 µl des Eluats wurden in einer Restriktionsanalyse verwendet.

II.2.13. Anzucht von *Arabidopsis*

Das Saatgut wurde vor der Aussaat eine Minute mit 70 % igem Ethanol gewaschen und anschließend 5-10 Minuten in einer 25 %-igen Lösung des Dan Klorix-Hygienereinigers (Colgate Palmolive GmbH, Wien), mit 0,02 % Triton-X 100 sterilisiert. Danach wurde das Saatgut mehrmals mit sterilem bidestiliertem Wasser gewaschen, um die Klorix-Lösung zu entfernen. Die Aussaat erfolgte auf ½ MS-Selektionsplatten, einer Variante des MS-Mediums (Murashige & Skoog, 1962), mit 1% w/v Saccharose, 0,5 g/l MES, 2,35 g/l MS-Salze, 1 % w/v Agar-Agar und 50 mg/l Kanamycin, oder 20 µg/ml Hygromycin. Es wurden 100 mg/l Cefotaxim zur Hemmung des Agrobakterienwachstums hinzugefügt. Zur Brechung der Dormanz wurden die Platten zwei Tage bei 4 °C gelagert und danach in einem Gewebekulturschrank bei Raumtemperatur kultiviert. Nach vierzehn Tagen wurden transgene Keimlinge auf Erde umgesetzt, einer Mischung aus Arabidopsissubstrat/Pietal 1:1 mit *Bacillus thuringiensis*, Floraton, oder Topferde mit Toresa-Mischung. Die Pflanzen wurden in Klimakammern oder im Gewächshaus kultiviert.

II.2.14. Transformation von *Arabidopsis*

Verwendet wurde der *Arabidopsis thaliana*- Wildtyp, vom Ökotyp Columbia. Die Pflanzen wurden nach der Methode von Clough & Bent (1998) transformiert. Die Agrobakterien wurden entweder in Flüssigkultur angezogen oder auf festen YEB-Medien kultiviert (Logemann et al., 2006). Bei der Flüssigkulturmethode wurden 500 ml YEB-Medium aus einer Vorkultur angeimpft, über Nacht bei 28°C auf einem Schüttler inkubiert und am nächsten Tag in einer Zentrifuge pelletiert. Das Pellet wurde in 500 ml einer frisch angesetzten 5 %igen Saccharoselösung, mit 0,05 % (v/v) Silvet L-77 (Detergens) resuspendiert und blühende *Arabidopsis*-Pflanzen darin getaucht. Für die Kultur auf festen Medien wurden Agrobakterien aus einer Stammkultur gleichmäßig auf drei bis vier YEB-Platten ausgestrichen und drei Tage bei 28°C inkubiert. Der dichte Bakterienrasen wurde anschließend von den Platten abgeschabt und in 30 ml LB-Medium resuspendiert. Die

Suspension wurde dann in nur 120 ml der oben beschriebenen Saccharoselösung vermischt. Die Kultur der Pflanzen erfolgte bis zur Samenernte in der Klimakammer oder im Dachgewächshaus. Das Saatgut wurde sterilisiert und auf Selektionsplatten ausgelegt. Zum Teil wurde die Selektionsdauer verkürzt, indem stratifiziertes Saatgut für 6 h bei Licht, drei Tage im Dunkeln und anschließend für 24 h im Licht aufbewahrt worden ist (Harrison et al., 2006).

II.2.15. Sichtung der „Enhancer Trap“-Bibliothek von T. Jack

Eine Sammlung der „Enhancer Trap“-Pools von T. Jack (Campisi et al., 1999) wurde stichprobenartig durchsucht. Ein Pool enthielt jeweils gemischtes Saatgut von 100 Linien. Es wurde Saatgut von 33 Pools getestet. Aus jedem Pool wurde ein Aliquot Saatgut entnommen und wie bereits beschrieben sterilisiert. Das Saatgut wurde rasterartig im Abstand von 1 cm auf MS-Selektionsmedien mit 50 µg/ml Kanamycin ausgelegt (24- 110 Pflanzen pro Petrischale). Nach zwei Tagen Stratifikation bei 4 °C wurden die Petrischalen in einen Gewebekulturschrank gestellt. Nach der Selektion wurden drei Wochen alte Pflanzen auf GUS-Expression im Blatt getestet, indem Blätter unter sterilen Bedingungen mit Pinzetten entnommen und in Färbelösung übertragen wurden. Positiv getestete Pflanzen wurden auf Erde umgesetzt und bis zur Samenreife kultiviert, um Saatgut zu ernten. Dabei wurden alle Pflanzen umgesetzt, die eine GUS-Expression zeigten, unabhängig davon in welchem Gewebe des Blatts die GUS Färbung zu beobachten war. Während die Pflanzen auf Erde umgesetzt worden sind, wurden von diesen stichprobenartig Pflanzen getestet, die im ersten Test eine gleichmäßige GUS-Expression in der Blattspreite gezeigt haben. Dazu wurden Blätter entnommen und wie nachfolgend beschrieben Querschnitte angefertigt, um die Verteilung der GUS-Färbung auf zellulärer Ebene zu überprüfen. Zeigten diese einen Unterschied in adaxial-abaxialer Seite, so wurde das Saatgut der entsprechenden Pflanzen verwendet, um Pflanzenmaterial für eine DNA -Isolation zu produzieren. Die DNA wurde dann verwendet, um mit Hilfe einer iPCR die Insertionsposition des “Enhancer Trap“ -Konstrukts zu finden.

II.2.16. *In situ*-Nachweis der β-Glucuronidaseaktivität in transgenen Pflanzen

Um die Expression der GUS-Konstrukte in den Blättern von *Arabidopsis* nachzuweisen, wurden ganze Blätter oder mit einer Rasierklinge angefertigte Blattquerschnitte untersucht, sowie teilweise Keimlinge und Wurzeln. Die Aktivität wurde in Anlehnung an die Methode von Jefferson (Jefferson & Kavanagh, 1987) bestimmt. Die Proben wurden in 100-400 µl Inkubationsmedium überführt, bestehend aus 100 mM Na-Phosphat-Puffer, (pH 7,0), 10 mM

EDTA, 0,5 mM $K_4Fe(CN)_6$, 0,5 mM $K_3Fe(CN)_6$, 0,1 % Triton X-100 und 1 mM X-Gluc (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Glucuronid). Mit Hilfe einer Vakuumentrifuge wurde die Lösung infiltriert, indem 10 Mal für 30 Sek. ein leichtes Vakuum angelegt wurde. Anschließend wurden die Proben bei 37°C mehrere Stunden, bis drei Tage, bis zu einer sichtbaren Färbung inkubiert. Gefärbte Präparate wurden mit einer Mischung von Ethanol (3 Teile) und Essigsäure (1 Teil) versetzt und 10 Min. inkubiert, um die Reaktion zu stoppen und das Gewebe zu fixieren. Das Chlorophyll wurde mit 70 %igem Ethanol, das mehrfach gewechselt wurde, entfernt.

II.2.17. Herstellung von Proteinextrakten für GUS-Fluorimetrie

Für den quantitativen Nachweis der GUS-Aktivität wurden Proteinrohextrakte aus Blattmaterial hergestellt. Pro Pflanze wurden zwei bis drei Blätter geerntet, im flüssigen Stickstoff schockgefroren und anschließend mit 150 μ l Extraktionspuffer versetzt. Die Zusammensetzung des Extraktionspuffers war: 100 mM Na_2HPO_4 (pH 7,5), 1 mM EDTA, 0,1 % (w/v) Na-Laurylsarcosinat, 0,1 % (w/v) Triton X-100 und 20 % (v/v) Methanol. Die Proben wurden sofort mit Hilfe eines motorbetriebenen Pistills homogenisiert, anschließend 10 Min. bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß übertragen. Bis zur Messung wurden die Proben auf Eis gelagert. Längere Lagerung erfolgte bei -80 °C.

II.2.18. Bestimmung des Gesamtproteingehaltes

Die Proteinkonzentration in den Extrakten wurde nach der Bradford-Methode bestimmt (Bradford, 1976). Zur Ermittlung der Proteinkonzentrationen wurde eine Eichkurve aufgenommen. Hierbei wurde Rinderserumalbumin (BSA), in den Konzentrationen 0; 0,1-0,6 mg/ml Extraktionspuffer verwendet. Jeweils 20 μ l der BSA-Eichlösungen, sowie der Proteinextrakt-Verdünnungen (1:10 Extraktionspuffer), wurden mit 1 ml Bradford-Lösung gemischt. Nach 10 Minuten wurden die Proben bei 595 nm gegen eine Blindprobe (Extraktionspuffer) gemessen. Gemessen wurden die Proben am Lambda 25 UV/VIS Spektrometer, (Perkin Elmer Instruments Massachusetts, USA) mit dem dazu gehörenden Programm Lambda 25 UV WIN LAB, Version 2.85.04 (Copyright 2000, Perkin Elmer Inc.).

II.2.19. Messung der β -Glucuronidaseaktivität in transgenen Pflanzen

Um die Expressionstärken der GUS-Konstrukte miteinander vergleichen zu können, wurde die Glucuronidaseaktivität in Proteinrohextrakten von *Arabidopsis*-Blättern gemessen. Die Proteinkonzentration in den isolierten Proteinextrakten wurde auf 0,5 μ g/ μ l mit Extraktionspuffer eingestellt. Das Reaktionsmedium, bestehend aus 200 μ l 1 mM 4-

Methylumbelliferon- β -D-Glucuronid (MUG) im Extraktionspuffer, wurde auf 37°C vorgewärmt. Die Messung wurde durch Zugabe von 10 μ g Protein zum Reaktionsmedium gestartet. Um den Verlauf der Reaktion zu dokumentieren, wurden zu fünf Zeitpunkten jeweils Aliquots von 40 μ l entnommen und in 960 μ l vorgelegtes 0,2 M Na₂CO₃ übertragen, um die Reaktion zu stoppen. Bis zur Messung wurden die Proben dunkel aufbewahrt. Um die Menge an entstandenem Produkt zu bestimmen, wurde eine Eichreihe mit dem Reaktionsprodukt 4-Methylumbelliferon (MU) aufgenommen. Dafür wurden 0; 0,1 μ M; 0,5 μ M und 1 μ M- Eichproben durch Verdünnung einer 10 mM Stammlösung mit 0,2 M Na₂CO₃ hergestellt. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte mit dem BIORAD VersaFluorTM – Fluorometer. Für die Anregung wurde ein Filter verwendet, der für Licht der Wellenlänge von 340 - 380 nm passierbar war. Die Emission wurde detektiert unter Verwendung eines Filters, der Fluoreszenz zwischen den Wellenlängen 455 - 465 nm sichtbar machte. Alle gemessenen Werte wurden in dem Programm Excel graphisch aufgetragen, die Enzymaktivität errechnet und in einem Diagramm dargestellt.

II.2.20. Nachweis der GFP-Expression in „Enhancer Trap“-Linien

Der Nachweis der GFP-Expression erfolgte am Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss Axiophot). Hierbei wurde die Eigenschaft des Chromophors genutzt grünes Licht zu emittieren, wenn es mit UV-Licht oder kurzwelligem Blaulicht angeregt wird. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe der integrierten Kamera angefertigt (Olympus DP50). Angeregt wurden die Proben mit UV-Licht unter Verwendung von 450 - 490 nm und 395 - 440 nm BP (band pass) Filtern. Um die Chlorophyllfluoreszenz (670-700 nm) zu detektieren, wurden Filtersets verwendet, bei denen gleichzeitig auch die GFP-Fluoreszenz beobachtet werden konnte. Desweiteren wurden Aufnahmen mit einem Filter gemacht, der nur die GFP-Fluoreszenz (510 nm) sichtbar machte.

III. Ergebnisse:

III.1. Überprüfung beschriebener Expressionsmuster in „Enhancer Trap“-Linien mit Reporterexpression im Blatt

Um Linien zu finden, die eine zellspezifische Reporterexpression im Blatt zeigen und daher verwendet werden könnten, um zellspezifische „Enhancer“ für Palisadenparenchym, Schwammparenchym oder Bündelscheidenzellen zu isolieren, wurden ausgesuchte Linien untersucht, bei denen eine Expression im Blatt beschrieben worden ist. Hierbei wurden „Enhancer Trap“-Linien von drei verschiedenen Herstellern untersucht, die unter Verwendung von vier verschiedenen „Enhancer Trap“-Konstrukten erzeugt worden sind (Sundaresan et al., 1995; Geisler et al., 2002; <http://enhancertraps.bio.upenn.edu>, 2002). Drei der verwendeten Konstrukte wurden in Abbildung 4 dargestellt. Bei dem vierten verwendeten Konstrukt handelte es sich um ein „Gene Trap“-Konstrukt (GT). In den Tabellen 8, 9 und 10 sind die beobachteten Expressionsmuster in Blättern der untersuchten „Enhancer Trap“-Linien zu finden, im Vergleich mit den in der TAIR-Datenbank beschriebenen Expressionsmustern.

Donor: R. Martienssen, „Enhancer Trap“-Konstrukt: DSE, Reporter: GUS		
Nr.	Beschriebene Expression	Beobachtete Expression
cs25504/ ET84	Überall im wachsenden Blatt; Mittelrippenregion.	Keine Färbung beobachtet.
cs25513/ ET1118	Sprossapex, überall in Blattprimordien und Blättern, Petiolen.	Sprossapex, Blattprimordien, Leitbündel, Kotyledonen. Unterschied: In Rosettenblättern in Zellen des Mesophylls um Leitbündel herum.
cs25527/ ET3220	Überall in der Epidermis: Kotyledonen, Blätter.	Epidermis der Kotyledonen und Blätter.
cs25616/ GT16	Sprossapex, überall, Gefäßsystem, überall im Blatt.	Im Inneren des Sprossapex, nicht in den Tunikanschichten, nicht in Blattprimordien. Unterschied: Keine Färbung im Gefäßsystem
cs25620/ GT70	Sprossapex, überall, Blattprimordien, Gefäße, Trichome	Gefäße, Trichome. Unterschied: GUS-Färbung auch in Kotyledonen, Hypokotyl, auch teilweise im Mesophyll. Keine Färbung in Blattprimordien oder Sprossapex.
cs25644/ GT2275	Überall im Sprossapex, Blattprimordien, Stipeln, Überall in Kotyledonen, Epidermis, Hydathoden.	Keine Färbung beobachtet.
cs25512/ ET1099	Im Sprossapex, in Blattprimordien, in Hydathoden.	Hydathoden. Unterschied: Keine Expression in Sprossapex oder Blattprimordien.

Tabelle 8: GUS-Expressionsmuster in Blättern untersuchter „Enhancer Trap“ und Gene Trap“-Linien von R. Martienssen (<http://genetraps.cshl.org/>). ET: „Enhancer Trap“-Linie, GT: „Gene Trap“-Linie, cs: Katalognummer bei NASC/ABRC.

In der Tabelle 8 beschriebenen Linien wurden auf ½ MS-Medien mit Kanamycin ausgesät und waren alle transgen. Von jeder Linie wurden vier Pflanzen nach der Selektion, auf Erde umgesetzt, um Blattquerschnitte anzufertigen und um Saatgut zu gewinnen. Nur in der Linie ET3220 konnte das beschriebene Expressionsmuster bestätigt werden. Dort war eine zellspezifische GUS Färbung in Epidermiszellen zu beobachten. Laut Angaben des

Herstellers befindet sich die Insertion an Position 7900542, im Gen At1g22380, einer UDP-Glucose-Glucosyltransferase (<http://genetrapp.cshl.org/>). Die Linie ET1099 zeigte eine zellspezifische GUS-Färbung in den Hydathoden. Erwartet war auch eine Expression im Sprossapex und Blattprimordien, die nicht bestätigt werden konnte. Die Insertionsstelle befindet sich auf Chromosom 3, an Position 3124996, stromaufwärts des Gens At3g10116, eines unbekanntes Proteins.

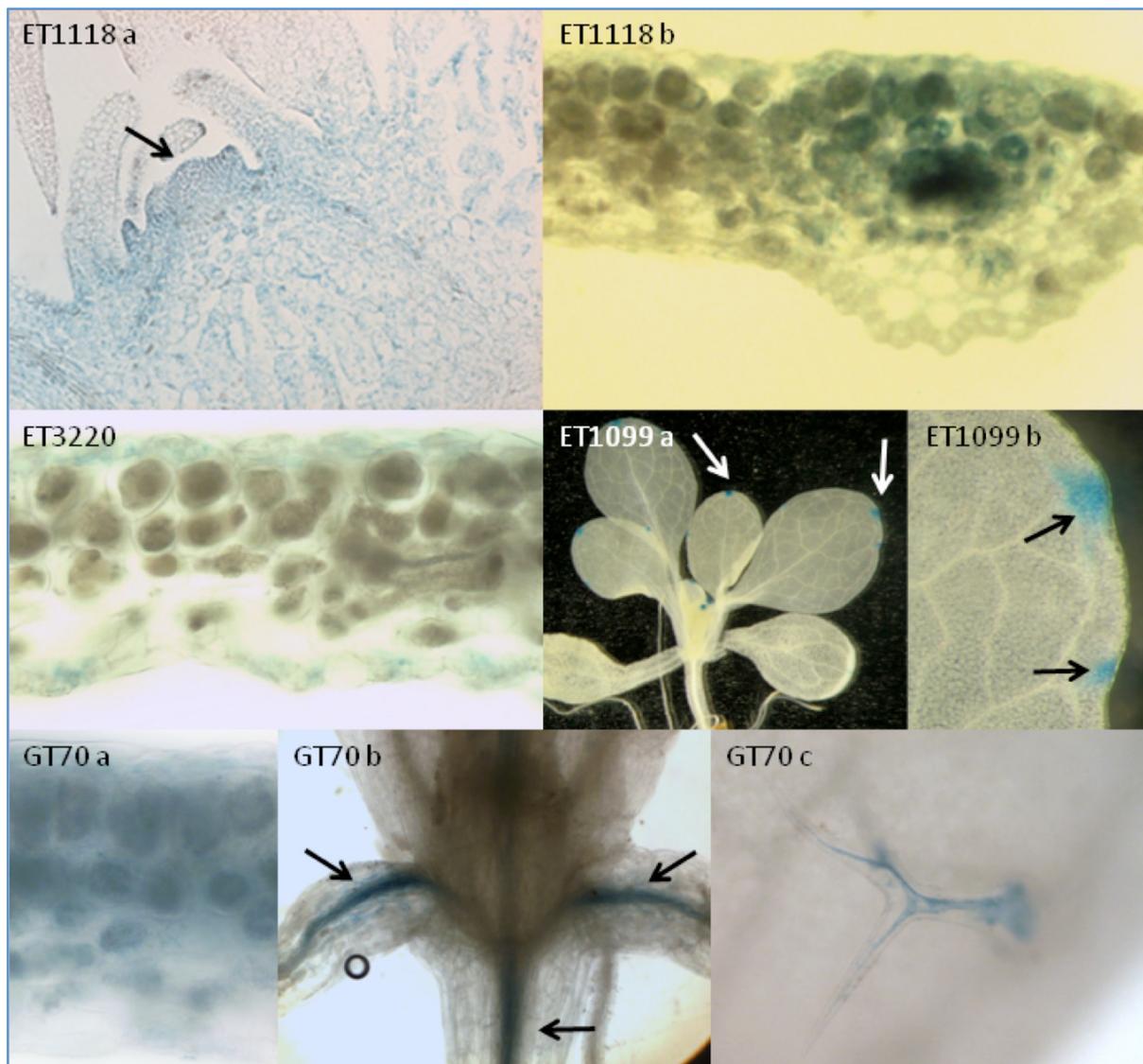


Abbildung 5: Expressionsmuster in untersuchten Linien von R. Martienssen. ET1118 a: Gefärbter Sprossapex im Längsschnitt (Pfeil: Sprossapikalmeristem). ET1118 b: GUS-Färbung in Umgebung eines Leitbündels im Blattquerschnitt. ET3220: GUS-Expression in Epidermis. ET1099 a und b: GUS-Expression in Hydathoden (Pfeile). GT70 a: Blattquerschnitt mit unspezifischer GUS-Färbung. GT70 b: Färbung in Leitbündeln (Pfeile). GT70 c: Gefärbtes Trichom.

Die Insertionspositionen in diesen Linien wurden nicht überprüft, da diese Linien keine für diese Arbeit bedeutenden Expressionsmuster zeigten.

Desweiteren wurden vierzehn UCR-Linien (*University of California Riverside*) durchmustert, die in Tabelle 9 aufgelistet sind. Die meisten beobachteten Expressionsmuster weichen in Details von den beschriebenen Mustern (Geisler et al., 2002) ab.

Donor: P. Springer, Geisler		
Nr.	„Enhancer Trap“-Konstrukt: DSE, Reportergergen: GUS, Beschriebene Expression	Beobachtete Expression
cs31309/UCR1	Reife Trichome, Elongationszone in der Wurzel.	Reife Trichome. Unterschied: Keine Expression in Wurzeln.
cs31310/UCR2	Trichome in allen Stadien, Wurzelhaare.	Epidermis der Wurzeln und Haarwurzelszellen Unterschied: nur in frühen Trichomstadien.
cs31311/UCR3	Schließzellen im Blatt, Gefäße in Wurzeln.	Schließzellen im Blatt. Unterschied: in Adern der Kotyledonen aber nicht in Wurzeln.
cs31312/UCR4	Stipeln, Elongationszone in Wurzeln.	Stipeln. Unterschied: Mesophyll der Kotyledonen, keine Expression in Wurzeln.
cs31313/UCR5	Epidermis der Kotyledonen.	Teilweise Epidermis der Kotyledonen. Unterschied: Färbung im Hypokotyl.
cs31314/UCR6	Kotyledonen und Blattmesophyll.	Kotyledonenrand und Mesophyll. Unterschied: Im reifen Blatt keine Expression.
cs31315/UCR7	Xylem in Differenzierung.	Keine Färbung beobachtet.
cs31316/UCR8	Im Phloem der gesamten Pflanze, in Wurzel im Pericykel und Phloem.	Unterschied: Nicht nur im Phloem: In allen Zellen der Leitbündel im Gefäßsystem der ganzen Pflanze (Spross und Wurzel) und in Bündelscheidenzellen.
cs31317/UCR9	Gefäße in der Entwicklung.	Leitbündel im Keimling. Unterschied: Färbung auch im Mesophyll in der Umgebung der Gefäße junger Blätter.
cs31318/UCR10	Prä-Mittelrippenregion der Blattprimordien.	Entstehende Mittelrippenregion in Blattprimordien.
cs31319/UCR11	Epidermale Zellen an der Basis der Blattprimordien.	Epidermale Zellen an der Basis der Blattprimordien. Unterschied: Auch in Zellen des Sprossapex.
cs32920/UCR12	Trichome, Stipeln, Hypokotylgefäße, Grenzen der Petiolen.	Keine Färbung beobachtet.
cs31321/UCR13	Oberer Teil des Hypokotyls, Petiolen der Kotyledonen und Hydathoden.	Oberer Teil des Hypokotyls, Hydathoden der Kotyledonen, teilweise Petiolen. Unterschied: Mittelrippenbereich der Blätter.
cs31322/UCR14	Hypokotyl und Petiolenadern.	Keine Färbung beobachtet.
cs31323/UCR15	Überall, nicht in Blattprimordien.	Keine Färbung beobachtet.
cs31324/UCR16	Blattspreite, nicht in Gefäßen.	Leichte Färbung um Leitbündel herum.
cs31327/UCR19	Wurzelendodermis, keine Expression im Spross des Keimlings.	Wurzelemdodermis.
cs31329/UCR21	Äußere Schichten des Wurzelzylinders, Leitgefäße	Unterschied: Wurzelspitzen, Meristematische Bereiche der Wurzel

Tabelle 9: GUS-Expressionsmuster in UCR-Linien. Aufgelistet sind die beschriebenen GUS-Expressionsmuster (Geisler et al., 2002) im Vergleich zu den beobachteten. Fett gedruckt dargestellt wurden Nummern der Linien, die für weitere Untersuchung gewählt worden sind.

Elf Linien zeigten die beschriebene Expression, wobei eine Varianz in den Expressionsmustern fast immer zu beobachten war. Die Sammlung der UCR-Linien beinhaltet eine Reihe von Linien, die das GUS-Reportergergen zellspezifisch im Blatt exprimieren. In der Abbildung 6 sind Linien zusammengestellt worden, die eine beobachtete GUS-Expression zeigten, jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht werden sollten.

Die Linien UCR1 und 2 zeigten eine GUS-Expression nur in Trichomen, Linie UCR3 nur in Spaltöffnungen.

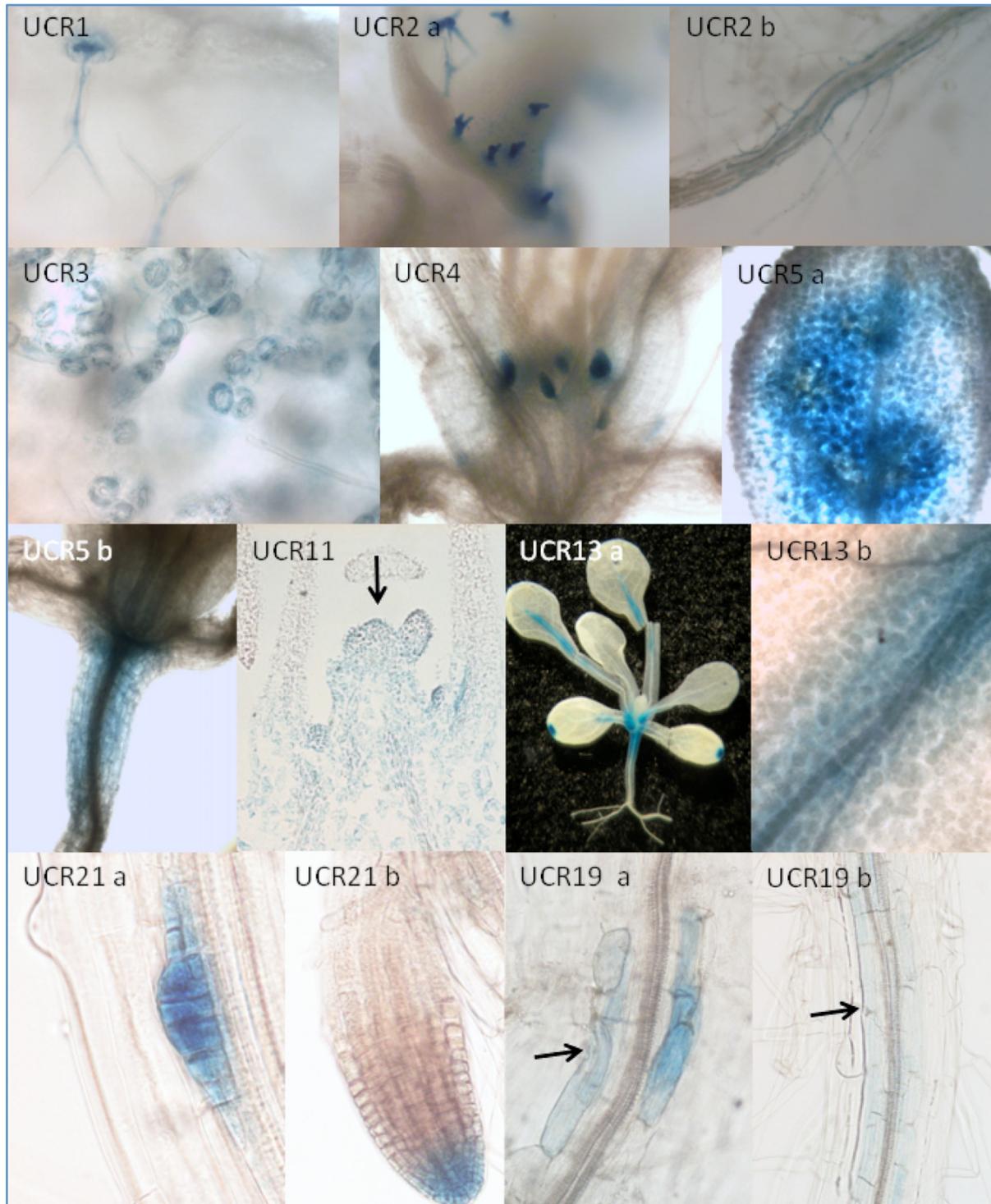


Abbildung 6: GUS-Expressionsmuster in den Linien von P. Springer. UCR1: Gefärbtes Trichom. UCR2 a: entstehende Trichome. UCR2 b: GUS-Färbung in Wurzelepidermis. UCR3: Schließzellen. UCR4: Petiolen. UCR5 a: GUS-Expression in Kotyledone. UCR5 b: gefärbtes Hypokotyl. UCR11: Längsschnitt durch ein Sprossapikalmeristem (Pfeil). UCR13: Gefärbte Hydathoden, Mittelrippen und Hypokotyl. UCR13 b: Aufsicht auf gefärbte Mittelrippe. UCR21 a: GUS-Expression im seitlichen Wurzelmeristem. UCR21 b: GUS-Expression in Wurzelspitze. UCR19 a: Gefärbte Endodermis an Grenze zwischen Wurzel und Hypokotyl. UCR19 b: GUS-Expression in Wurzelendodermis.

Über die Linie UCR19 war bisher bekannt, dass die GUS-Expression in der Endodermis zu finden war. Dies konnte auch bestätigt werden. Bisher sind GUS-Expressionsmuster in Keimlingen und Infloreszenzen beschrieben worden, aber nicht in Rosettenblättern (Geisler et al., 2002). Diese Linie wurde untersucht, um zu überprüfen, ob die Bündelscheidenzellen im Blatt, das Äquivalent zu den Endodermiszellen der Wurzel sind und in beiden eine GUS-Expression zu beobachten ist. Es konnte jedoch auch nach drei Tagen Inkubation in der Färbelösung keine GUS-Expression im Blatt beobachtet werden. Das Expressionsmuster war in diesem Fall wurzelspezifisch und die Frage mit Hilfe dieser Linie nicht zu beantworten.

Über die Linie UCR21 ist bisher berichtet worden, dass die GUS-Expression in Leitbündeln der Blätter zu finden war, sowie in den äußeren Schichten des Wurzelzylinders. (Geisler et al., 2002). Das Muster wurde nicht bestätigt. Hier färbten nur meristematische Bereiche in der Wurzel. Im Spross war keine GUS-Färbung zu beobachten.

Aus Mangel an gesuchten Linien, die zellspezifisch im Mesophyll (Palisadenparenchym und Schwammparenchym) von Blättern exprimierten, wurden zunächst drei Linien aus der Sammlung der UCR-Linien für eine nähere Betrachtung ausgewählt. Eine der Linien war UCR10, mit einer GUS-Expression nur in den Blattprimordien. Die zweite Linie war UCR8, mit einer GUS-Expression in Leitbündeln und Bündelscheidenzellen. Als dritte Linie wurde UCR9 gewählt, bei der neben den Leitbündeln, ähnlich wie bei UCR8, die den Leitbündeln benachbarten Zellen gefärbt worden sind, wobei die Färbung nicht auf Bündelscheidenzellen begrenzt war.

Neben den hier vorgestellten „Enhancer Trap“-Linien bei denen das Expressionsmuster des GUS-Reportergens beobachtet werden konnte, wurde eine Reihe von „Enhancer Trap“-Linien untersucht, die unter Verwendung eines GFP-Reportergenkonstrukts (Haseloff, 1999) hergestellt worden sind (<http://enhancertraps.bio.upenn.edu>, 2002). Von den sechzehn untersuchten Linien zeigten nur elf eine zellspezifische Expression in den Geweben des Blatts. Linien, deren Nummern in der Tabelle 10 fett gedruckt dargestellt worden sind, wurden für eine genauere Betrachtung der Expressionsmuster ausgewählt. Linien, deren GFP-Expression dokumentiert werden konnte, sind in Abbildung 10 zusammengestellt. In den folgenden Abbildungen wurde ein Filter zur Darstellung der Chlorophyllfluoreszenz verwendet, wobei die GFP-Fluoreszenz gleichzeitig zu beobachten war (Chl/GFP), sowie ein Filter durch den nur die GFP-Fluoreszenz zu sehen war (GFP). Desweiteren wurden Durchlichtbilder (D) aufgenommen, um die Blattmorphologie besser erkennen zu können.

Donor: J.Haseloff/ S. Poethig/ J.Runions/ E.Truernit		
Nr.	„Enhancer Trap“-Konstrukt: GAL4-VPI6/UAS GAL4-mgfp5-ER, Beschriebene Expression	Beobachtete Expression
N70030/ 361	Hypokotyl, Wurzel, Stomata, Mesophyll/ Gefäßsystem. Keine Expression in der Epidermis reifer Blätter. Die Expressionsmuster in F4-Pflanzen variieren.	In Leitbündeln sehr hohe Expression, Mesophyll, Epidermis. Unterschied: Auch in der Epidermis reifer Blätter.
N70094/ 1356	In Wurzelspitze und Kappe, in Hydathoden, Gefäßen und Mesophyll, Epidermis, Hypokotyl, Kotyledonen, Blattprimordien.	In Mesophyll, stärker im Schwammparenchym und um Leitbündel herum, Wurzelspitzen, Kappen. Unterschied: Keine Expression in Leitbündeln.
N70095/ 1361	Leichte Expression im Hypokotyl, Kotyledonen, Blättern, Gefäßsystem, Mesophyll, Wurzeln.	Unterschied: Fluoreszenz nur in Trichomen sichtbar.
N70116/1663	Überall im Spross, im Hypokotyl, Kotyledonen, Blättern, Gefäßsystem, Epidermis, im Blattprimordium des Keimlings, in der Rosette in der Epidermis, Mesophyll, in reifen Blättern in der Mittelrippenregion.	Überall schwach, im Leitbündel stärkere Fluoreszenz. Unterschied: Im Keimling keine Expression.
N70128/1785	Mesophyll der Kotyledonen und der Rosettenblätter, in der Meristemregion der Blattprimordien. Schwach im Gefäßsystem	Mesophyll, um Leitbündel herum, nicht in Epidermis, stärker im Schwammparenchym.
N70168/ E2443	Gefäßsystem, Hypokotyl, Wurzelkortex, Mesophyll der Kotyledonen, Hydathoden, Adern Junger Blätter, Mesophyll älterer Blätter	In Leitbündel stark, in Palisadenparenchym, zuweilen auch über der unteren Blattepidermis, in Leitbündel auch in Wurzeln. Teilweise nur in Leitbündeln.
N70250/ E4295	Blattprimordien im Keimling, Hydathoden, Mesophyll der Rosette, Gefäße.	Nur sehr schwach sichtbar in Blattprimordien. Unterschied: Keine weitere Expression.
N70252/ E4396	Epidermis der Kotyledonen und Hypokotyl in Keimlingen, schwach in Wurzelhaaren, hell in Wurzelspitzen. Schwach in Blattprimordien. In der Rosette im Mesophyll, Gefäßen, Hydathoden.	Wurzelspitzen, überwiegend Schwammparenchym der Rosettenblätter, hell in der Nähe der Leitbündel, schwach in Gefäßen. Unterschied: Keine Expression in Wurzelhaaren.
N70078/1161	Atrichoblasten der Wurzel, im Hypokotyl und Epidermis der Kotyledonen. Epidermis der Blätter, Schließzellen, Hydathoden, Blattspitzen.	Epidermis, Schließzellen, Wurzelepidermis, Blattspitzen, Hydathoden.
N70149/ E1368	Möglicherweise un stabile Expression. Blattränder der Kotyledonen und Blätter. Hydathoden, Epidermis der Rosettenblätter, in Brakteen.	Keine Expression beobachtet.
N70160/ E2207	Nur im Spross, nicht in der Wurzel, in Epidermis, Stomata, Hydathoden, nicht in Gefäßen.	In Epidermis, Schließzellen, Hydathoden. Unterschied: auch in Gefäßen.
N70265/ E4722	In Schließzellen der Kotyledonen, schwach in Epidermis, Wurzelspitzen, Blattprimordien. In Schließzellen und Epidermis von Rosettenblättern und Brakteen.	In Schließzellen und in der Epidermis. Unterschied: Expression in Wurzeln und Primordien nicht beobachtet.
N70276/ E4970	Mesophyll, Hypokotyl, Stipeln, an Blattprimordien, Epidermis, Hydathoden, Gefäßen.	Mesophyll, Epidermis, Leitbündel, Hydathoden, Blattprimordien, Stipeln, Gefäßen.
J2111	Bündelscheidenzellen in Blättern, nicht in Leitbündeln, nicht in Mesophyll.	Bündelscheidenzellen, möglicherweise teilweise im Phloem.
JR11-2	Schwammparenchym, nicht im Palisadenparenchym, nicht in Gefäßen.	Expression im Schwammparenchym, mit dem Alter der Blätter verblassend.
1744	Palisadenparenchym, nicht im Schwammparenchym.	Palisadenparenchym.

Tabelle 10: Beobachtete GFP-Expressionsmuster im Vergleich zu den bekannten Expressionsmustern in „Enhancer Trap“-Linien. Zur Herstellung dieser Linien wurde ein GFP-Reportergenkonstrukt verwendet (Haseloff, 1999), <http://enhancertraps.bio.upenn.edu>, 2002.

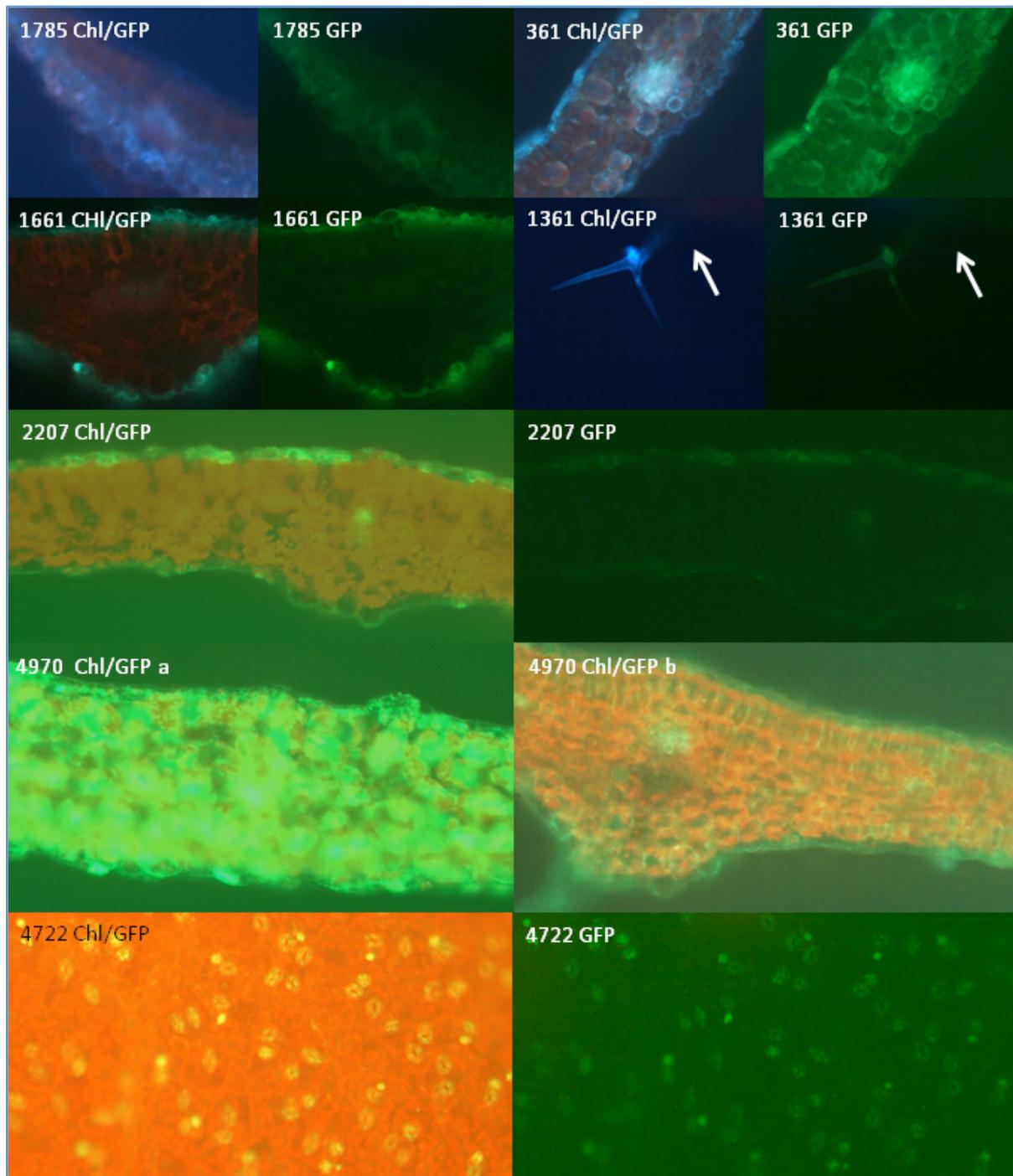


Abbildung 7: GFP- Expressionsmuster in „Enhancer Trap“-Linien von S. Poethig und J. Haseloff. 1785: Querschnitt durch ein Blatt mit GFP-Expression im Bereich der Mittelrippe und des Schwammparenchyms. 361: Querschnitt durch ein Blatt mit GFP-Expression im Leitbündel, Epidermis und Mesophyll.1661: GFP-Expression in Epidermis. 1361: Expression in Trichomen. Der Pfeil markiert die Basis des Trichoms. 2207: Expression in Epidermis. 4970 a: Hohe GFP- Expression in allen Zellen eines Blattquerschnitts. 4970 b: Geringe GFP-Expression im reifen Blatt der Linie 4770. 4722: GFP-Fluoreszenz in Schließzellen. Chl: Chlorophyll-Filter; GFP: GFP-Filter.

III.1.1. Linie UCR8: GUS-Expressionsmuster in Leitbündeln und Bündelscheidenzellen

Beschrieben wurde die GUS-Expression in der „Enhancer Trap“-Linie UCR8 im reifen Phloem des gesamten Sprosses, sowie im Phloem und Perizykel der Wurzel nach 48 h Färbung (Geisler et al., 2002). Dies konnte nicht bestätigt werden. In den untersuchten

„Enhancer Trap“-Pflanzen konnte die Expression dagegen im ganzen Leitbündel beobachtet werden, sowie in den angrenzenden Bündelscheidenzellen (vgl. Abb. 8). Wiederholungen der GUS-Färbung mit Pflanzen aus dem Originalsaatgut und Folgegenerationen zeigten eine starke Varianz in der Expression des Reporter-genkonstrukts. Teilweise färbten die Pflanzen nur im Hypokotyl und Leitbahnen der Wurzel, teilweise, wie beschrieben im Phloem der Blätter (Geisler et al., 2002). Die gefärbten Keimlinge und Blätter zeigten nach 8 h bis 20 h eine GUS-Expression im gesamten Leitbündel und Bündelscheidenzellen (Abb. 8).

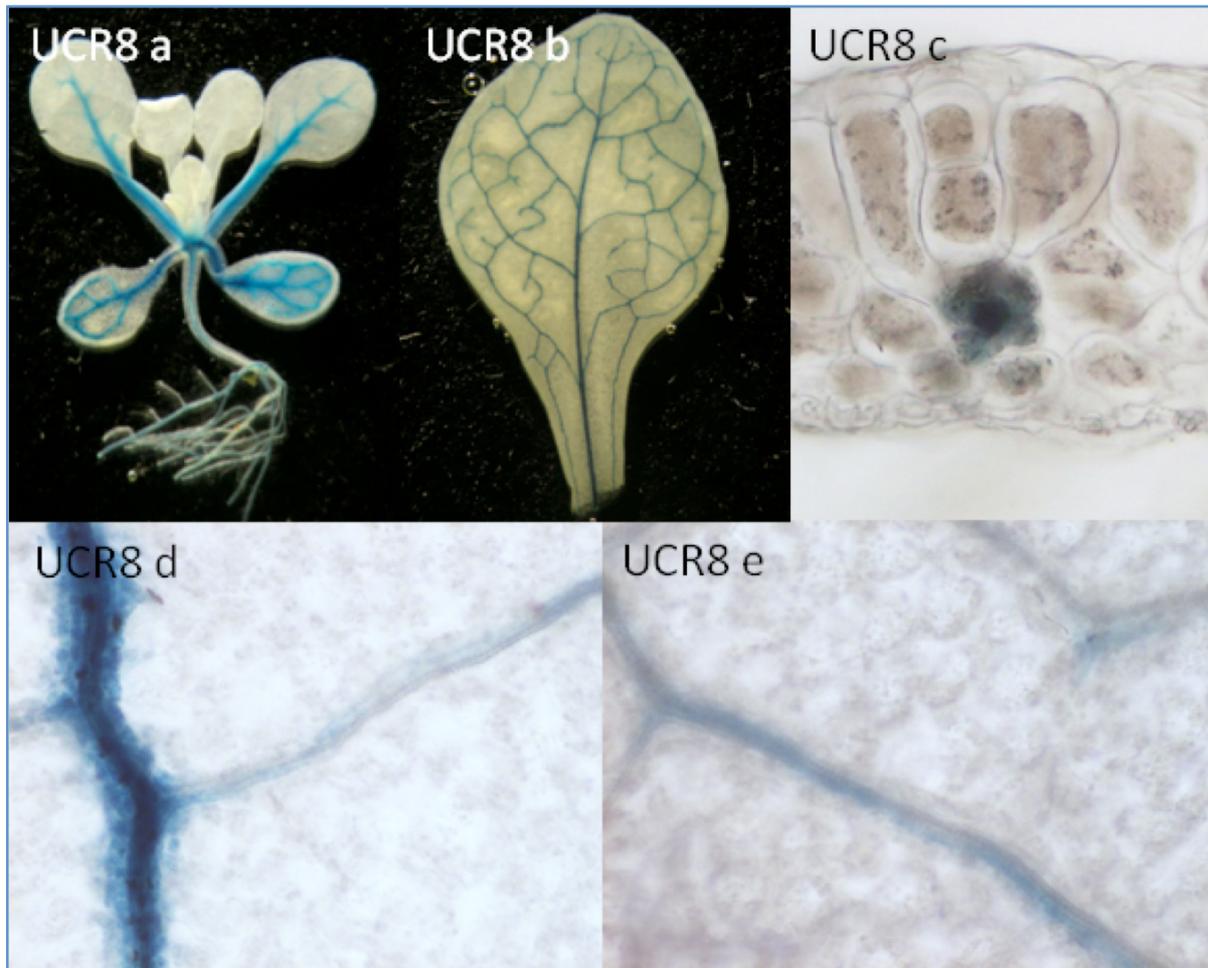


Abbildung 8: Expressionsmuster des GUS-Reportergens in der „Enhancer Trap“-Linie UCR8. UCR8 a: GUS-Expression im Habitus. UCR8 b: Gefärbtes Blatt in Aufsicht. UCR8 c: Querschnitt durch ein Blatt mit gefärbten Leitbündeln und Bündelscheidenzellen. UCR8 d: Aufsicht auf ein Leitbündel mit teilweise gefärbten Bündelscheidenzellen. UCR8 e: Expressionsmuster im Leitbündel und nicht in den Bündelscheidenzellen.

III.1.2. Linie UCR9: GUS-Expression in Leitbündeln und benachbarten Zellen

Wie in Abbildung 8 zu sehen, zeigten etwa drei Wochen alte Pflanzen der Linie UCR9 ein der Linie UCR8 verwandtes GUS-Expressionsmuster (Abb. 9).

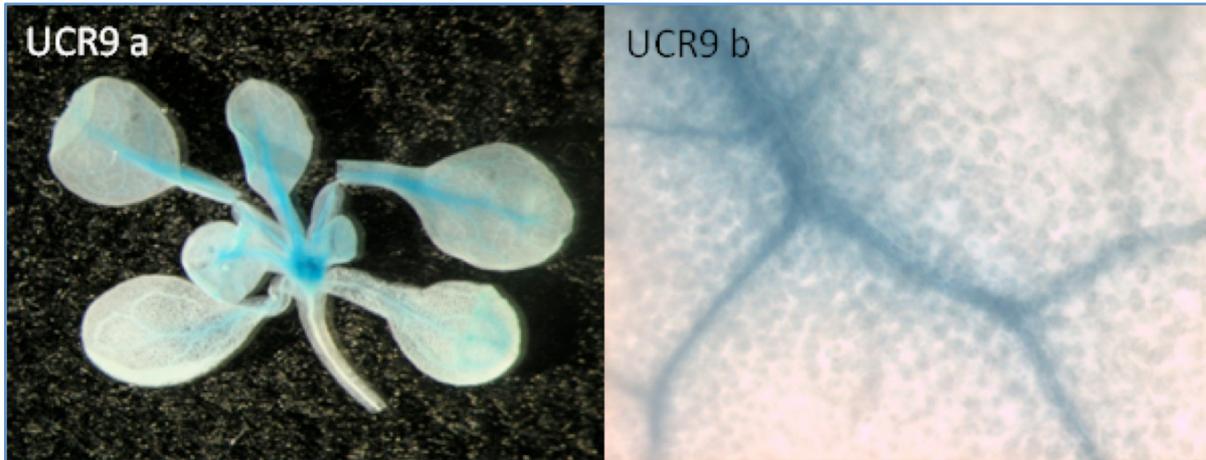


Abbildung 9: GUS-Expression in Leitbündeln und benachbarten Zellen der Linie UCR9. UCR9 a: Habitus mit gefärbten Leitbündeln. UCR9 b: Aufsicht auf ein gefärbtes Leitbündel.

Die Färbung war ebenfalls in den Leitbündeln zu beobachten. Im Unterschied zu dem Expressionmuster der Linie UCR8 war die GUS-Färbung in der Nähe der Adern nicht auf Bündelscheidenzellen begrenzt, sondern zeigte eine gradientenartige Ausbreitung ins Mesophyll.

III.1.3. Linie UCR10: GUS-Expression in Blattprimordien

In Linie UCR10 war die GUS-Expression im Bereich der entstehenden Mittelrippe der Blattprimordien zu beobachten (Abb. 10). Später in der Entwicklung der Blätter konnte eine gerade noch sichtbare GUS-Färbung stellenweise noch im Bereich der Leitbündel beobachtet werden. In allen anderen Teilen der untersuchten Pflanzen war keine GUS-Färbung zu beobachten.

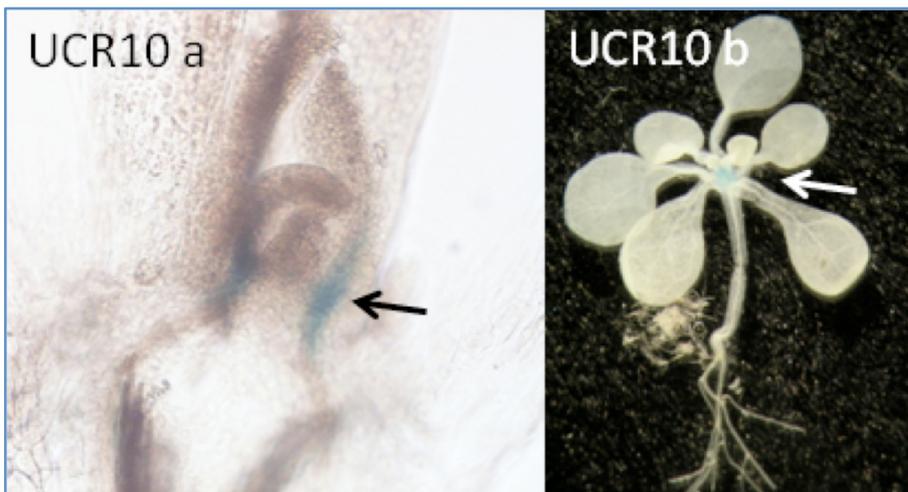


Abbildung 10: „Enhancer Trap“-Line UCR10. Längsschnitt durch eine Sprossspitze mit GUS-Färbung im Bereich der Mittelrippe der Blattprimordien (a). Ein Pfeil markiert die gefärbte Entstehungszone der Mittelrippe. Habitus einer UCR10-Pflanze mit GUS-Färbung im Bereich des Sprossapex (b).

III.1.4. Linie 1356: GFP-Expression in Bündelscheidenzellen und Schwammparenchym

Die GFP-Fluoreszenz konnte in Blattquerschnitten von Pflanzen der Linie 1356 in den Bündelscheidenzellen beobachtet werden. Oft wurde gleichzeitig auch eine verstärkte GFP-Fluoreszenz in den Zellen des Schwammparenchyms detektiert (Abb. 11). Diese Zweiteilung des Expressionsmusters konnte innerhalb eines Blatts beobachtet werden. Eine Aufnahme des Blattquerschnitts wurde unter Durchlicht gemacht, um die Morphologie und Lage der Zellen im Blattquerschnitt als Orientierungshilfe darzustellen (Abb. 11). Hier ist die GFP-Fluoreszenz in den Bündelscheidenzellen und im Schwammparenchym zu sehen.

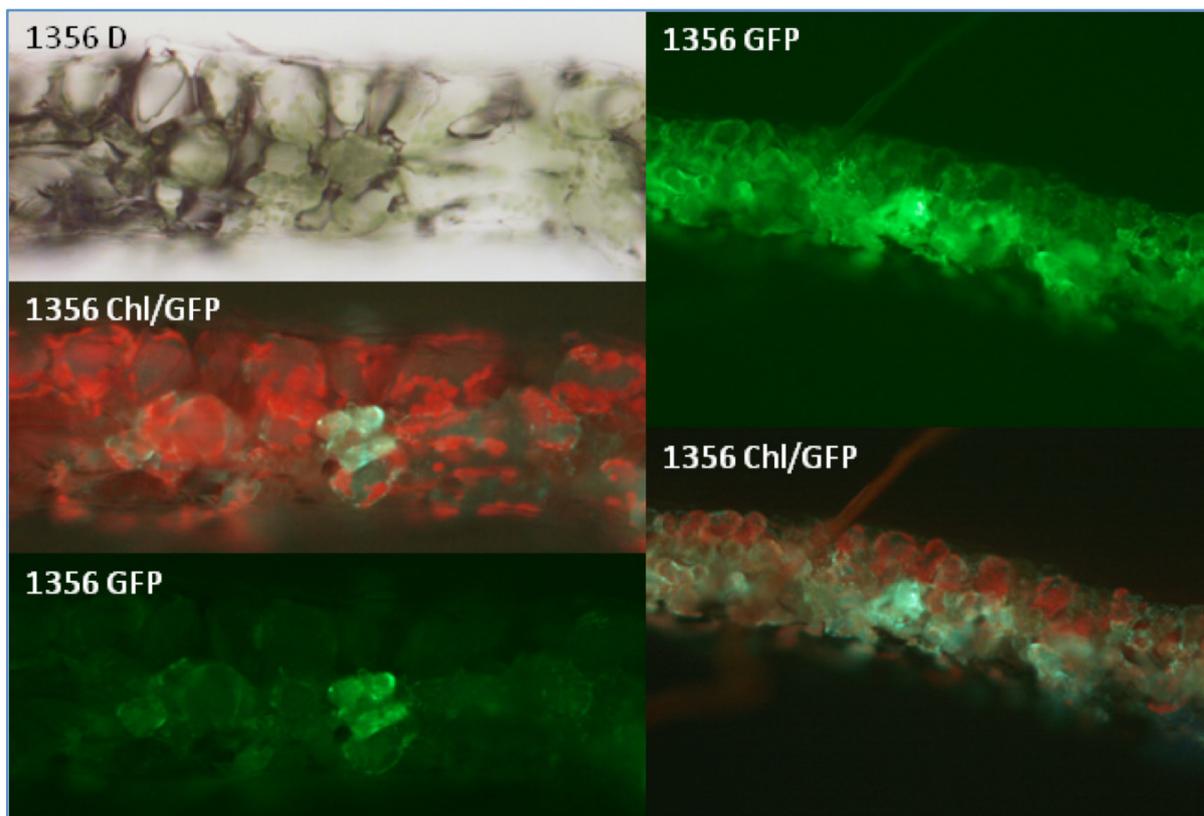


Abbildung 11: GFP-Expressionsmuster in Linie 1356. Die GFP-Fluoreszenz konnte in Bündelscheidenzellen oder im Schwammparenchym beobachtet werden. D: Durchlicht; Chl: Chlorophyll-Filter; GFP: GFP-Filter.

III.1.5. Linie 2443: GFP-Expression im Palisadenparenchym

In Linie 2443 (Abb. 12) konnte eine GFP-Fluoreszenz im Palisadenparenchym und oft in einer Zellschicht über der unteren Epidermis beobachtet werden. In Leitbündeln war eine besonders hohe Akkumulation des GFP-Proteins zu beobachten. Wie sich herausstellte, war dies nur in den ersten zwei bis drei Blättern der Pflanze zu beobachten. In Blättern, die sich später entwickelten, war die Expression überwiegend im Leitbündel zu finden. Die Übergänge zwischen diesen Expressionsmustern waren nicht scharf begrenzt und variierten je nach Pflanze.

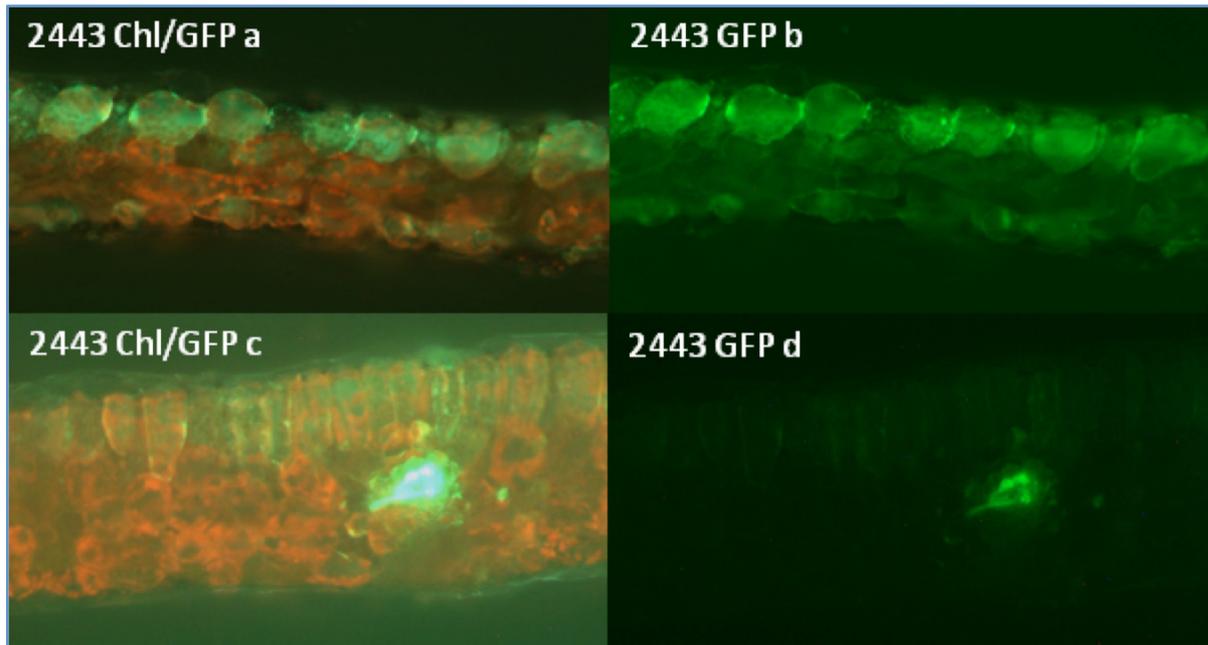


Abbildung 12: GFP-Expression in Linie 2443. Die Expression war im Palisadenparenchym zu finden und häufig auch in einer Zelle über der unteren Epidermis (a, b). GUS-Expression im Leitbündel eines Blattquerschnitts des späten Rosettenstadiums.

III.1.6. Linie J2111: GFP-Expression in den Bündelscheidenzellen

Die Linie J2111 zeigte eine hohe GFP-Expression in den Bündelscheidenzellen und in einigen Strukturen des Leitbündels (Abb. 13). Während Pflanzen der Linien 2443, 4396 und 1744 zuweilen keine GFP-Expression zeigten, konnte in jeder Aussaat der Linie 2111 eine GFP-Expression detektiert werden.

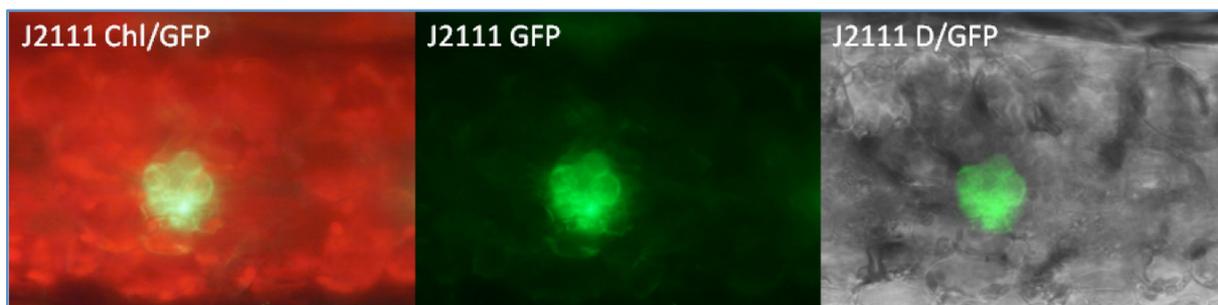


Abbildung 13: GFP- Expression in den Bündelscheidenzellen der Linie J2111. D/GFP: Durchlichtbild mit überlagertem GFP-Expression, Chl/GFP: Aufnahmen mit dem Chlorophyll-Filter. Zu erkennen ist neben der roten Chlorophyllfluoreszenz auch die GFP-Fluoreszenz. GFP: GFP-Filter.

III.1.7. Linie 1744: GFP-Expression im Palisadenparenchym

Pflanzen der Linie 1744 exprimierten GFP im Palisadenparenchym (Abb. 14). Das Saatgut musste mehrfach ausgesät werden, denn nicht in jeder Aussaat zeigten die Pflanzen eine GFP-Expression. Zuweilen exprimierten die Pflanzen einer Aussaat kein GFP oder vereinzelt in Zellen des Palisadenparenchyms. Es ist möglich, dass auch in dieser Linie die Reportergenexpression von äußeren Faktoren bestimmt wird. Es wurden zu verschiedenen Tageszeiten Blätter gerntet und auf GFP-Fluoreszenz überprüft, um eine mögliche

tagesabhängige Expression zu beobachten. Es konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen Tageszeit und Expressionsstärke beobachtet werden.

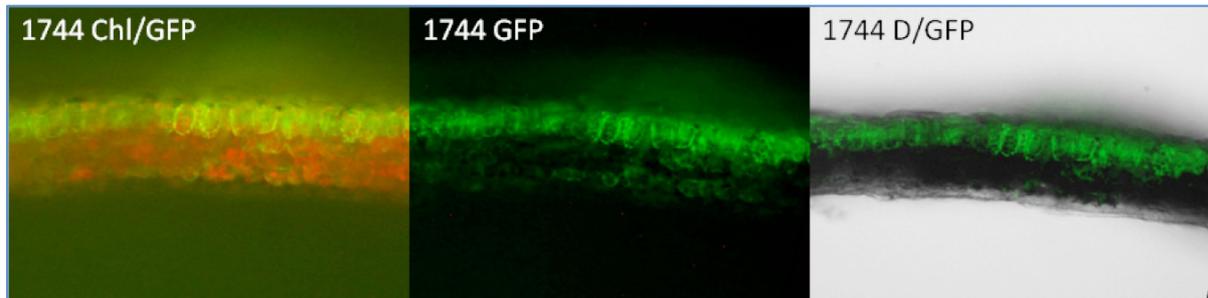


Abbildung 14: GFP-Expression im Palisadenparenchym der Linie 1744.

III.1.8. Linie 4396: GFP-Expression im Schwammparenchym

Die GFP-Fluoreszenz in Blattquerschnitten der Linie 4369 war in den ersten getesteten Pflanzen überwiegend im Schwammparenchym beobachtet worden. Pflanzen der Folgegeneration zeigten keine auf das Schwammparenchym begrenzte GFP-Fluoreszenz. Diese war auch in anderen Geweben zu finden. Auch wenn das Expressionsmuster nicht stabil war, wurde die Linie gewählt, um die Position der Insertion zu bestimmen.

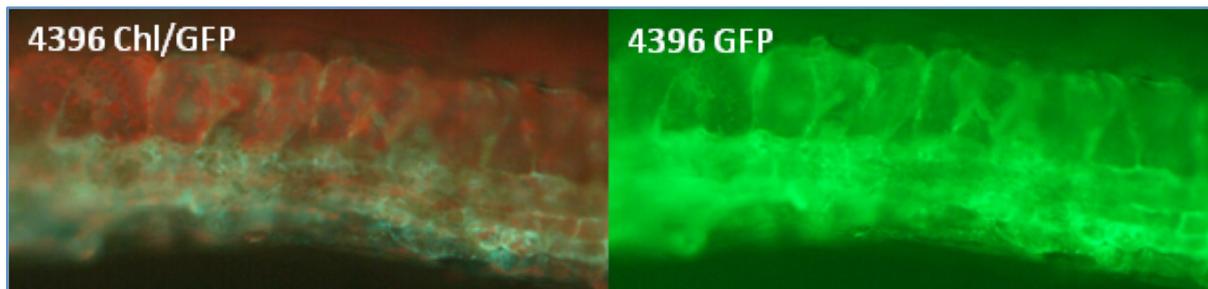


Abbildung 15: GFP-Expression in der Linie 4369. Die Fluoreszenz war teilweise im Schwammparenchym zu finden.

III.1.9. Linie JR11-2: GFP-Expression im Schwammparenchym

Die Linie JR11-2 zeigte eine GFP-Expression im Schwammparenchym (Abb. 16). Vor allem in jungen Blättern war eine starke Fluoreszenz zu beobachten. In älteren Rosettenblättern wurde die Fluoreszenz schwächer und sammelte sich zuweilen in den oberen Zellen des Schwammparenchyms.

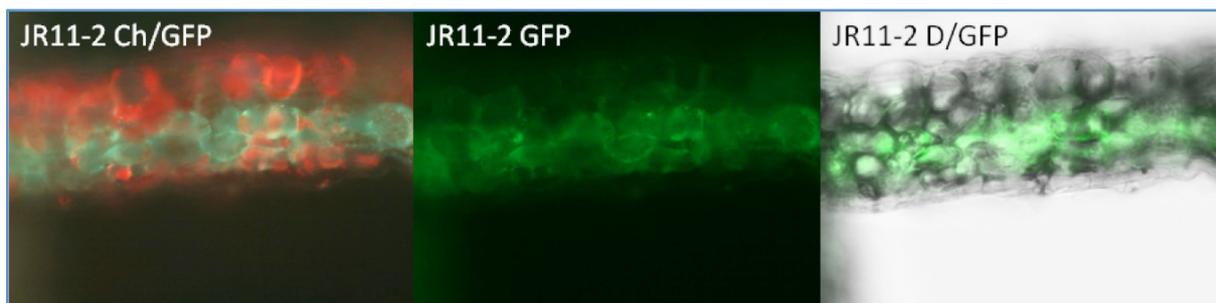


Abbildung 16: GFP-Expression im Schwammparenchym der Linie JR11-2.

Das GFP-Expressionsmuster im Schwammparenchym der Blätter ist bereits beschrieben worden (Truernit & Hibberd, 2007).

Die Selektion transgener Pflanzen in dieser Linie musste über die beobachtete GFP-Fluoreszenz erfolgen, weil das Kanamycin-Resistenzgen dieser Linie stillgelegt und daher nicht funktionsfähig war.

III.2. Sichtung einer Bibliothek von „Enhancer Trap“- Linien

Um weitere Linien mit spezifischer Reportergenexpression im Palisadenparenchym oder Schwammparenchym zu finden, wurde ein Teil einer „Enhancer Trap“-Sammlung (cs31087) von T. Jack (Campisi et al., 1999) durchsucht. Dabei wurden, wie im Methodenteil beschrieben, 33 Pools stichprobenartig getestet. Insgesamt wurden aus jedem Pool im Durchschnitt etwa 130 Samen ausgesät (Tab. 11).

Pool	Anzahl ausgelegter Samen	GUS-Färbung	Pool	Anzahl ausgelegter Samen	GUS-Färbung	Pool	Anzahl ausgelegter Samen	GUS-Färbung
19952	95	10	19963	57	11	19974	173	5
19953	57	4	19964	144	2	19976	201	6
19954	56	3	19965	77	3	19977	187	2
19955	127	13	19966	694	53	19978	89	-
19956	59	9	19967	298	25	19979	104	-
19957	117	10	19968	144	1	31003	56	2
19958	117	17	19969	89	6	31004	78	1
19959	49	3	19970	101	3	31005	157	9
19960	36	7	19971	93	5	31008	104	12
19961	181	22	19972	94	1	31009	249	14
19962	41	8	19973	139	3	31011	108	6
Insgesamt: 4371 Samen ausgelegt.				276 Pflanzen mit GUS-Färbung im Blatt.				

Tabelle 11: Übersicht über die Anzahl der ausgelegten Samen, sowie die Zahl der Pflanzen mit GUS-Färbung im Blatt.

Es wurden insgesamt 4371 Samen ausgelegt. Davon waren 2425 Pflanzen transgen (~55 %). Es handelte sich also nicht um homozygote Linien. Von diesen Pflanzen zeigten im ersten Test nur 276 eine GUS- Expression im Blatt. Eine Zusammenfassung der beobachteten Expressionsmuster von etwa 150 Pflanzen, deren Saatgut geerntet werden konnte, befindet sich in der Tabelle 12.

Pool 19952			
Pfl./Nr.	Beschreibung	Pfl./Nr.	Beschreibung
2/ TJ2	26 h Hydathoden, fleckenartig in Blattspreite	8/ TJ8	28 h Hydathoden, Flecken
3/ TJ3	5 h Hydathoden, fleckenartig in Blattspreite	10/ TJ10	46 h Blattadern an der Basis der Hydathoden
Pool 19953			
Pfl./Nr.	Beschreibung	Pfl./Nr.	Beschreibung
12 TJ12/	26 h Mittelrippe	14/ TJ14	26 h Flecken, Hydathoden
13/ TJ13	26 h Blatt überall, auch im Querschnitt.		
Pool 19954			
Pfl./Nr.	Beschreibung		

15/ TJ15	Blattspreite				
Pool 19955					
Pfl./ Nr.	Beschreibung		Pfl./ Nr.	Beschreibung	
19/ TJ19	5 h Hydathoden, Flecken		27/ TJ27	5 h Hydathoden, Flecken	
22/ TJ22	28 h Blattadern, Flecken		28/ TJ28	48 h LB, Blatt, nicht in Mittelrippe	
23/ TJ23	28 h Mittelrippe		29/ TJ29	26 h Hydathoden, Flecken	
25/ TJ25	5h Hydathoden, Flecken		30/ TJ30	28 h Blatt überall, adaxial im Querschnitt.	
26/ TJ26	26 h Gefäßsystem, Hydathoden				
Pool 19956					
Pfl./ Nr.	Beschreibung		Pfl./ Nr.	Beschreibung	
32/ TJ32	Blatt überall in Aufsicht, im Querschnitt: subepidermale Zellschichten, PP		34/ TJ34	Blatt überall in Aufsicht, im Querschnitt PP stärker gefärbt als SP	
33/ TJ33	Blatt überall, auch im Querschnitt.		39/ TJ39	Blatt überall, im Querschnitt LB, Gradient ins Mesophyll	
Pool 19957					
Pfl./ Nr.	Beschreibung		Pfl./ Nr.	Beschreibung	
40/ TJ40	Hydathoden und Mittelrippe		24/ TJ87	Mittelrippe	
41/ TJ41	Hydathoden		35/ TJ93	Blatt überall, LB	
42/ TJ42	Blatt überall in Aufsicht, im Querschnitt PP stärker gefärbt als SP		46/ TJ103	Blatt überall	
43/ TJ43	Hydathoden				
Pool 19958					
Pfl./ Nr.	Beschreibung	Pfl./ Nr.	Beschreibung	Pfl./ Nr.	Beschreibung
63/ TJ111	Mittelrippe, Blattspitze	74/ TJ119	Blatt	101/ TJ143	Mittelrippe
64/ TJ112	Blatt überall	75/ TJ120	Mittelrippe	102/ TJ144	Mittelrippe
68/ TJ116	Mittelrippe	76/ TJ121	Blattspreite		
73/ TJ118	Mittelrippe	79/ TJ124	Blatt überall		
Pool 19959					
Pfl./ Nr.	Beschreibung		Pfl./ Nr.	Beschreibung	
47/ TJ47	Hydathoden, Blatt, Mittelrippe		48/ TJ48	Hydathoden, Blattrand	
Pool 19960					
Pfl./ Nr.	Beschreibung				
50/ TJ50	Blatt ganz, in Aufsicht, im Querschnitt SP, LB (Kanadi1)				
Pool 19961					
Pfl./ Nr.	Beschreibung		Pfl./ Nr.	Beschreibung	
56/ TJ56	Mittelrippe		120/ TJ146	Mittelrippe	
Pool 19962					
Pfl./ Nr.	Beschreibung	Pfl./ Nr.	Beschreibung	Pfl./ Nr.	Beschreibung
59/ TJ59	Hydathoden	63/ TJ63	Blattspitze	64/ TJ64	Hydathoden
Pool 19963					
Pfl./ Nr.	Beschreibung		Pfl./ Nr.	Beschreibung	
66 TJ66/	Blatt überall, Mittelrippe		76/ TJ76	Hydathoden	
68/ TJ68	Blatt überall, Mittelrippe weniger				
Pool 19966					
Pfl./ Nr.	Beschreibung	Pfl./ Nr.	Beschreibung	Pfl./ Nr.	Beschreibung
137 TJ147/	Blatt überall	12/ TJ224	Blattspreite	24/ TJ236	Blattspreite
140/ TJ148	Blatt überall Mittelrippe weniger	14/ TJ226	Blattspreite	25/ TJ237	Blattspreite
1/ TJ213	Blattspreite	16/ TJ228	Blatt spitze	26/ TJ238	Hydathoden/Blattrand
2 TJ214/	Blattspitze	17/ TJ229	Mittelrippenregion	27/ TJ239	Blattspitze
3/ TJ215	Blattmitte	18/ TJ230	Blattspreite	28/ TJ240	Blattspitze
4/ TJ216	Blattspreite	19/ TJ231	Blattspitze	29/ TJ241	Blattspreite
5/ TJ217	Blatt, Mittelrippengegend	20/ TJ232	Blattspitze	30/ TJ242	Blattspreite
6/ TJ218	Blattspitze	21/ TJ233	Blattspreite	31/ TJ243	Blattspreite
9/ TJ221	Blattspreite	22/ TJ234	Blattspitze	32/ TJ244	Blattspreite
10/ TJ222	Blattspreite	23/ TJ235	Blattspreite	33/ TJ245	Blattspreite
Pool 19967					
Pfl./ Nr.	Beschreibung	Pfl./ Nr.	Beschreibung	Pfl./ Nr.	Beschreibung
166/ TJ150	Blattspitze	34/ TJ246	Blattspitze	39/ TJ251	Blattspitze, Rand
176/ TJ153	Blattspitze	35/ TJ247	Blattspreite	40/ TJ252	Blattspitze
183/ TJ156	Blattspitze	37/ TJ249	Blattspitze	41/ TJ253	Blattspitze
203/ TJ163	Blattspreite	38/ TJ250	Blattspitze		
Pool 19969					
Pfl./ Nr.	Beschreibung				

1/ TJ164	Blattspreite				
Pool 19970					
Pfl./ Nr.	Beschreibung		Pfl./ Nr.	Beschreibung	
2/ TJ165	Mittelrippe		4/ TJ167	Blattspreite	
3/ TJ166	Blattspreite		5/ TJ168	Mittelrippe	
Pool 19973					
Pfl./ Nr.	Beschreibung		Pfl./ Nr.	Beschreibung	
6/ TJ169	Blattspitze		8/ TJ171	Blattspitze	
9/ TJ172	LB und Blattspreite				
Pool 19974					
Pfl./ Nr.	Beschreibung		Pfl./ Nr.	Beschreibung	
11/ TJ174	Mesophyll teilweise LB		12/ TJ175	Blattspreite	
13/ TJ176	LB und Mesophyll				
Pool 19976					
Pfl./ Nr.	Beschreibung		Pfl./ Nr.	Beschreibung	
14/ TJ177	Blattspitze		16/ TJ179	Blatt, nicht in LB	
15/ TJ178	Blattspitze		17/ TJ180	Blattspitze	
Pool 31003					
Pfl./ Nr.	Beschreibung		Pfl./ Nr.	Beschreibung	
1	Blattrand		2	Mittelrippe, Spreite	
Pool 31004					
Pfl./ Nr.	Beschreibung				
3	Blattrand				
Pool 31005					
Pfl./ Nr.	Beschreibung		Pfl./ Nr.	Beschreibung	
4	Blattspreite, nicht in Mittelrippe, Querschnitt: überall im Blatt.		10	Blattspreite	
5	Blattspitze		11	Blattspreite	
7	Blattspreite		12	Blattspitze	
8	Blattspreite		13	Blattrand, LB	
9	Blatt zur Spitze hin, nicht in LB, Querschnitt: keine Färbung.				
Pool 31008					
Pfl./ Nr.	Beschreibung		Pfl./ Nr.	Beschreibung	
15	Blatt, Mittelrippe		19	Hydathoden, Blattspreite	
16	Blattstiel?		20	Mittelrippe, Hydathoden	
17	Blattrand		21	Blattspreite	
18	Blattspreite, Hydathoden		22	LB, Spreite	
23	Hydathoden				
24	Hydathoden				
25	Mittel-LB				
Pool 31009					
Pfl./ Nr.	Beschreibung		Pfl./ Nr.	Beschreibung	
26	Blattspreite, im Querschnitt: PP stärker gefärbt als SP		31	Blattspreite, Querschnitt: überall.	
27	Blattspreite, am Rand		32	Blatt, in LB	
28	Hydathoden		33	Blatt, Hydathoden	
29	Blatt, Hydathoden		34	Blattspreite, Hydathoden	
30	Blatt, Hydathoden		35	Mittelrippengegend, Hydathoden	
36	Blatt in Aufsicht, im Querschnitt: PP, LB, BS				
37	Mittelrippengegend, Hydathoden				
39	Mittelrippe, Blattadern				
41	Blattspitze, Gradient				
43	Blattspreite				
Pool 31011					
Pfl./ Nr.	Beschreibung		Pfl./ Nr.	Beschreibung	
45	Blatt, Mittelrippe		47	LB, Hydathoden	
46	LB		50	Hydathoden, Mesophyll	

Tabelle 12: GUS-Expressionsmuster in Blättern untersuchter „Enhancer Trap“-Linien von T. Jack.

Bei etwa 100 Pflanzen konnte eine Färbung der Blattspreite oder der Blattspitze beobachtet werden. Bei etwa dreißig Pflanzen färbten Hydathoden an den Blattspitzen und Rändern, bei etwa 40 Pflanzen färbten Leitbündel oder die Mittelrippe. Diese Linien wurden nicht alle im Detail untersucht, denn das Ziel dieser Suche war es, Linien mit Expression im Schwammparenchym oder Palisadenparenchym aus dieser Sammlung zu extrahieren. Nur

diese Linien waren für die vorliegende Arbeit von Bedeutung. Eine Übersicht über die Bandbreite der beobachteten GUS-Expressionsmuster befindet sich in Abbildung 17.

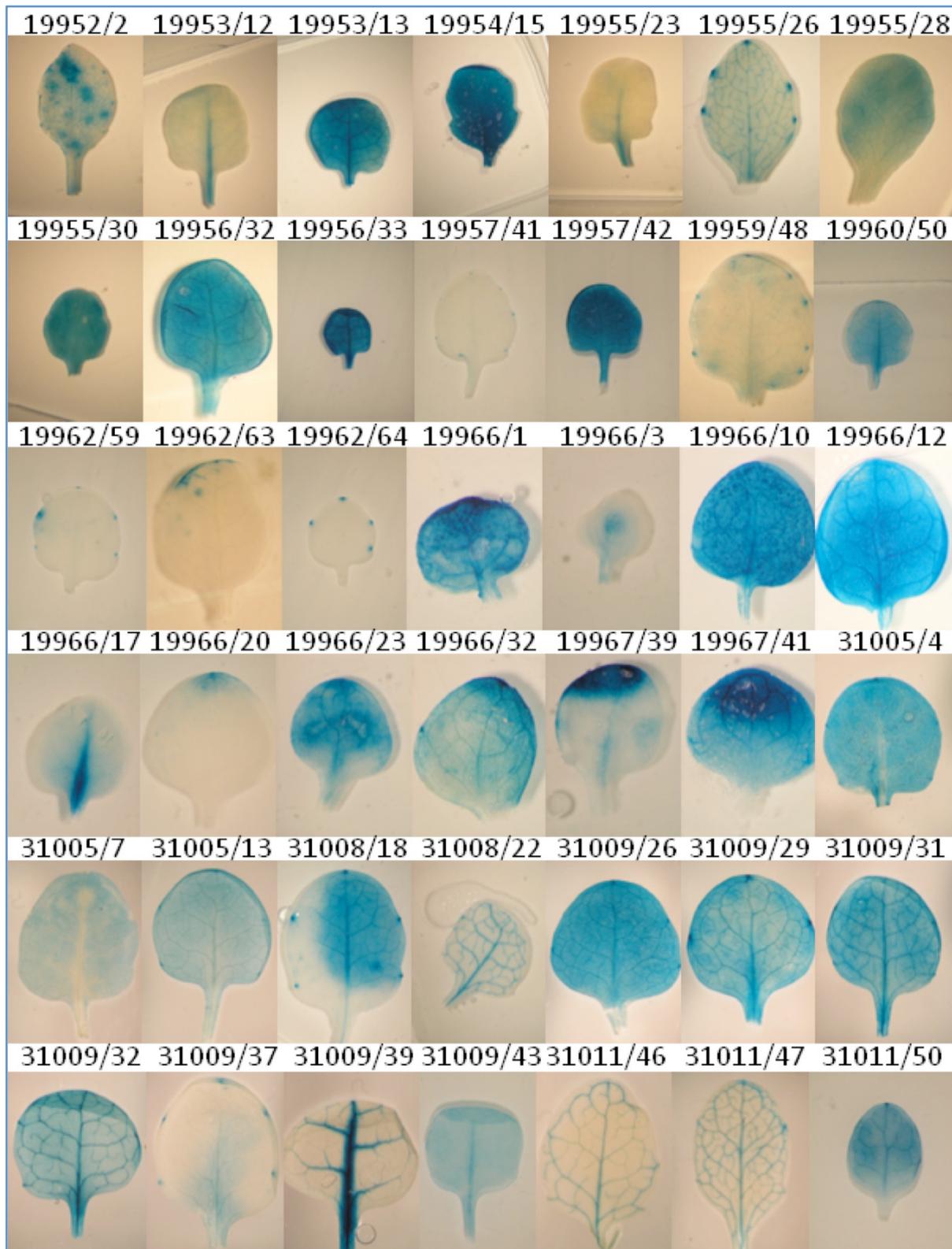


Abbildung 17: GUS-Expressionsmuster in Blättern der untersuchten „Enhancer Trap“-Linien. Es wurde GUS-Expression in der gesamten Blattspreite, in Leitbündeln oder in Hydathoden beobachtet in verschiedenen Kombinationen.

Um die Linien zu identifizieren, die spezifisch entweder im Palisadenparenchym oder Schwammparenchym exprimierten, wurden Linien gewählt, deren Blattspreite in Aufsicht gleichmäßig gefärbt war. Von diesen Pflanzen wurden nach drei Wochen Kultur auf Erde Querschnitte angefertigt. Sechs Linien, die einen Unterschied in der GUS-Färbung im Schwammparenchym und Palisadenparenchym zeigten, wurden identifiziert. Die Linien spalteten zum Teil in der Folgegeneration auf, wobei entweder nicht transgene Pflanzen beobachtet worden sind, oder unterschiedliche Expressionsmuster. Eine Kontamination des Saatguts durch Saatgut anderer Linien während der Kultur ist nicht auszuschließen, weil aus Platzgründen die Pflanzen auf Multiplatten kultiviert worden sind. Pflanzen, von denen kein Saatgut geerntet werden konnte, weil die Pflanzen nicht überlebten oder im Gewächshaus kein Saatgut gebildet haben, sind in diese Liste nicht aufgeführt. Nur drei ausgewählte Linien, in denen die Insertionsposition bestimmt werden sollte, wurden erneut ausgesät um die Expressionsmuster zu überprüfen und die Pflanzen für DNA-Isolation zu vermehren. Bei den restlichen Linien handelt es sich aufgrund der Zahl, um nicht weiter charakterisierte Linien, die nach Bedarf näher untersucht werden können. Weil jeder Pool gemischtes Saatgut von 100 „Enhancer Trap“-Linien enthielt, war es nicht möglich die beobachteten Expressionsmuster einer bestimmten ursprünglichen Linie zuzuordnen. Zudem waren die GUS-Expressionsmuster in Blättern dieser Linien bisher nicht untersucht worden.

III.2.1. Linie 19957/42: GUS-Expression an der adaxialen Blattseite

In der Linie 19957/42 wurde eine GUS-Expression beobachtet, die überwiegend adaxial zu finden war. Weil die Expression nicht deutlich auf Zellen des Palisadenparenchyms begrenzt war, wurde diese Linie nicht weiter untersucht.

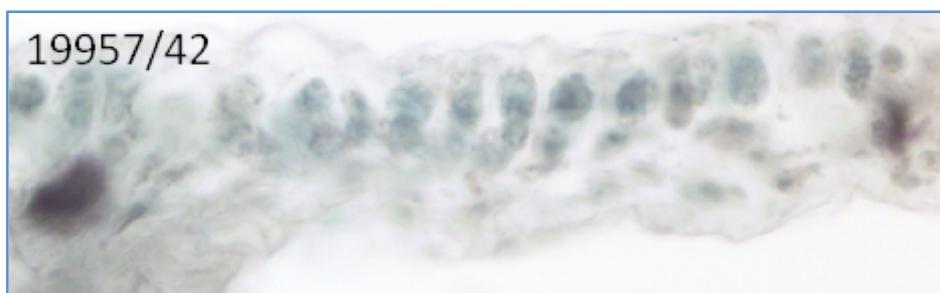


Abbildung 18: GUS-Expression an der adaxialen Blattseite im Blattquerschnitt der Linie 19957/42

III.2.2. Linie 19956/32: GUS-Expression im Palisadenparenchym und einer Zellschicht oberhalb der unteren Blattepidermis

Keimlinge der „Enhancer Trap“-Linie 19956/32 zeigten eine starke GUS-Färbung in der gesamten Blattspreite. Im Hypokotyl und Wurzel konnte keine oder nur leichte GUS-Expression beobachtet werden, während Wurzelspitzen stark angefärbt worden sind

(Abb. 19a). In Blattquerschnitten wurde das zellspezifische Expressionsmuster dieser Linie deutlich. Die GUS-Färbung war auf die obere Zellschicht des Palisadenparenchyms begrenzt. Desweiteren war eine Zellschicht an der unteren Epidermis gefärbt (Abb. 19b).

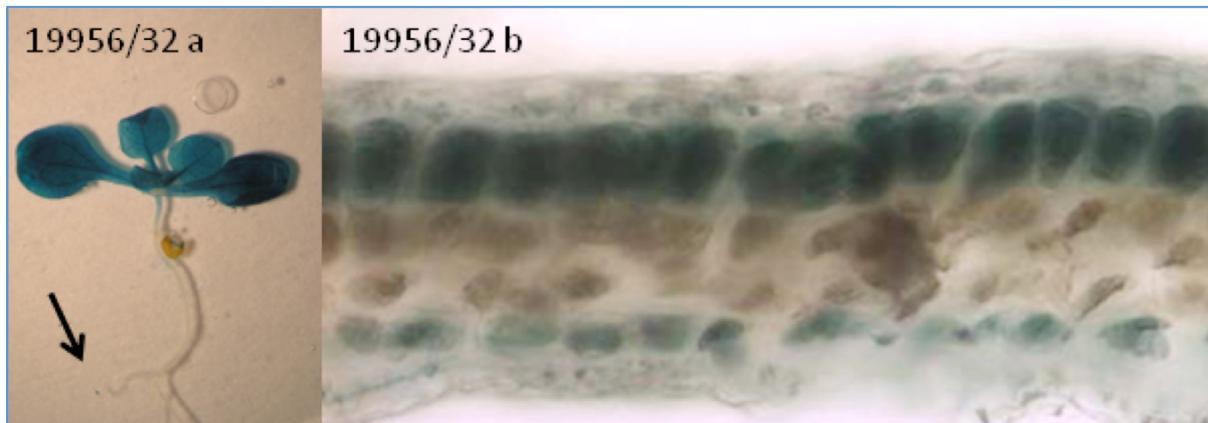


Abbildung 19: GUS-Expression in Linie 19956/32. Die Färbung war im Palisadenparenchym zu beobachten, sowie einer Zellschicht oberhalb der unteren Epidermis.

Aufgrund des zellspezifischen Expressionsmuster wurde diese Linie für eine Positionsbestimmung der „Enhancer Trap“-Insertion gewählt.

III.2.3. Linie 19956/34: GUS-Expression im Palisadenparenchym und einer Zellschicht oberhalb der unteren Blattepidermis

Aus dem Pool 19956 konnte eine weitere Pflanze isoliert werden, die im ersten Test in der gesamten Blattspreite angefärbt worden ist. Nachdem auch hier Querschnitte angefertigt worden sind, konnte ein ähnliches GUS-Expressionsmuster wie in Linie 19956/32 beobachtet werden (Abb. 20). Es ist sehr wahrscheinlich, dass es sich hierbei ursprünglich um Pflanzen einer Linie handelte.

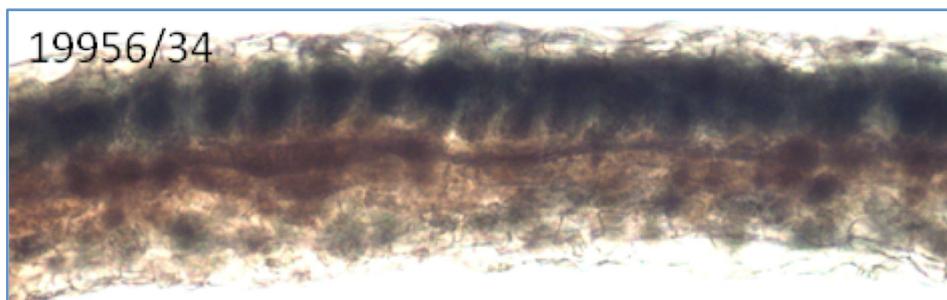


Abbildung 20: GUS-Färbung im Palisadenparenchym der Linie 19956/34. Wie in Linie 19956/32 sind Zellen oberhalb der unteren Blattepidermis angefärbt worden.

III.2.4. Linie 31009/26: GUS-Expression an der abaxialen Seite des Blattquerschnitts.

Etwa drei Wochen alte Pflanzen der Linie 31009/26 färbten nur im Spross. Hier wurde die GUS-Expression in Kotyledonen beobachtet, sowie in der Blattspreite. In jungen Blättern wurde keine GUS-Expression beobachtet, ebenso nicht im Hypokotyl und Wurzeln. Querschnitte, die angefertigt worden sind, zeigten von adaxial nach abaxial einen

abnehmenden GUS-Gradienten (Abb. 21). Eine klare Grenze zwischen Palisadenparenchym und Schwammparenchym fehlte.

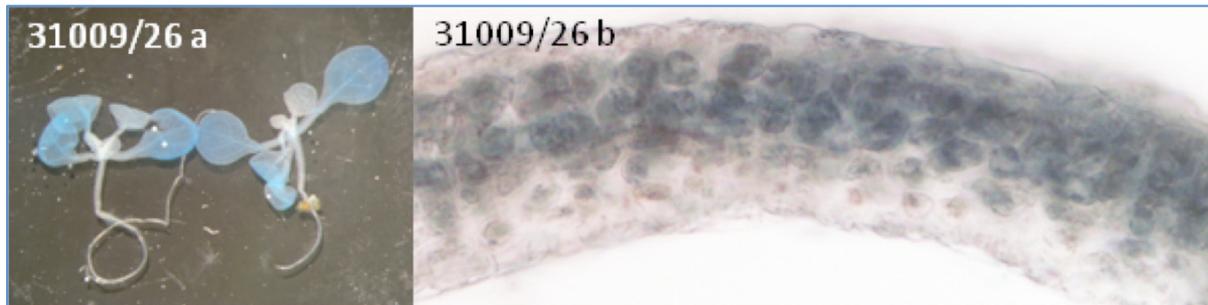


Abbildung 21: Pflanzen der Linie 31009/26 (a). Querschnitt durch eine Blattspreite mit überwiegend adaxialer Färbung (b).

III.2.5. Linie 31009/36: GUS-Expression im Palisadenparenchym und Bündelscheidenzellen

Eine kräftige GUS-Färbung zeigte das Palisadenparenchym der Blätter von Pflanzen der Linie 31009/36. Hier färbten die Blätter in einem etwas späteren Stadium als in der Linie 31009/26. Es konnte beobachtet werden, dass die GUS Expression in einem bestimmten Stadium der Entwicklung des Blatts an der Blattspitze begann. Blätter färbten dabei intensiver als Kotyledonen. In Blattquerschnitten war außerdem zu beobachten, dass vereinzelt auch Bündelscheidenzellen angefärbt worden sind, sowie Strukturen innerhalb des Leitbündels, die vermutlich zum Phloem gehörten.

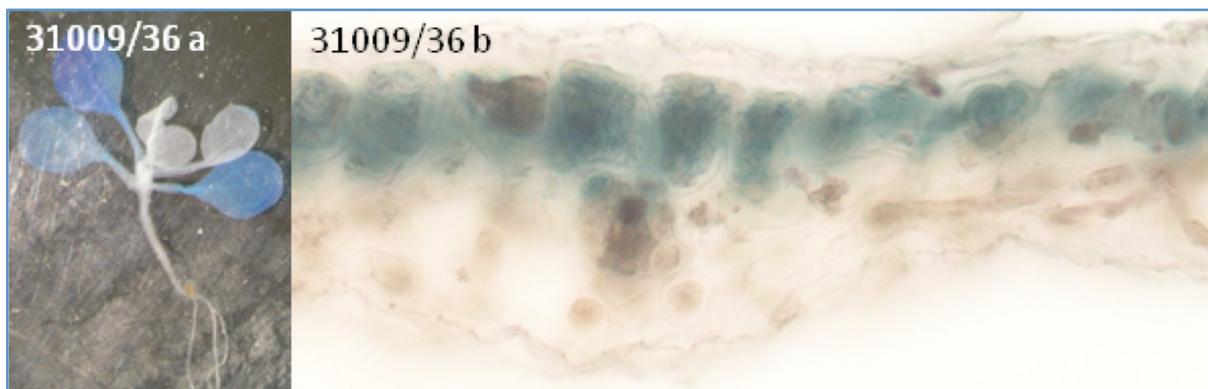


Abbildung 22: Linie 3109/36 mit Expression im Palisadenparenchym und in Bündelscheidenzellen,

Auch in dieser Linie wurde keine GUS-Färbung im Hypokotyl oder in der Wurzel beobachtet.

III.2.6. Linie 19960/50: GUS-Expression im Schwammparenchym

In der Linie 19960/50 wurde eine GUS-Expression im Schwammparenchym beobachtet (Abb. 23). Die Expression begann bereits im Keimling, wobei im Habitus betrachtet, die Stiele der Kotyledonen und die Sprossspitze mit den entstehenden Blättern gefärbt worden sind. Die GUS-Färbung war im Bereich der Mittelrippe kräftiger als in der Blattspreite. Im

die Position des inserierten „Enhancer Trap“-Konstrukts im chromosomalen Kontext. Es befindet sich zwischen einer Glutamyl-tRNA (At4g01450) und einem bHLH-Transkriptionsfaktor (At4g01460) an der Position 614886 auf Chromosom 4.

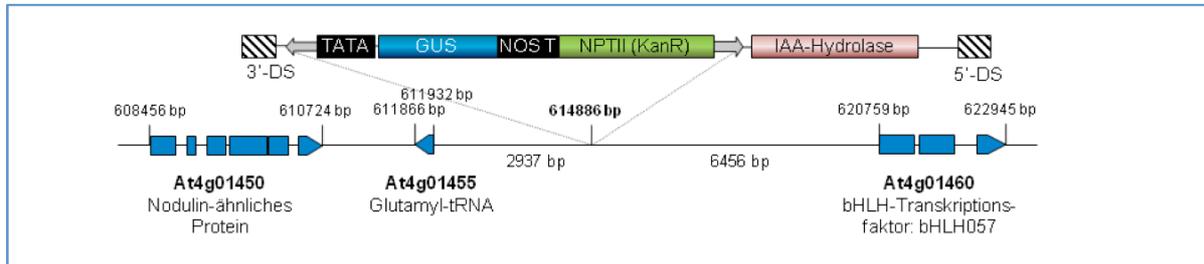


Abbildung 25: Position der „Enhancer Trap“-Insertion im Genom der Linie UCR8. Gene in der Umgebung der Insertion wurden schematisch mit ihrer Exonstruktur und Orientierung abgebildet (blau). Zur besseren Übersicht wurden die Positionen der Gene auf dem Chromosom (TAIR) in der Abbildung notiert.

III.3.2. Position der Ds-Elements in Linie UCR9

Das Ergebnis der iPCR, mit DNA aus Linie UCR9, ist in Abbildung 26 dargestellt. Ein Fragment von 94 bp zeigte Übereinstimmung mit dem BAC-Klon K8K14, der einen Teil der Sequenz aus Chromosom 5 beinhaltet (Abb. 27). Die Insertion erfolgte in den untranslatierten Stromaufwärtsbereich, 980 bp vom ATG des NPY3-Proteins (NAKED PINS IN YUC MUTANTS 3) entfernt. Es ist ein an der Auxin-vermittelten Organogenese beteiligtes Protein. In einer Entfernung von etwa 2,5 kb befindet sich ein Cys2/His2-Zinkfingerprotein (AZF1).

Score = 436 (71.5 bits), Expect = 1.6e-13, P = 1.6e-13
Identities = 94/98 (95%), Positives = 94/98 (95%), Strand = Plus / Plus

```
Query:      1  TTTAGGATCAATTTCGATGAAATGAAACAAAGACAAGAGGCAAACAAGTGTGGCTATATT 60
             |||
Sbjct: 67656 TTTAGGATCAATTTCGATGAAATGAAACAAAGACAAGAGGCAAAAAAGTGTGGCTATATT 67715

Query:      61  GCTGCTGCTACTGCTGCTGCTTTGTGTGTAGTAGACAG 98
             |||
Sbjct: 67716 GCTGCTGCT---GCTGCTGCTTTGTGTGTAGTAGACAG 67750
```

Abbildung 26: Übereinstimmende Basenpaare aus dem iPCR-Produkt (UCR9) mit dem BAC-Klon K8K14.

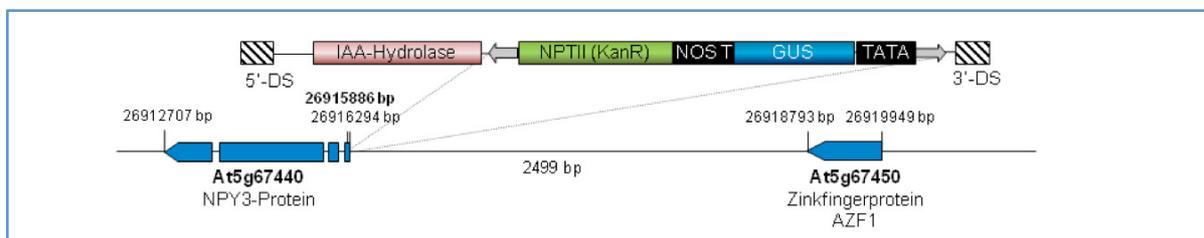


Abbildung 27: Position des inserierten „Enhancer Trap“-Konstrukts in den Stromaufwärtsbereich des Gens At5g67440 in Linie UCR9.

III.3.3. Position des Ds-Elements in Linie UCR10

Ein Insertionsereignis in den kodierenden Bereich eines Gens wurde in Linie UCR10 nachgewiesen. Die isolierte Sequenz stimmte auf einer Länge von 65 bp zu 100% mit einer Sequenz auf dem BAC-Klon T2G17 überein (Abb. 28).

Score = 325 (54.8 bits), Expect = 1.6e-08, P = 1.6e-08
 Identities = 65/65 (100%), Positives = 65/65 (100%), Strand = Minus / Plus

```

Query:    65 TCATATAAACAAACATGATCTAATATGGATTGTCTTTGAATGAAGGGGTGGATTGATGAT 6
          |||
Sbjct: 62675 TCATATAAACAAACATGATCTAATATGGATTGTCTTTGAATGAAGGGGTGGATTGATGAT 62734

Query:    5 GGGAG 1
          |||
Sbjct: 62735 GGGAG 62739
  
```

Abbildung 28: Vergleich des iPCR-Produktes aus Linie UCR10 mit dem BAC-Klon BAC: T2G17.

Die Insertion erfolgte 20 bp nach Beginn des zweiten Exons, im Gen At2g20100, eines ethylenregulierten Proteins. Obwohl die Insertion in einen kodierenden Bereich erfolgte, zeigten Pflanzen dieser „Enhancer Trap“- Linie keinen sichtbaren Phänotyp.

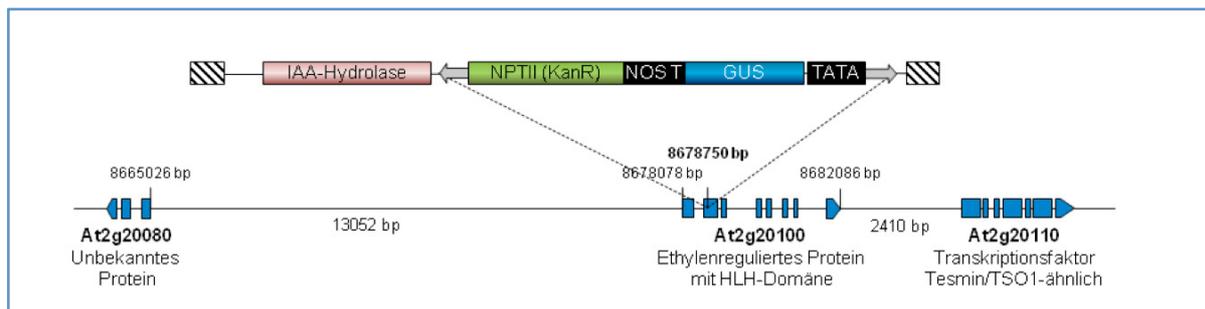


Abbildung 29: Insertion des „Enhancer Trap“-Konstrukts in das Gen At2g20100 in Linie UCR10. Die Insertion wurde im zweiten Exon lokalisiert.

III.3.4. Position des „Enhancer Trap“-Konstrukts in Linie 2443

Das inserierte „Enhancer Trap“-Konstrukt wurde in Linie 2443 auf Chromosom 5 (Abb. 31) zwischen einem Glycin-reichen Protein (At5g42635) und einem C2H2-Zinkfingerprotein (At5g52640) gefunden (BAC: MFO20).

Score = 729 bits (808), Expect = 0.0
 Identities = 404/404 (100%), Gaps = 0/404 (0%)
 Strand=Plus/Plus

```

Query 1      AGGTGTATCATAACTACAATAAGTCTtttttttCTAGCATTGAAAATTTGCAACAACTGA 60
          |||
Sbjct 37935  AGGTGTATCATAACTACAATAAGTCTTTTTTCTAGCATTGAAAATTTGCAACAACTGA 37994

Query 61     ATCCATTTAATAAATTATATCATAGAACCATGCATTAATATTTTAAATGTGTATTATGAC 120
          |||
Sbjct 37995  ATCCATTTAATAAATTATATCATAGAACCATGCATTAATATTTTAAATGTGTATTATGAC 38054

Query 121    TACTCAGTGTACCCATGTGGTGTGTAATATAGTCAAATGTCCTTTTTGATATTTTATTTT 180
          |||
Sbjct 38055  TACTCAGTGTACCCATGTGGTGTGTAATATAGTCAAATGTCCTTTTTGATATTTTATTTT 38114

Query 181    GTTGCTTCTCGCATTTTATCTTAAATTAACATGAGTTGGAGAATGCAAATATTCCATTT 240
          |||
Sbjct 38115  GTTGCTTCTCGCATTTTATCTTAAATTAACATGAGTTGGAGAATGCAAATATTCCATTT 38174

Query 241    TTTAGAAAGATTTGTATCATTTCCACGTATGTCATCGAGCTCATACTCTTTTGCAA 300
          |||
Sbjct 38175  TTTAGAAAGATTTGTATCATTTCCACGTATGTCATCGAGCTCATACTCTTTTGCAA 38234

Query 301    ACCCCACGGAACTTCACTTATTATTGAATAACATTTTACATTCTTAACTATCATTTTACA 360
          |||
Sbjct 38235  ACCCCACGGAACTTCACTTATTATTGAATAACATTTTACATTCTTAACTATCATTTTACA 38294

Query 361    TGGTCTAGTGGTTTCGTTAGATGTACAATATTTTTATTACAGCG 404
          |||
Sbjct 38295  TGGTCTAGTGGTTTCGTTAGATGTACAATATTTTTATTACAGCG 38338
  
```

Abbildung 30: Ergebnis der BLAST-Analyse der isolierten Sequenz aus Linie2443.

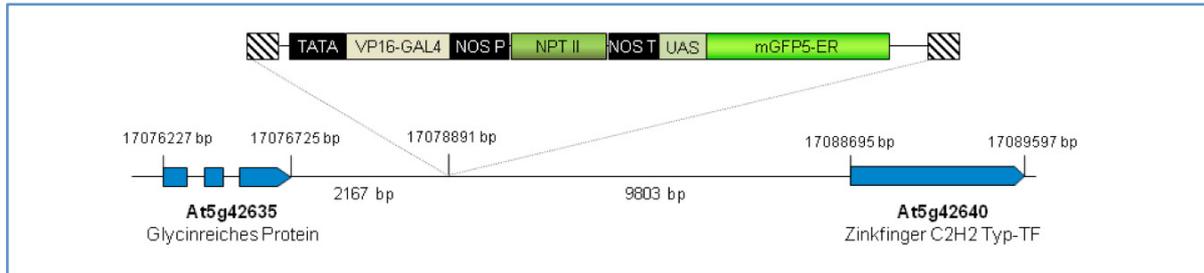


Abbildung 31: Position des inserierten „Enhancer Trap“-Konstrukts in Linie 2443.

Aufgrund der großen Ähnlichkeit zu dem Expressionsmuster in Linie 19956/32 und der Varianz der Expression in Abhängigkeit des Blattstadiums wurde diese Linie nicht weiter untersucht.

III.3.5. Position des „Enhancer Trap“-Konstrukts in Linie 4396

Die Position des für die GFP-Expression im Schwammparenchym der Line 4396 verantwortlichen „Enhancer Trap“-Konstrukts konnte nicht eindeutig bestimmt werden. Eine von zwei isolierten Sequenzen wurde zwischen den Genen At1g77760 (Nitrit-Reduktase1) und At1g77765 (unbekanntes Protein) gefunden, auf dem BAC-Klon T1P2 und damit auf Chromosom 1 (Abb. 32). Die zweite Sequenz wurde einem Abschnitt zwischen den Genen At1g30020 und At1g30030 (Retrotransposon) zugeordnet (Abb. 33).

```
Score = 529 (85.4 bits), Expect = 9.9e-18, P = 9.9e-18
Identities = 109/113 (96%), Positives = 109/113 (96%), Strand = Minus / Plus

Query:   156 CGAATAATATATGATTATGGTTCAATTATTCAGCCGTTTTTTTTTAATTTGTTCTCTCTTT 97
          |||
Sbjct: 53013 CGAATAATATATGATTATGGTTCAATTATTCAGCCGTTTTTTTTTAATTTGTTCTCTCTTT 53072

Query:   96 TTGTCATCACAGCCAACCTTAATTTTGTCCGATTCTTFCCTTCCACCAAGAAT 44
          |||
Sbjct: 53073 TTGTCATCACAGCCAACCTTAATTTTGTCCGATTCTTFCCTTCCAAAACAAAT 53125
```

Abbildung 32: Sequenz 1 mit Übereinstimmung auf BAC-Klon T1P2.

```
Score = 305 (51.8 bits), Expect = 1.3e-07, P = 1.3e-07
Identities = 61/61 (100%), Positives = 61/61 (100%), Strand = Plus / Plus

Query:   1 CTGAAATGGAAAAGTCAGAGAAACCTTATGGAGTCTATACGAAACTTCCAGGAAGTAC 60
          |||
Sbjct: 47455 CTGAAATGGAAAAGTCAGAGAAACCTTATGGAGTCTATACGAAACTTCCAGGAAGTAC 47514

Query:   61 T 61
          |
Sbjct: 47515 T 47515
```

Abbildung 33: Sequenz 2 mit Übereinstimmung auf BAC-Klon T32E8.

Aufgrund der Varianz des GFP-Expressionsmusters in dieser Linie und zwei isolierten Positionen wurde diese Linie nicht weiter untersucht.

III.3.6. Position des „Enhancer Trap“-Konstrukts in Linie J2111

In der Linie J2111 mit GFP-Expression in den Bündelscheidenzellen (Abb. 13), wurde das inserierte „Enhancer Trap“-Konstrukt stromaufwärts des unbekanntes Gens At5g17847

gefunden. Stromabwärts des Gens befinden sich zwei Kationenaustauschergene *At5g17850* (*CAX8*) und *At5g17860* (*CAX7*) (Abb. 34 und 35). Das nächste Stromaufwärts liegende Gen ist *At5g17840*, welches ein Chaperonprotein kodiert.

Score = 795 bits (401), Expect = 0.0
Identities = 454/478 (94%), Gaps = 8/478 (1%)
Strand = Plus / Plus

```

Query: 75      ttttacttgttggaataaacaacatcaattcagttactgaccacatcctttaaattagtt 134
                |||
Sbjct: 80681  ttttacttgttggaataaacaacatcaattcagttactgaccacatcctttaaattagtt 80740

Query: 135     tcttatatgtaagttaaccttaaacggtaactgattacgaaccaaacgggaatatttat 194
                |||
Sbjct: 80741  tcttatatgtaagttaaccttaaacggtaactgattacgaaccaaacgggaatatttat 80800

Query: 195     attatTTTTTccatagtttagtggttaaggaatcagcactaaataactaaatattgctggg 254
                |||
Sbjct: 80801  attatTTTTTccatagtttagtggttaaggaatcagcactaaataactaaatattgctggg 80860

Query: 255     tcagctccttatagtaaatatttaatttgtggaaaaagcttctaaatttatgtatcctttc 314
                |||
Sbjct: 80861  tcagctccttatagtaaatatttaatttgtggaaaaagcttctaaatttatgtatcctttc 80920

Query: 315     gctaaccctccctccttctcttctattcttctgcatacgtaatgaaagagaaaatgac 374
                |||
Sbjct: 80921  gctaaccctccctccttctcttctattcttctgcatacgtaatgaaagagaaaatgac 80980

Query: 375     gcacagttcatcgtgaagccgacacataagccatttccaaaacccaatcacccctaacc 434
                |||
Sbjct: 80981  gcacagttcatcgtgaagccgacacataagccatttccaaaacccaatcacccctaacc 81040

Query: 435     caaaaacggcaa-----tgacaaactTTTTTcagattcTTTatatnnnnnnntagtat 486
                |||
Sbjct: 81041  caaaaacggcaatgacaaagtgacaaactTTTTTcagattcTTTatataaaaaaatagtat 81100

Query: 487     tcctcaatcctctgnnnnnnngtctctgacgtttctctcgtcaggctctgtgtaa 544
                |||
Sbjct: 81101  tcctcaatcctctgTTTTTTTTTgctctgacgtttctctcgtcaggctctgtgtaa 81158

```

Abbildung 34: Das in der iPCR-Isolierte DNA-Fragment aus Linie J2111 zeigte Übereinstimmung mit einer Sequenz auf dem BAC-Klon MVA3 (BLAST). Diese Sequenz liegt auf Chromosom 5.

CAX8 ist ein membrangebundenes Protein mit Kalzium/Natrium-Antiporter-Aktivität. Das Gen wird vor allem im Phloem und in der Epidermis exprimiert und zeigt eine nur leicht höhere Expression in den Bündelscheidenzellen als im Mesophyll (<http://efp.ucr.edu/>, 2006). Dies entspricht nicht dem beobachteten Expressionsmuster in der „Enhancer Trap“-Linie. Der getestete Stromaufwärtsbereich des *CAX8*-Gens konnte die GUS-Expression im Wildtyp nicht reproduzieren (Abb. 54). Es ist nicht auszuschließen, dass die gesuchten „Enhancer“ sich in der distalen Region des untersuchten DNA-Fragments befinden.

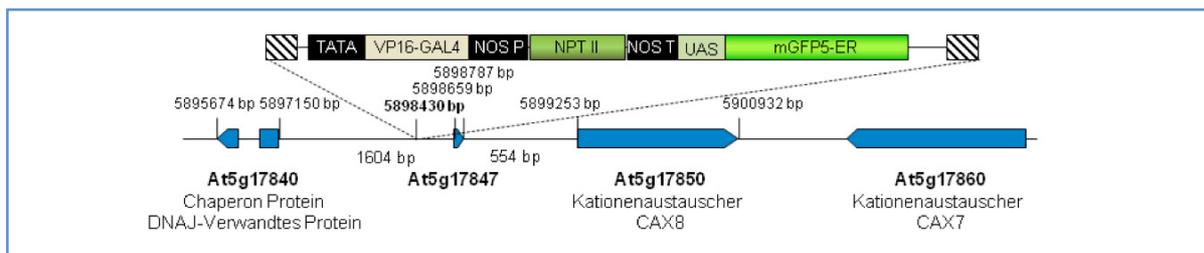


Abbildung 35: Position des inserierten „Enhancer Trap“-Konstrukts im Genom der Linie J2111.

Das andere benachbarte Gen ist At5g17840, ein DNAJ-verwandtes Chaperonprotein, welches nach Betrachtung der mRNA-Lokalisation im eFP-Browser ausgeschlossen werden kann.

Das Expressionsmuster dieser „Enhancer Trap“-Linie ist bereits beschrieben worden (Kim et al., 2002). Die Linie trägt das von Haseloff entwickelte „Enhancer Trap“-Konstrukt, welche die Transaktivierung von weiteren UAS (*upstream activating sequence*) -enthaltenden Reportergenen bewirken kann. Wie beschrieben zeigte die „Enhancer Trap“-Linie eine starke GFP Fluoreszenz.

III.3.7. Position des „Enhancer Trap“-Konstrukts in Linie JR11-2

Das GFP-Reportergen wurde im Schwammparenchym der Linie JR11-2 aktiviert. Die in der iPCR isolierte Sequenz stimmte auf einer Länge von 852 bp zu 99% mit der Sequenz des BAC-Klons F11D22 überein (Abb. 36) und damit mit der Sequenz auf Chromosoms 5 (Abb. 37).

```
Score = 1649 bits (832), Expect = 0.0
Identities = 848/852 (99%), Gaps = 1/852 (0%) Strand = Plus / Minus

Query: 76      tgttttggtgtctttggttctactctcgcactgaatctttcgatcagcgataaattgttt 135
              |||
Sbjct: 43430   tgttttggtgtctttggttctactctcgcactgaatctttcgatcagcgataaattgttt 43371

Query: 136     cttcttttgggattttctccttgggtacgaggttctttccttcttttatttgctctgtt 195
              |||
Sbjct: 43370   cttcttttgggattttctccttgggtacgaggttctttccttcttttatttgctctgtt 43311

Query: 196     tttgagatttgggaattggtatcaagtctgacaaaactggtcactaatctttctgggaaat 255
              |||
Sbjct: 43310   tttgagatttgggaattggtatcaagtctgacaaaactggtcactaatctttctgggaaat 43251

Query: 256     tgagcatgttcggttcttgcacccgtttgactcttttctatgcaaagtctcaaccttt 315
              |||
Sbjct: 43250   tgagcatgttcggttcttgcacccgtttgactcttttctatgcaaagtctcaaccttt 43191

Query: 316     caatagtggaaattattcttatccctaatttctctttaccagacctatttttagctaagt 375
              |||
Sbjct: 43190   caatagtggaaattattcttatccctaatttctctttaccagacctatttttagctaagt 43131

Query: 376     ttggttgaatttagaaagtctttgattcatagttgaagagattctctccattaatctttc 435
              |||
Sbjct: 43130   ttggttgaatttagaaagtctttgattcatagttgaagagattctctccattaatctttc 43071

Query: 436     tctgtaatgtgtcagatccactaaaagtaagtaagaaaaagattttggtgtaatgttatt 495
              |||
Sbjct: 43070   tctgtaatgtgtcagatccactaaaagtaagtaagaaaaagattttggtgtaatgttatt 43011

Query: 496     aaatgtgtctttgtagatggaaccagctcaattaatgagatgagatgagaatgttcagct 555
              |||
Sbjct: 43010   aaatgtgtctttgtagatggaaccagctcaattaatgagatgagatgagaatgttcagct 42951

Query: 556     tgcagaagatggctatggcttttactctcttgttttttgctgtttatgctcatttgtgt 615
              |||
Sbjct: 42950   tgcagaagatggctatggcttttactctcttgttttttgctgtttatgctcatttgtgt 42891

Query: 616     ctccagatgctcaagggtgatgccttttcttacttttcaactgctattttgctgctctcat 675
              |||
Sbjct: 42890   ctccagatgctcaagggtgatgccttttcttacttttcaactgctattttgctgctctcat 42831

Query: 676     ttcttgtttcggtttctggtaatttctgagcttgttcagggttgaagatttaactctatgat 735
              |||
Sbjct: 42830   ttcttgtttcggtttctggtaatttctgagcttgttcagggttgaagatttaactctatgat 42771
```

```

Query: 736   tctttgcttttccattttcaggggatgcactgtttgcggtgaggatctccttacgtgcat 795
           |||
Sbjct: 42770 tctttgcttttccattttcaggggatgcactgtttgcggtgaggatctccttacgtgcat 42711

Query: 796   taccgaatcagctaaagtgactggaatcagaaccaagttaatccttgacttgggtccaag 855
           |||
Sbjct: 42710 taccgaatcagctaaagtgactggaatcagaaccaagttaatccttgacttgggtccaag 42651

Query: 856   ttatttgtgatgac-aaaactttgtcacttctctgtaagtttaatagacaactctgaatta 914
           |||
Sbjct: 42650 ttatttgtgatgacaaaactttgtcacttctctgtaagtttaatagacaactctgaatta 42591

Query: 915   ggcaatggttgt 926
           |
Sbjct: 42590 gtcaatggttgt 42579

```

Abbildung 36: Übereinstimmung der in der iPCR isolierten Sequenz aus JR11-2 mit dem BAC-Klon F18D22

Das „Enhancer Trap“-Konstrukt inserierte in Linie JR11-2 in den Stromaufwärtsbereich des LRR-Proteins (At5g10290) an der Position 3238636 (Abb. 37). Das nächste benachbarte Gen ist die putative Methylesterase (At5g10300). Der Abstand zwischen den beiden Genen beträgt nur etwa 1,5 kb.

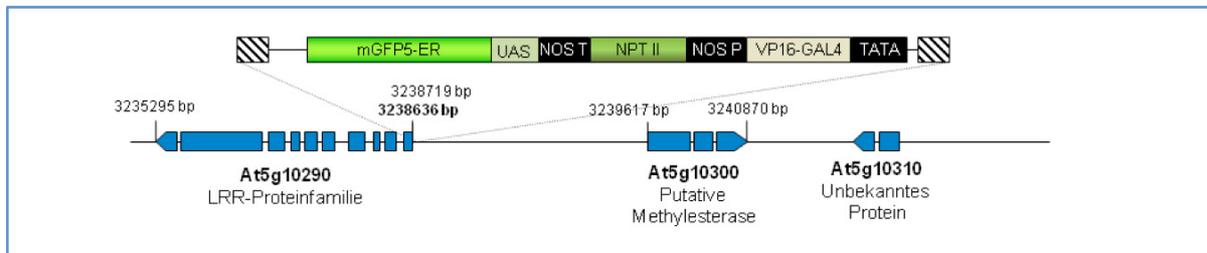


Abbildung 37: Position der Insertion in Linie JR11-2.

III.3.8. Position des „Enhancer Trap“-Konstrukts in Linie 1744

Die Lage der „Enhancer Trap“-Insertion auf Chromosom 2 konnte bestätigt werden. Die in der inversen PCR isolierte Sequenz wurde auf dem BAC-Klon F4I18 gefunden (Abb. 38). Das „Enhancer Trap“-Konstrukt inserierte etwa 500 bp Stromaufwärts des Gens At2g45900, das ein bisher unbekanntes Proteins kodiert. Das nächste benachbarte Gen, eine Ubox-Serin/Threonin Proteinkinase, befindet sich über 5 kb entfernt.

Score = 688 bits (347), Expect = 0.0
 Identities = 347/347 (100%)
 Strand = Plus / Minus

```

Query: 14   aaaaaagagtatatatttctggtgagaagtgggtctactaaatgacacatTTTgctaaacat 73
           |||
Sbjct: 63915 aaaaaagagtatatatttctggtgagaagtgggtctactaaatgacacatTTTgctaaacat 63856

Query: 74   ctaccctcgtgcttcgagcttcttcacctctcgtgatttttctattatattaataagcga 133
           |||
Sbjct: 63855 ctaccctcgtgcttcgagcttcttcacctctcgtgatttttctattatattaataagcga 63796

Query: 134  agaatgccgcattttatgcgaaaatctggaataaaaaatactTTTtaaggTTTctTTTct 193
           |||
Sbjct: 63795 agaatgccgcattttatgcgaaaatctggaataaaaaatactTTTtaaggTTTctTTTct 63736

Query: 194  taacaatggaggctgaaacactgagtggtgtaaagtattatcagtagtttctTTTtgcac 253
           |||
Sbjct: 63735 taacaatggaggctgaaacactgagtggtgtaaagtattatcagtagtttctTTTtgcac 63676

Query: 254  tgcattttatcagtagattttcctgttcttgcaggcattggatcagattcttataaggta 313
           |||
Sbjct: 63675 tgcattttatcagtagattttcctgttcttgcaggcattggatcagattcttataaggta 63616

```

```

Query: 314   tatttatgcctttatctttttcttttccgtggggatcaacaatgcat 360
           |||
Sbjct: 63615 tatttatgcctttatctttttcttttccgtggggatcaacaatgcat 63569

```

Abbildung 38: Vergleich der Sequenz des iPCR-Produktes aus Linie 1744 mit dem BAC-Klon F4118.

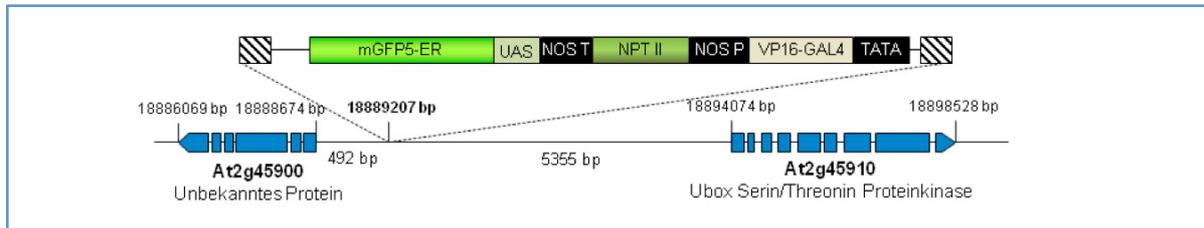


Abbildung 39: Insertionsposition des „Enhancer Trap“-Konstrukts im Genom der Linie 1744.

Die Auswertung von Mikroarraydaten hat gezeigt, dass es mit dem IRX3-Gen (Irregular Xylem3), einer Zellulose-Synthase (At5g17420), koexprimiert wird (Brown et al., 2005). Das Gen wurde im eFP-Browser (<http://efp.ucr.edu>, 2006) gesucht, um anhand des Vorkommens der Polysomalen mRNA auf das Expressionsmuster schließen zu können. Die mRNA war im Mesophyll lokalisiert, sowie in den Schließzellen. Da hier nicht nach Palisadenparenchym oder Schwammparenchym unterschieden wird, stand das mRNA vorkommen mit dem beobachteten GFP-Expressionsmuster in der „Enhancer Trap“-Linie in keinem Widerspruch. Es wurden verschiedene Primerkombinationen verwendet, um den Stromaufwärtsbereich des Gens zu isolieren, jedoch ohne Erfolg. Daher konnten bisher keine GUS-Konstrukte hergestellt werden.

III.3.9. Position des „Enhancer Trap“-Konstrukts in Linie 19956/32

Nach Auswertung der Sequenz des iPCR-Produktes konnte die Insertionsposition in dieser Linie auf Chromosom 4 gefunden werden (Abb. 40 und 41).

```

Score = 993 bits (501), Expect = 0.0
Identities = 518/526 (98%)
Strand = Plus / Plus

```

```

Query: 158   aacttgaaacgatacagatcccatccaacataaacatcatcatctcacagttcgcggttttc 217
           |||
Sbjct: 86978 aacttgaaacgatacagatcccatccaacataaacatcatcatctcacagttcgcggttttc 87037

Query: 218   taaccacaacacacccccacgcgtgtggcttactcgcgctacataataaaaaataacaaaca 277
           |||
Sbjct: 87038 taaccacaacacacccccacgcgtgtggcttactcgcgctacataataaaaaataacaaaca 87097

Query: 278   caaacaaaaagagtaaagagggggtttccaaacccagtcataatcccgaaccaccaactc 337
           |||
Sbjct: 87098 caaacaaaaagagtaaagagggggtttccaaacccagtcataatcccgaaccaccaactc 87157

Query: 338   ctccaccgtgatcggaccggaacccttttacgtcgttgtcccatcacggtgacaaaggag 397
           |||
Sbjct: 87158 ctccaccgtgatcggaccggaacccttttacgtcgttgtcccatcacggtgacaaaggag 87217

Query: 398   ttggatctcgcccaactcgcgcgggttcggttcttgactcgacacccccctccctcccatagta 457
           |||
Sbjct: 87218 ttggatctcgcccaactcgcgcgggttcggttcttgactcgacacccccctccctcccatagta 87277

```

```

Query: 458   caagaccnnnnnncaagttatataaaaaattcacaattcattaagaaaaagaacacacg 517
          |||
Sbjct: 87278 caagacaaaaaaaacagttatataaaaaattcacaattcattaagaaaaagaacacacg 87337

Query: 518   cacgcgccagtcttgatcaagatcagcttttcgattgtaaagcggcacgaatcttctgaa 577
          |||
Sbjct: 87338 cacgcgccagtcttgatcaagatcagcttttcgattgtaaagcggcacgaatcttctgaa 87397

Query: 578   cggatcatgatattagggttgtgacagtctccaccgactcaaccgtgagttttgcccgttg 637
          |||
Sbjct: 87398 cggatcatgatattagggttgtgacagtctccaccgactcaaccgtgagttttgcccgttg 87457

Query: 638   ggagattgtttacaaggattgaaacgccactgtcgagaggatcc 683
          |||
Sbjct: 87458 ggagattgtttacaaggattgaaacgccactgtcgagaggatcc 87503

```

Score = 281 bits (142), Expect = 1e-74
 Identities = 142/142 (100%)
 Strand = Plus / Plus

```

Query: 1      ccagtcctgtcaagggaatgacgtggcgcaacgaaaatggcgaatacgtgaagccccatat 60
          |||
Sbjct: 86821 ccagtcctgtcaagggaatgacgtggcgcaacgaaaatggcgaatacgtgaagccccatat 86880

Query: 61     catgcaaaggaaggagacaaggtatagcattaaatgaatgaatgctctgcaaaatacat 120
          |||
Sbjct: 86881 catgcaaaggaaggagacaaggtatagcattaaatgaatgaatgctctgcaaaatacat 86940

Query: 121    ttaatgctccacgagagacagc 142
          |||
Sbjct: 86941 ttaatgctccacgagagacagc 86962

```

Abbildung 40: Übereinstimmende Basenpaare der isolierten Sequenz mit dem BAC-Klon F6N23. Die beiden scheinbaren Teilsequenzen gehören zu einer Insertionsposition auf Chromosom 4

Hier war das Konstrukt stromabwärts des bereits bekannten Gens *ANTHOCYANINLESS2* (*ANL2*, At4g00730) inseriert (Abb. 41). Das ANL2-Gen kodiert für ein Homöodomänen-Protein der GLABRA2-Gruppe (Kubo et al., 1999). Es reguliert die Akkumulation von Anthocyanen in den subepidermalen Zellschichten des Blatts und steuert gleichzeitig die Wurzelentwicklung. Mutanten zeigen Defekte in der Zellorganisation der Wurzelzellen und lagern keine Anthocyane an der adaxialen Seite des Blatts ein (Kubo et al., 1999). Die Einlagerung der Anthocyane in der abaxialen subepidermalen Zellschicht war in den Mutanten nicht betroffen. Der nächste benachbarte Transkriptionsstartpunkt gehört zu einer Proteinkinase (At4g00720).

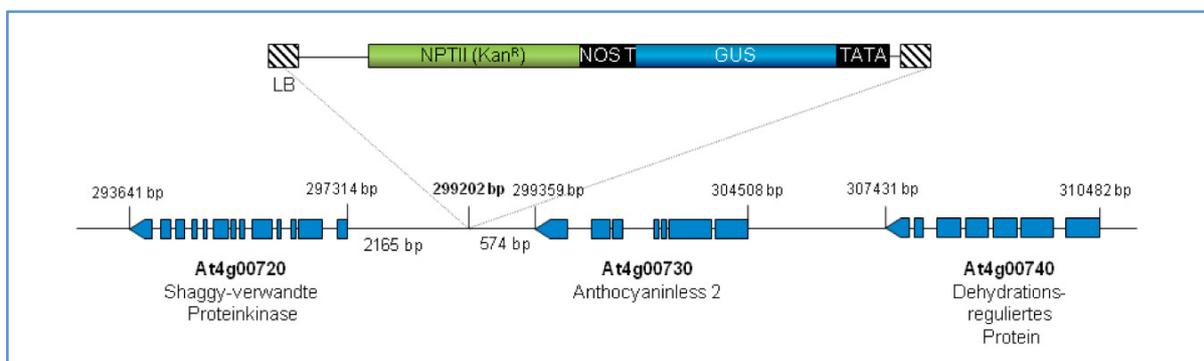


Abbildung 41: Insertionsposition des „Enhancer Trap“-Konstrukts in den Stromabwärtsbereich des Gens At4g00730 in Linie 19956/32

III.3.10. Position des „Enhancer Trap“-Konstrukts in Linie 19960/50

In der Linie 19960/50 wurde die Insertion stromaufwärts des *KANADII*-Gens lokalisiert.

```
Score = 182 bits (92), Expect = 1e-44
Identities = 92/92 (100%)
Strand = Plus / Plus
Query: 134   tcgacaaatcattaatgccttgaaataaaaatgatgaaattgtaagactatgtttatat 193
            |||
Sbjct: 80137 tcgacaaatcattaatgccttgaaataaaaatgatgaaattgtaagactatgtttatat 80196

Query: 194   atcaggaaatttaaataagtgagattttattc 225
            |||
Sbjct: 80197 atcaggaaatttaaataagtgagattttattc 80228
```

Abbildung 42: Übereinstimmung mit der Sequenz auf dem BAC-Klon MQK4

Das Gen besteht aus sechs Exons und kodiert für einen Transkriptionsfaktor mit GARP-Domäne, der abaxial im Blatt exprimiert ist (Kerstetter et al., 2001). In *Arabidopsis* gibt es eine kleine Familie der Kanadi-Proteine (Eshed et al., 2001), die als Antagonisten der Proteine der HD-ZIPIII-Klasse fungieren (Braybrook und Kuhlemeier, 2010). KAN1 repräsentiert die Expression von AS2 (ASYMMETRIC LEAVES2) auf der abaxialen Seite (Wu et al., 2008) und ist abaxial in allen seitlichen Organen exprimiert (Kerstetter et al., 2001).

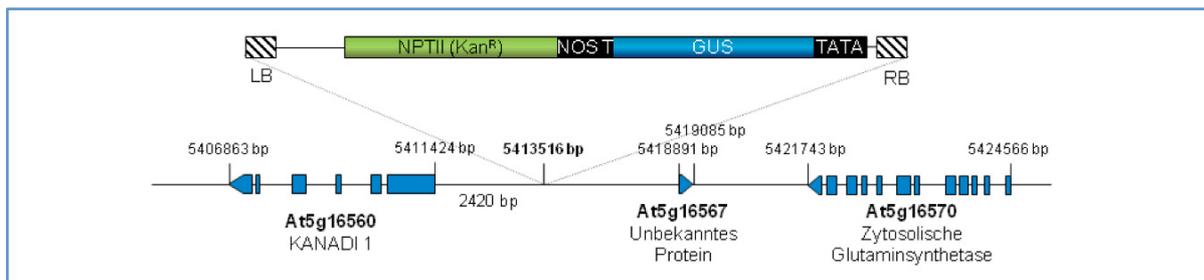


Abbildung 43: Insertionsposition des „Enhancer Trap“-Konstrukts stromabwärts des Gens At5g16560 in Linie 19960/50

III.3.11. Position des „Enhancer Trap“-Konstrukts in Linie 31009/36

In der iPCR konnten Sequenzen isoliert werden, die keine genaue Positionsbestimmung zulassen. So wurden Übereinstimmungen auf Chromosom 1, 2 und 3 gefunden. Hier handelt es sich um Fragmente mobiler Elemente. Die iPCR an der rechten Grenze des „Enhancer Trap“-Konstrukts lieferte bisher kein Produkt.

III.4. Überprüfung isolierter flankierender Sequenzen der „Enhancer Trap“-Insertionen auf Vorhandensein von „Enhancer“-Elementen

III.4.1. Hypothese 1: Der 5'-Bereich eines benachbarten Gens bewirkt Spezifität der Reporterexpression

Um zu überprüfen, ob der gesuchte „Enhancer“, der die zellspezifische Reporterexpression in einer „Enhancer Trap“-Linie steuert, im Stromaufwärtsbereich eines direkt benachbarten Gens zu finden ist (Abb. 44), wurden die folgend beschriebenen Konstrukte hergestellt.

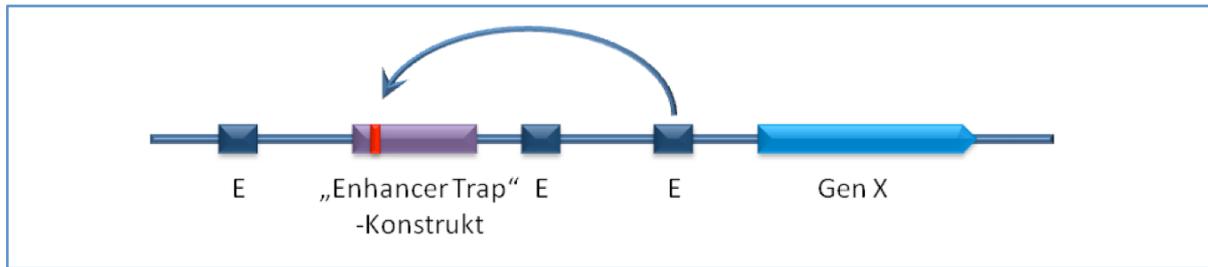


Abbildung 44: Aktivierung der Expression des inserierten „Enhancer Trap“-Konstrukts durch einen „Enhancer“ (E) im Stromaufwärtsbereich eines benachbarten Gens.

III.4.1.1. Überprüfung des Stromaufwärtsbereichs des Gens At5g16560 (Linie 19960/50):

In der Linie 19960/50 war das „Enhancer Trap“-Konstrukt stromaufwärts des Gens At5g16560 (*Kanadi1*, *KANI*) inseriert. In Blattquerschnitten konnte eine GUS-Färbung im Schwammparenchym beobachtet werden. Um nach dem Enhancer dieser Reportergenexpression zu suchen, wurde der 5'-Bereich des benachbarten *KANI*-Gens stromaufwärts des Translationsstartpunktes ATG (Position: 5411092) von etwa fünf Kilobasenpaaren isoliert (Abb. 45) und vor den Translationsstart des GUS-Gens kloniert. Das Fragment wurde in den pMDC164-Vektor mittels Gateway-Reaktion rekombiniert.

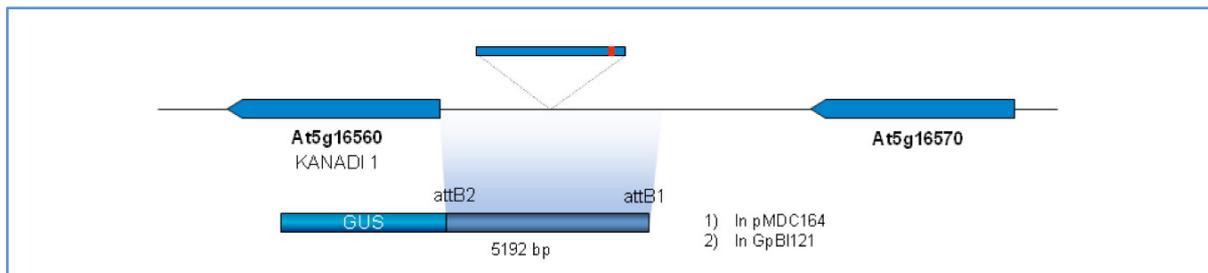


Abbildung 45: Überprüfung des *KANI*-Stromaufwärtsbereichs auf das Vorhandensein von „Enhancer“-Elementen.

Pflanzen, die mit dem Konstrukt in pMDC164 transformiert wurden, zeigten eine GUS-Expression in den Leitbündeln und in Bündelscheidenzellen. Daneben war auch eine Expression in der Epidermis und im Mesophyll zu beobachten (Abb. 46b). Um zu überprüfen, ob Elemente in der verwendeten T-DNA das Expressionsmuster beeinflussen, wurde der Vektor GpBI121 verwendet, um den Stromaufwärtsbereich des *KANI*-Gens zu testen. Das Saatgut der gedippten Pflanzen enthielt keine Transformanten. Die Transformation wurde aus Zeitgründen nicht wiederholt. Promotor-Reportergen-Konstrukte haben gezeigt, dass *KANI*, *KAN2* und *KAN3* eine Phloem-assoziierte Expression zeigen (Emery et al., 2003). Dies stimmt in etwa mit den beobachteten Expressionsmustern überein, auch wenn diese durch die Wirkung des 35S-Promotors überlagert worden sind (Abb. 46b).

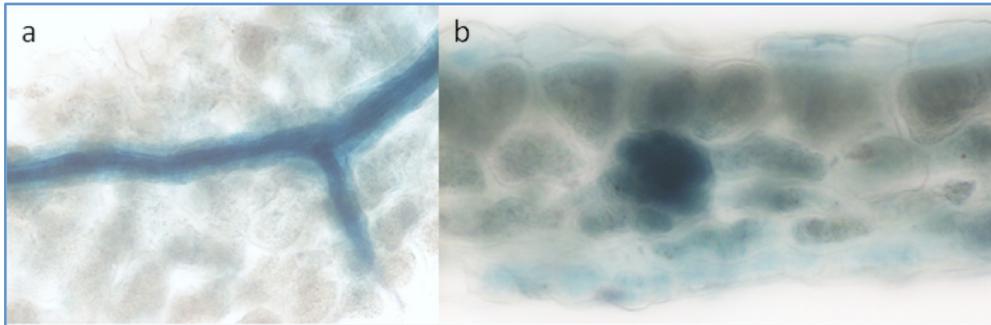


Abbildung 46: Expressionsmuster des 5'-Bereichs des *KAN1*-Gens. Verwendet wurde der pMDC164-Vektor. GUS-Färbung in Leitbündel und Bündelscheidenzellen (a). Unspezifische GUS-Färbung im Blattquerschnitt (b).

III.4.1.2. Überprüfung des Stromaufwärtsbereichs des Gens *At4g00720* (Linie: 19956/32)

Ebenso wurde mit dem 5'-Bereich des Gens *At4g00720* verfahren, um diesen auf die Anwesenheit von zellspezifischen „Enhancern“ zu untersuchen. In der „Enhancer Trap“-Linie 19956/32 war das GUS-Expressionsmuster in den subepidermalen Zellschichten zu finden. Der benachbarte 5'-Stromaufwärtsbereich des Gens *At4g00720* wurde vor das GUS-Gen des pMDC164-Vektors kloniert (Abb. 47). Dabei wurde der Bereich stromaufwärts des Translationsstartpunktes an Position 297002 amplifiziert.

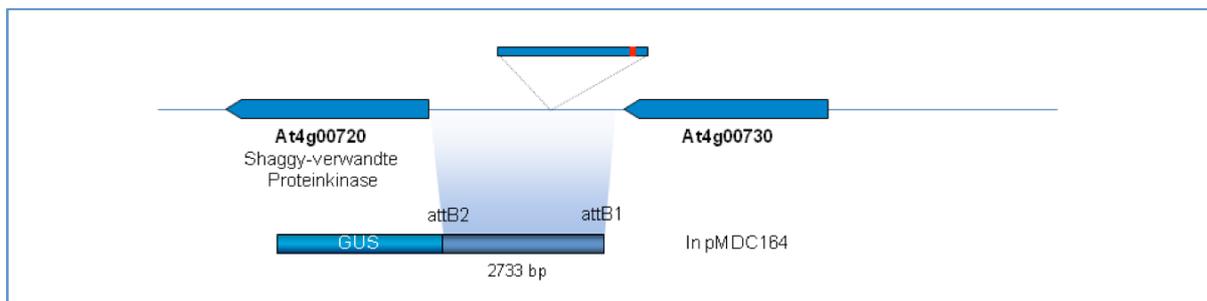


Abbildung 47: Position der „Enhancer Trap“-Insertion in Linie 19956/32. Der hellblau unterlegte Bereich wurde vor den Translationsstartpunkt des GUS-Gens im pMDC164-Vektor kloniert.

Transgene *Arabidopsis*-Pflanzen zeigten bereits nach wenigen Stunden eine unspezifische GUS-Expression im ganzen Blatt (Abb. 48).

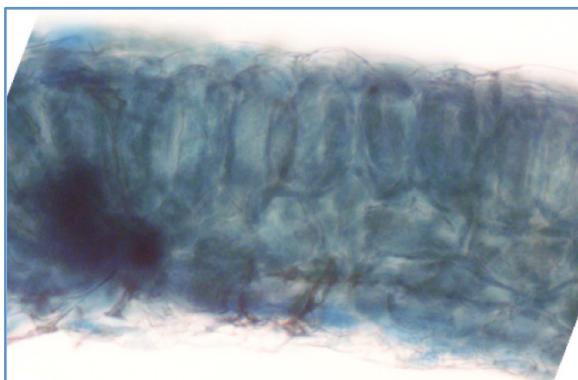


Abbildung 48: Unspezifische GUS-Expression im Blattquerschnitt einer transgenen Pflanze mit dem Konstrukt aus Abb. 47.

III.4.1.3. Überprüfung des Stromaufwärtsbereichs des Gens At4g00730 (Linie: 19956/32)

Weil „Enhancer“ bekannter Weise auch eine Fernwirkung haben, wurde auch der Stromaufwärtsbereich des Gens At4g00730 getestet, um zu überprüfen, ob der Promoter des Gens, ein stromabwärts lokalisiertes Konstrukt aktivieren kann (Abb. 49). Hier wurde der Bereich stromaufwärts von ATG (Position: 304103) des Gens At4g00730 amplifiziert.

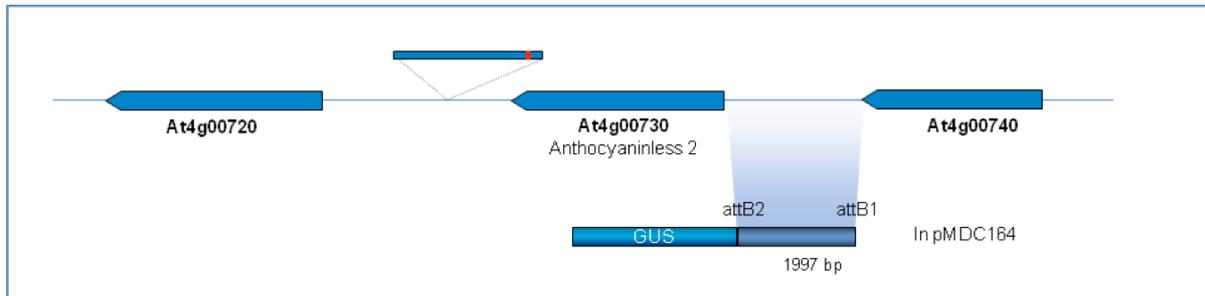


Abbildung 49: Amplifizierung des potentiellen ANL2-Promotors. Dargestellt ist der amplifizierte DNA-Abschnitt, der zur Herstellung des Konstrukts verwendet worden ist.

Auch dieses Konstrukt konnte die Expression der „Enhancer Trap“-Linie nicht reproduzieren, wie die Abbildung 50 zeigt.



Abbildung 50: GUS-Färbung im Blattquerschnitt einer transgenen *Arabidopsis*-Pflanze. Getestet wurde das 5'-Fragment des At4g00730-Gens.

III.4.1.4. Stromaufwärtsbereiche der Gene At4g01455 und At4g01460 (Linie: UCR8)

In der Linie UCR8 war das „Enhancer Trap“-Element zwischen den Genen At4g01455 und At4g01460 inseriert. Die Stromaufwärtsbereiche beider Gene, beginnend mit der ersten Base oberhalb von ATG, wurden mittels PCR aus genomischer DNA isoliert und unter Berücksichtigung der Orientierung jeweils vor ein GUS- Gen kloniert (Abb.51).

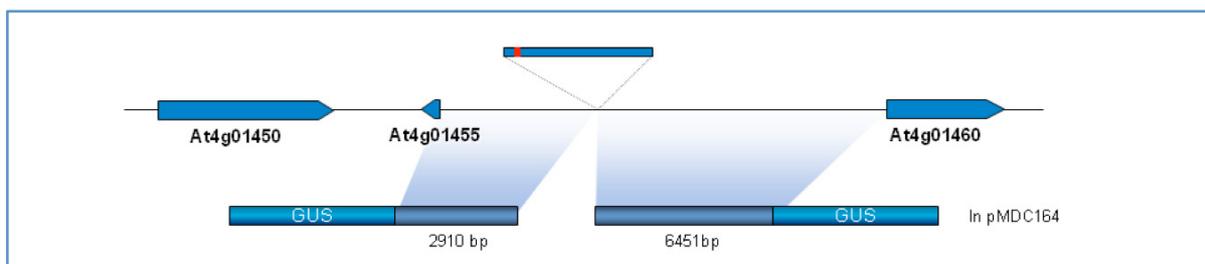


Abbildung 51: Position der Insertion in Linie UCR8 und Aufbau der hergestellten Konstrukte.

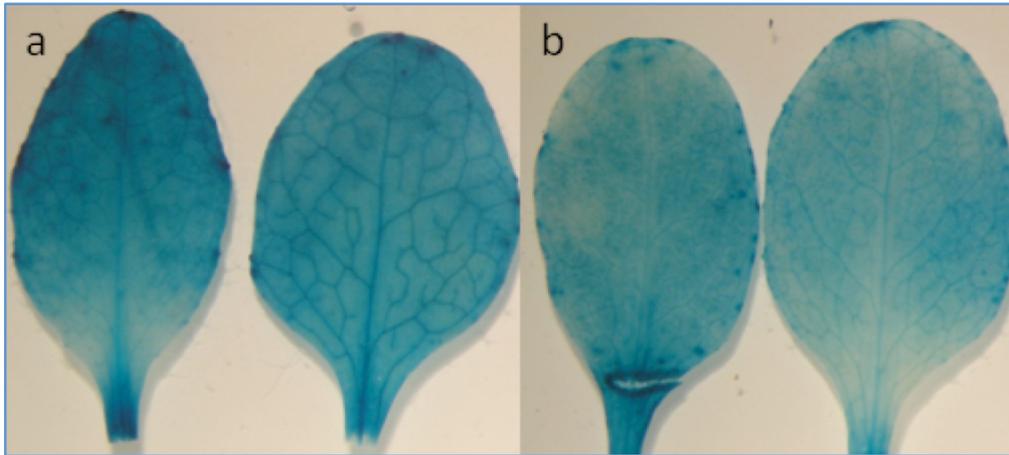


Abbildung 52: Expression der im pMDC164 erstellten Konstrukte. Stromaufwärtsbereiche der benachbarten Gene der Insertion in Linie UCR8 wurden verwendet. Stromaufwärtsbereich des Gens At4g01455 (a), des Gens At4g01460 (b).

Der Translationsstartpunkt des Gens At4g01455 befand sich an Position 611932, des Gens At4g01460 an Position 621334 auf Chromosom 4. Es wurde für beide Konstrukte der Gateway-kompatible pMDC164-Vektor verwendet. Die Expression beider GUS-Konstrukte war in allen Geweben des Blatts zu finden (Abb. 52 a und b). Deswegen wurde auf die Anfertigung von Blattquerschnitten verzichtet.

III.4.1.5. Überprüfung des Stromaufwärtsbereich des Gens At5g17850 (Linie: J2111)

Das „Enhancer Trap“-Konstrukt in Linie J2111 wurde zwischen den Genen At5g17840 und At5g17850 gefunden. Um zu überprüfen, ob 5'-Elemente des nächsten annotierten Gens eine bündelscheidenspezifische Expression steuern, wurde der Stromaufwärtsbereich des Gens bis zum nächsten annotierten Gen isoliert und vor ein GUS-Reportergen im pBI121 kloniert. Das Gen At5g17847 war nicht in allen Datenbanken annotiert, daher wurde es nicht berücksichtigt (Abb. 53).

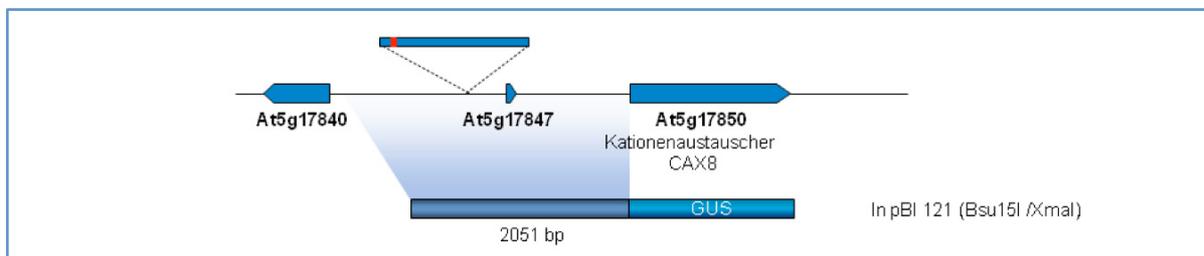


Abbildung 53: Position der „Enhancer Trap“-Insertion in der Linie J2111. Der Stromaufwärtsbereich des Gens At5g17850 wurde zur Herstellung des GUS-Fusionskonstrukts benutzt. Das ATG befindet sich an Position 5899253.

Die Expression des GUS-Konstrukts war in den Leitbündeln zu finden, mit teilweise diffus gefärbten Bündelscheidenzellen (Abb. 54 a, b). Die Expression des GUS-Konstrukts war der beobachteten GFP-Expression vom Muster her ähnlich, aber nicht identisch (vergl. Abb. 13).

Es gab eine Varianz in der GUS-Expressionsstärke in den Einzelpflanzen (Abb. 54 a). Einige Pflanzen färbten nach 23 h, die meisten erst nach drei Tagen Inkubation in der Färbelösung.

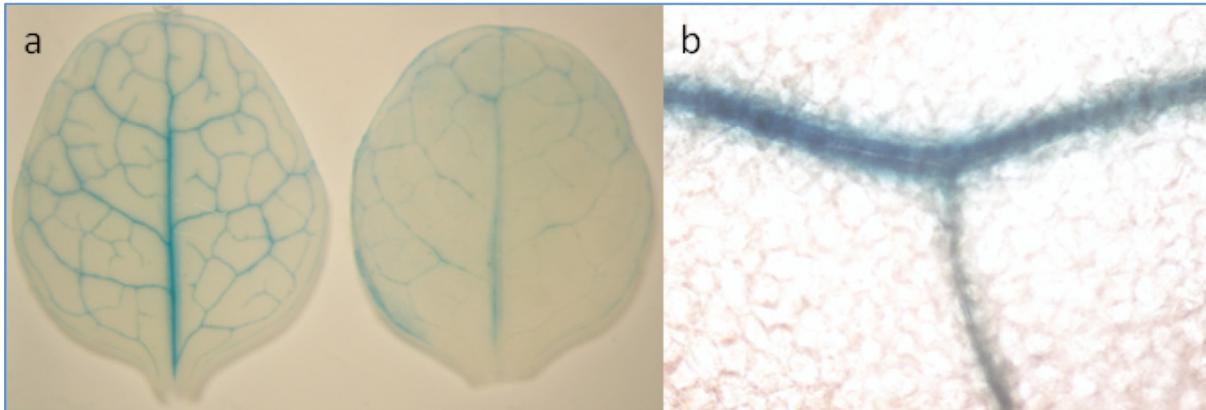


Abbildung 54: Expressionsmuster des CAX8-Stromaufwärtsbereichs. Aufsicht auf Blätter mit einer den Leitbündeln folgenden GUS-Färbung (a). Vergrößerte Aufsicht auf ein Leitbündel (b).

Auch wenn bekannt ist, dass „Enhancer“ unabhängig von ihrer Orientierung die Genexpression steuern, kann diese durch das Vorhandensein weiterer „Enhancer“ oder „Silencer“ beeinflusst worden sein. Um dies zu klären, müsste der getestete genomische Bereich in umgekehrter Orientierung oder nur der Bereich stromaufwärts der „Enhancer Trap“-Insertion (vgl. Abb. 53), mit dem GUS-Gen fusioniert werden. Eine weitere Erklärung ist, dass der „Enhancer“ nicht erfasst worden ist.

III.4.2. Hypothese 2: Ein einzelnes benachbartes *cis*-Element steuert die Expression des Reportergens

Um die Hypothese zu überprüfen, dass ein einzelnes der „Enhancer Trap“-Insertion benachbartes „Enhancer“-Element die Expression des Reportergens aktiviert, wurde versucht, das Insertionsereignis zu reproduzieren. Dafür wurden flankierende Sequenzen der „Enhancer Trap“-Insertionsorte isoliert. Diese wurden in der gleichen Orientierung, in der sie sich vor dem „Enhancer Trap“-Konstrukt befanden, vor ein GUS-Gen mit einem Minimalpromotor kloniert und in *Arabidopsis* transformiert.

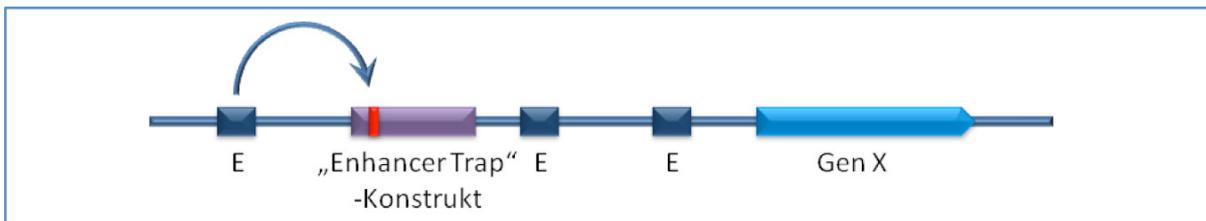


Abbildung 55: Aktivierung der Expression des „Enhancer Trap“-Konstrukts durch einen einzelnen benachbarten „Enhancer“ stromaufwärts des im Konstrukt vorhandenen Minimalpromotors.

III.4.2.1. Untersuchung der flankierende Sequenz nach den iPCR-Daten aus Linie JR11-2

Das inserierte „Enhancer Trap“-Konstrukt befindet sich 530 bp vor dem Translationsstartpunkt des Gens At5g10290 (Abb. 56) an Position 3238171. Das isolierte DNA-Fragment wurde in der gleichen Orientierung, wie es vor dem Enhancer Trap-Konstrukt gefunden wurde, vor das GUS-Gen mit einem Minimalpromotor fusioniert. Dabei enthielt es einen Teil des in der TAIR-Datenbank annotierten UTRs des Gens At5g10290 sowie den intergenischen Bereich bis zum nächsten Translationsstartpunkt an Position 3239684.

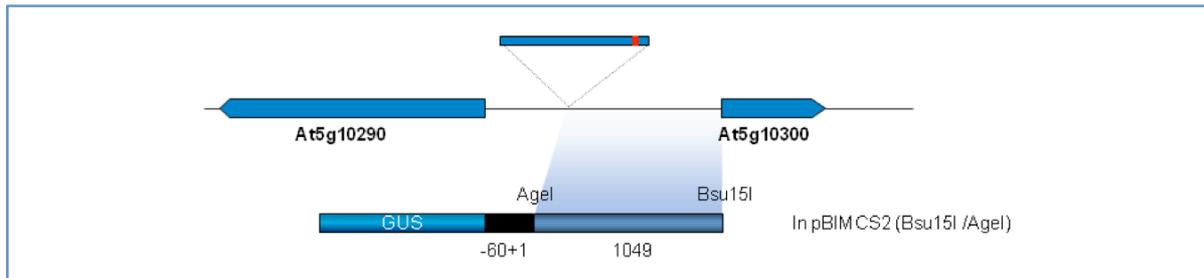


Abbildung 56: Position der „Enhancer Trap“-Insertion in der Linie JR11-2 und Aufbau der GUS-Fusionskonstrukts. Verwendet wurde der Vektor pBIMCS2 mit einem Minimalpromotor.

Von den 32 auf GUS-Expression getesteten Pflanzen zeigten zwölf keine sichtbare GUS-Färbung. Von den zwanzig Pflanzen, die GUS exprimierten, zeigten vier Expression in Leitbündeln, neun Expression in Leitbündeln und Hydathoden und sieben nur in Hydathoden (Abb. 57 a, b). Die Blätter wurden über Nacht bis zu drei Tagen in der Färbelösung inkubiert.

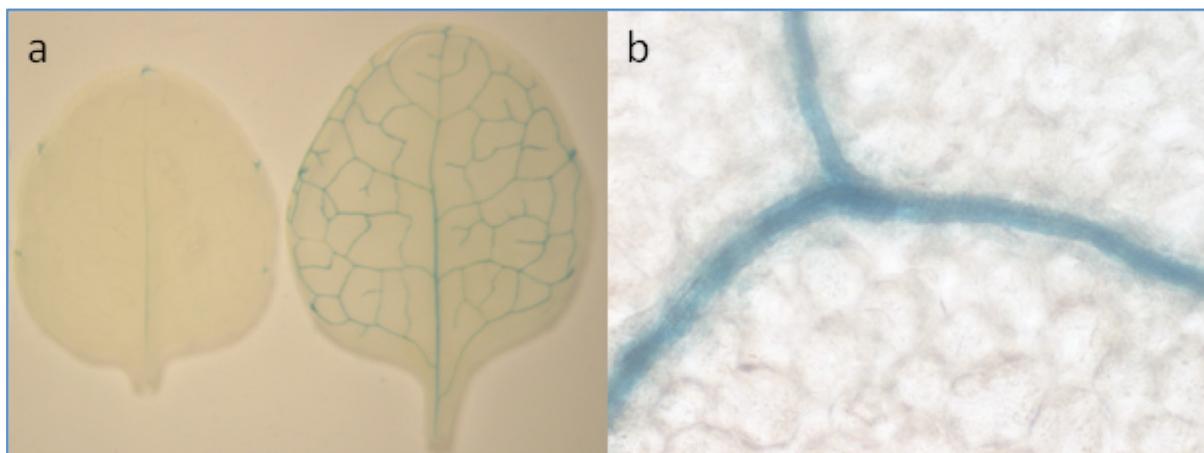


Abbildung 57: Expression des Konstrukts des flankierenden Bereichs aus Linie JR11-2. Aufsicht auf gefärbte Blätter mit GUS-Aktivität in Hydathoden und Leitbündeln (a). Vergrößerte Darstellung der Aufsicht auf ein gefärbtes Leitbündel (b).

Dieses Expressionsmuster entsprach nicht dem beobachteten Expressionsmuster des GFP-Reportergens, welches im Schwammparenchym der „Enhancer Trap“-Linie JR11-2 beobachtet werden konnte (vgl. Abb.16). Das Expressionsmuster der Linie JR11-2 konnte nicht reproduziert werden.

III.4.2.2. Untersuchung der flankierenden Sequenz nach den iPCR-Daten aus Linie UCR8

Basierend auf den Daten aus Linie UCR8 wurde ein weiteres Konstrukt erstellt. Hier wurde das Insertionsereignis reproduziert. Um zu verhindern, dass Elemente aus der T-DNA des pMDC164-Vektors die Expression überlagern, wurde der pBIMCS3-Vektor verwendet (Abb. 58).

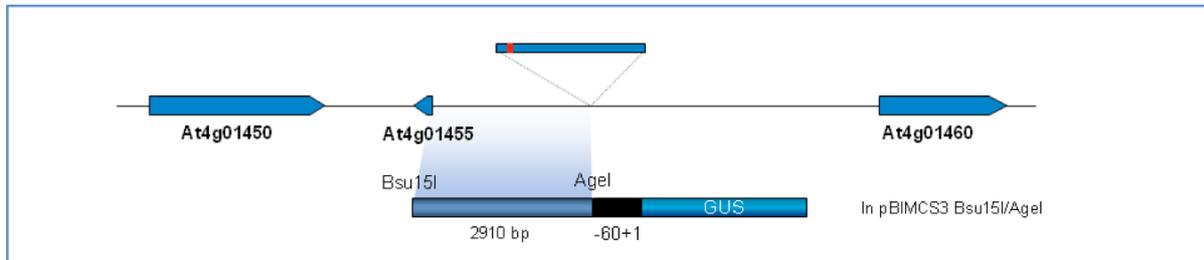


Abbildung 58: Linie UCR8: Reproduktion des Insertionsereignisses. Blau unterlegt wurde der amplifizierte genomische Bereich, der vor den Minimalpromotor des GUS Gens ligiert worden ist.

Im Gegensatz zu den Konstrukten, die im pMDC164-Vektor erstellt worden sind, zeigten die Konstrukte, die im pBI121-Vektor hergestellt worden sind, keine unspezifische GUS-Aktivität im Mesophyll. Nur vereinzelt wurde in den Pflanzen eine GUS-Expression im Leitbündel beobachtet, mit leichter GUS-Färbung in den Bündelscheiden (Abb. 59 a, b).

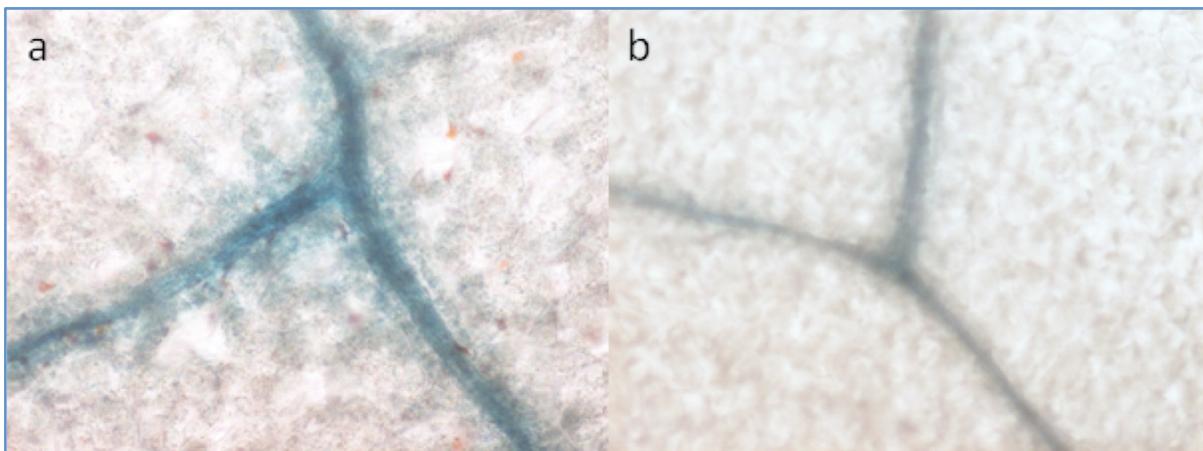


Abbildung 59: Expression des GUS-Konstrukts mit flankierender Sequenz der Insertionsposition aus UCR8. Es wurden überwiegend Leitbündel gefärbt (b). Selten wurde eine Färbung in Bündelscheidenzellen beobachtet (a).

Die Blätter wurden 20 - 23 h in der Färbelösung inkubiert. Insgesamt wurden 26 Pflanzen getestet, von denen zwölf keine sichtbare GUS-Expression zeigten. Vierzehn Pflanzen färbten in der Mittelrippe und teilweise in den Leitbündeln. Nur in zwei davon konnte eine leichte Färbung in Bündelscheidenzellen beobachtet werden.

III.4.2.3. Untersuchung der flankierenden Sequenz nach den iPCR-Daten aus Linie 19950/60

Um das in der Linie 19950/60 beobachtete GUS-Expressionsmuster wiederherzustellen wurden etwa vier Kilobasenpaare des flankierenden Bereichs der Insertion isoliert (Abb. 60).

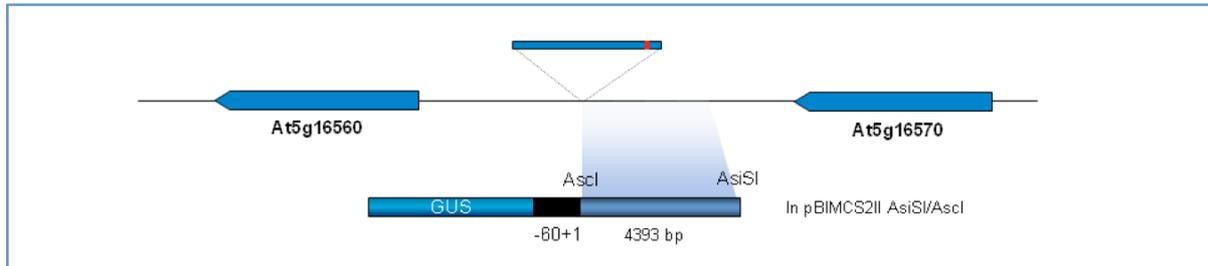


Abbildung 60: Linie 19950/60: Schematische Darstellung der zur Herstellung des Konstrukts verwendeten Region.

Das Fragment wurde in den modifizierten pBI121-Vektor pBI121MCSII ligiert. Es konnte in transgenen Pflanzen auch nach drei Tagen Inkubation in der Färbelösung keine GUS-Expression beobachtet werden.

III.5. Überprüfung von Stromaufwärtsbereichen von Genen mit beschriebenen Expressionsmustern im Mesophyll- und Bündelscheidenzellen

Es sind bereits mehrere „Promotoren“ beschrieben worden, deren Expressionsmuster in Bündelscheidenzellen zu finden waren. Die beschriebenen Expressionsmuster der Stromaufwärtsbereiche sollten einzeln überprüft werden.

III.5.1. Untersuchung des SCR 5'-Stromaufwärtsbereichs

Der in der Literatur beschriebene Bündelscheidenspezifische SCR-Promotor (Wysocka-Diller et al., 2000) wurde unter Verwendung der beschriebenen Primer amplifiziert (Malamy & Benfey, 1997). Der 2414 bp große genomische Bereich enthielt die Stromaufwärtssequenz oberhalb des Translationsstartpunktes ATG des SCR-Gens (Abb. 61).

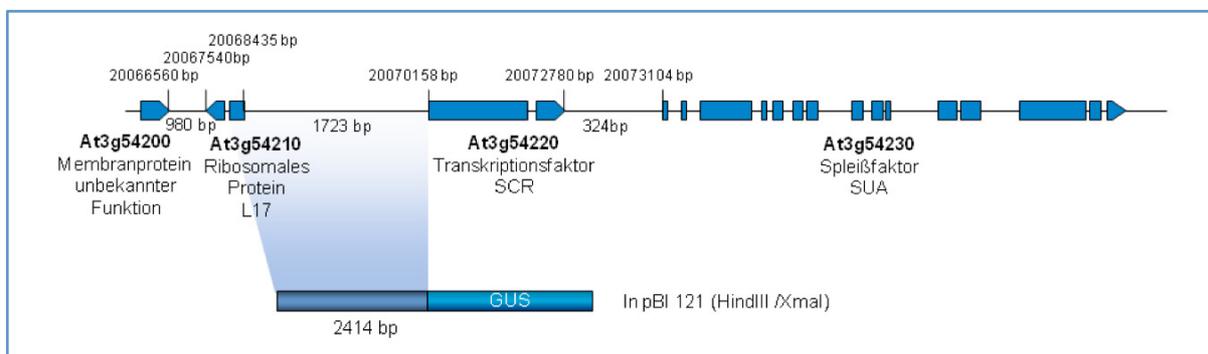


Abbildung 61: Amplifizierung des SCR-5'-Stromaufwärtsbereichs. Es wurde die Sequenz stromaufwärts des Translationsstartpunkt ATG an Position 20070550 auf Chromosom 3 amplifiziert. Der Transkriptionsstartpunkt befindet sich 392 bp stromabwärts vom ATG entfernt, an Position 20070158.

Dieser Bereich wurde mittels Gateway-Reaktion in den Gpbi121-Vektor rekombiniert und das GUS-Fusionskonstrukt in *Arabidopsis* transformiert. Transgene Pflanzen wurden auf das Vorhandensein einer GUS-Expression getestet, indem Blätter wie bereits beschrieben in GUS-Färbelösung inkubiert worden sind. Die Expression konnte nach wenigen Stunden im ganzen Blatt beobachtet werden, wobei die Leitbündel am stärksten angefärbt worden sind (Abb. 62 a, c). Dies weicht von der bisherigen Beschreibung des Expressionsmusters ab (Wysocka-Diller et al., 2000). Übereinstimmung mit bisherigen Beobachtungen zeigte sich jedoch in der Wurzel. Dort konnte in den getesteten Pflanzen, wie beschrieben, eine Expression in der Endodermis beobachtet werden (Abb. 62 e).

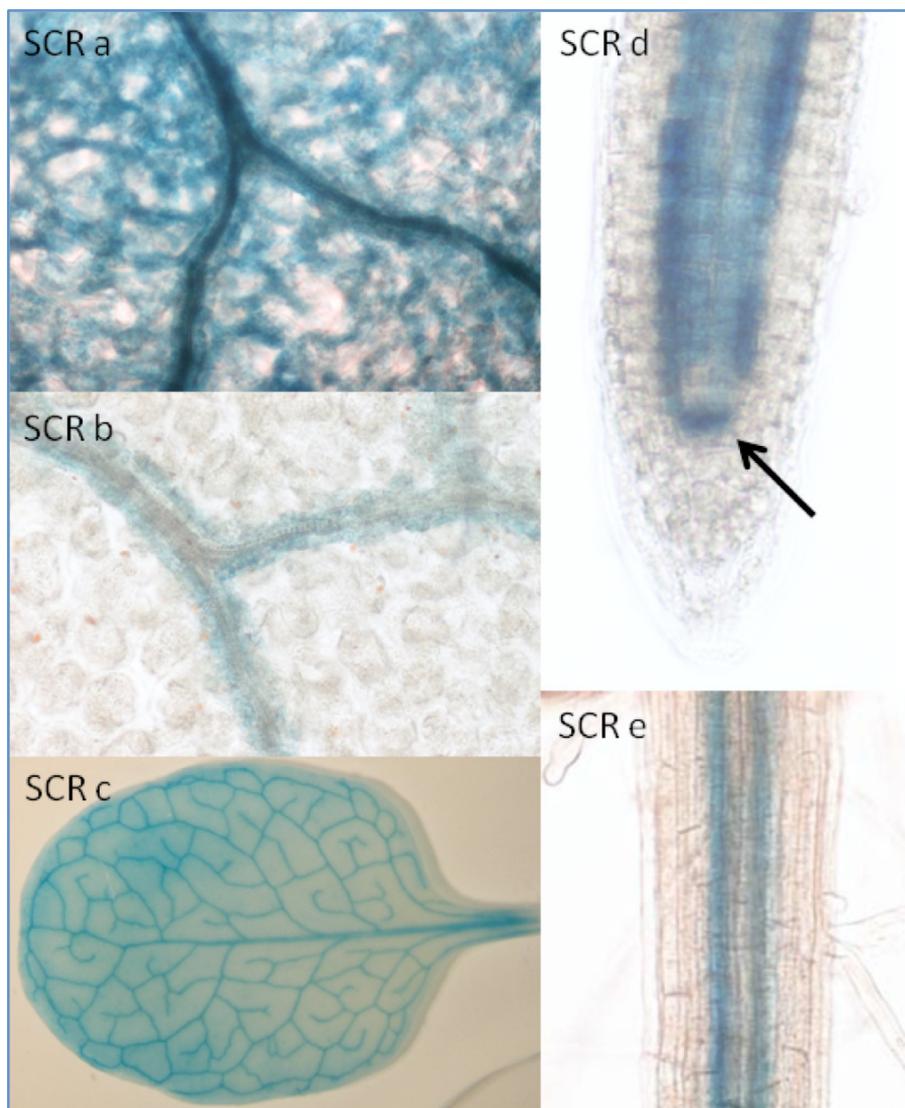


Abbildung 62: GUS-Expressionsmuster des pSCR::GUS-Konstrukts in *Arabidopsis*. In den meisten Pflanzen war die GUS-Expression in den Leitbündeln, Bündelscheidenzellen und Mesophyll zu beobachten (a, c). Pflanze mit Bündelscheidenspezifischer Expression (b). GUS-Färbung in der Wurzel (d, e). Gefärbt wurde die Endodermis und das Ruhezentrum (Pfeil).

Im Ruhezentrum der Wurzel war eine in der Stärke variierende, jedoch immer vorhandene GUS-Färbung zu sehen (Abb. 62 d). Um auszuschließen, dass Elemente auf der T-DNA des

Vektors die Expressionsmuster beeinflussen könnten, wurde der SCR-Stromaufwärtsbereich im pBI121-Vektor getestet. Hier war die GUS-Expression im Mesophyll vieler Pflanzen reduziert und überwiegend im Leitbündel zu finden. Bündelscheidenzellen waren nur leicht gefärbt. Doch es färbten auch bei der Verwendung des pBI121-Vektors einzelne Pflanzen im gesamten Blatt. Beide Konstrukte hatten gemeinsam, dass es vereinzelt Pflanzen gab, die das GUS-Reportergen spezifisch in Bündelscheidenzellen exprimierten (Ab. 62 b).

Im Gpbi121-Vektor zeigten nur drei von fünfzehn Pflanzen bündelscheidenspezifische GUS-Expression. Alle anderen zeigten auch Expression im Mesophyll. Pflanzen, die mit dem Konstrukt im pBI121-Vektor transformiert worden sind, exprimierten überwiegend im Leitgewebe, auch wenn einige Pflanzen beobachtet werden konnten, die eine GUS-Expression in allen Geweben des Blattes zeigten.

SCR gehört zu den Transkriptionsfaktoren der GRAS-Proteinfamilie. Es gibt eine Reihe SCR-ähnlicher Proteine, die vor allem in der Wurzel exprimiert sind und dort an der Entwicklung beteiligt sind (Sánchez et al., 2007).

III.5.2. Untersuchung des *CUE1*-5'-Stromaufwärtsbereichs

Um den Stromaufwärtsbereich des *CUE1*-Gens (Li et al., 1995, Knappe et al., 2003) zu überprüfen, wurde dieser vor das GUS-Gen fusioniert (Abb. 63). Dabei enthielt diese Sequenz einen Teil (310 bp) des ersten Exons, nachdem der Versuch, nur den Stromaufwärtsbereich vor dem Translationsstart ATG (Position: 12588950) zu isolieren, nicht erfolgreich war. Auch in der Literatur wurden Fragmente beschrieben, die einen Teil des ersten Exons enthalten (Knappe et al., 2003).

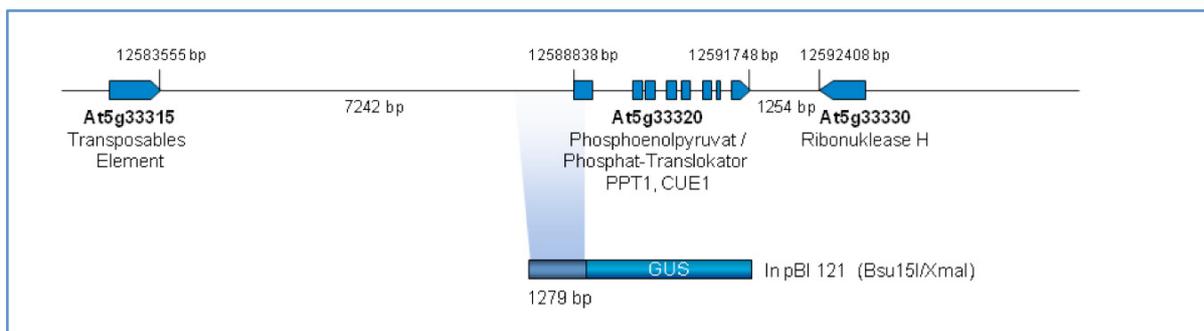


Abbildung 63: Amplifizierung des potentiellen *CUE1*-Promotors. Das amplifizierte DNA-Fragment enthielt einen Bereich von 422 bp stromabwärts des in der Abbildung annotierten mutmaßlichen Transkriptionsstartpunktes.

Die GUS-Expression war nur in einigen Adern im Leitbündel zu finden, wie auch in einigen Bündelscheidenzellen (Abb. 64 a, b, c). Es wurden zwanzig transgene Pflanzen auf GUS-Expression getestet. In vierzehn von diesen war keine GUS-Expression nachzuweisen. Sechs

Pflanzen färbten in einigen Leitbündeln, davon zwei in Bündelscheidenzellen. Eine Pflanze färbte bereits nach acht Stunden. Alle anderen wurden 20-23 h in der Färbelösung inkubiert.

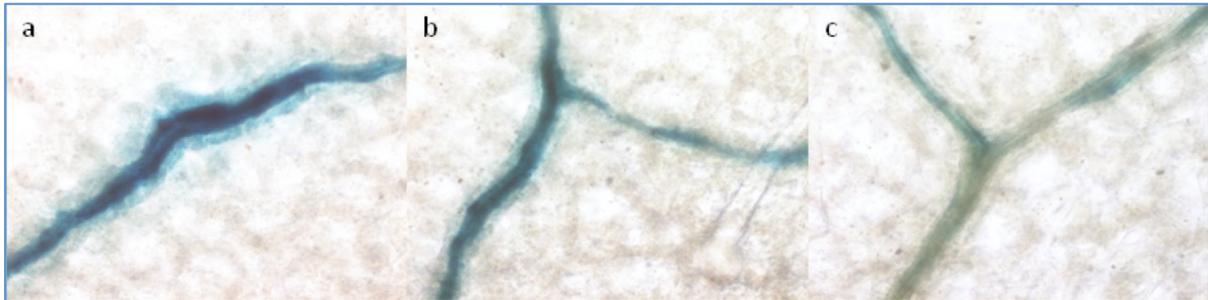


Abbildung 64: GUS-Expression des *Atppt*-Stromaufwärtsbereichs in *Arabidopsis*. Die Expression war in wenigen Pflanzen im Leitbündel (a) und teilweise in Bündelscheidenzellen (a, b) zu beobachten.

Auch der Stromaufwärtsbereich des *CUE1*-Gens wurde hier mit einem GUS-Gen fusioniert und in *Arabidopsis* transformiert. Es handelt sich hierbei um einen Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokator (*AtPPT1*). Das Genprodukt sorgt für den Transport von Phosphoenolpyruvat in die Plastiden, welches in den Shikimatweg eingeschleust wird und essentiell für die Blattentwicklung ist (Knappe et al., 2003). Die Expression des Stromaufwärtsbereich wurde bereits beschrieben (Knappe et al., 2003). Junge Blätter exprimierten GUS nur in den Bündelscheidenzellen und nicht im Mesophyll, während ältere Blätter eine Expression im ganzen Blatt zeigten (Knappe et al., 2003). In Mutanten konnte eine Chlorose im Mesophyll beobachtet werden, während Bündelscheidenzellen nicht betroffen waren. Eine Ursache ist die fehlende Expression des *CAB*-Gens im Mesophyll (Li et al., 1995). In diesen Versuchen konnte die GUS-Expression dagegen nur in einzelnen Adern und Bündelscheidenzellen beobachtet werden (Abb. 64).

III.5.3. Untersuchung des *APX2*-5'-Stromaufwärtsbereichs

Ebenso wurde die Sequenz stromaufwärts des Translationsstarts ATG des *APX2*-Gens (Ascorbatperoxidase 2) vor das GUS-Gen fusioniert.

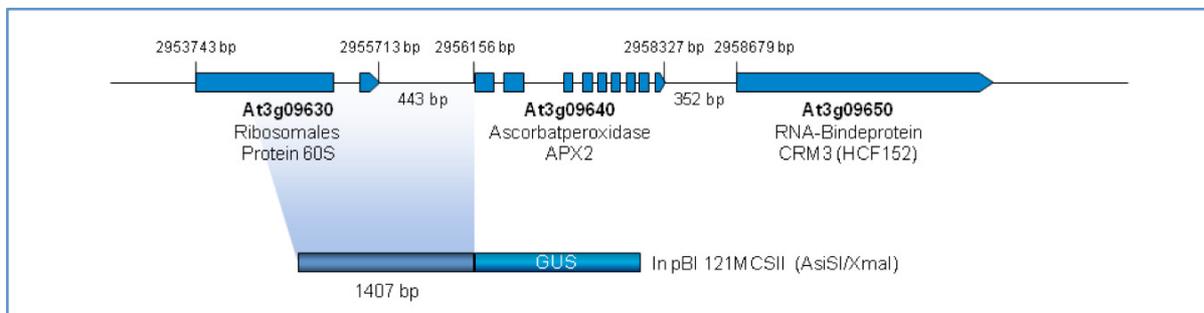


Abbildung 65: Amplifizierung des Stromaufwärtsbereichs des *APX2*-Gens. Der Translationsstartpunkt befindet sich 145 bp Stromabwärts (Position: 2956301) des in der Abbildung annotierten Transkriptstartpunkts.

Dieser Stromaufwärtsbereich ist als bündelscheidenspezifisch aktiv beschrieben worden (Fryer et al., 2003). Das Fragment hatte eine Länge von 1407 bp. In der Abbildung 65 wurde die Lage des Gens *APX2* auf Chromosom 3 schematisch dargestellt.

Keine der neunzehn getesteten Pflanzen, die das Konstrukt enthielten, zeigte auch nach drei Tagen Inkubation in der Färbelösung eine sichtbare GUS-Färbung.

III.5.4. Untersuchung des *Sultr2;2*-Stromaufwärtsbereichs

Desweiteren wurde der bereits vorcharakterisierte Stromaufwärtsbereich des *Sultr2;2*-Gens vor ein GUS-Gen im pBI121-Vektor kloniert (Takahashi et al., 2000).

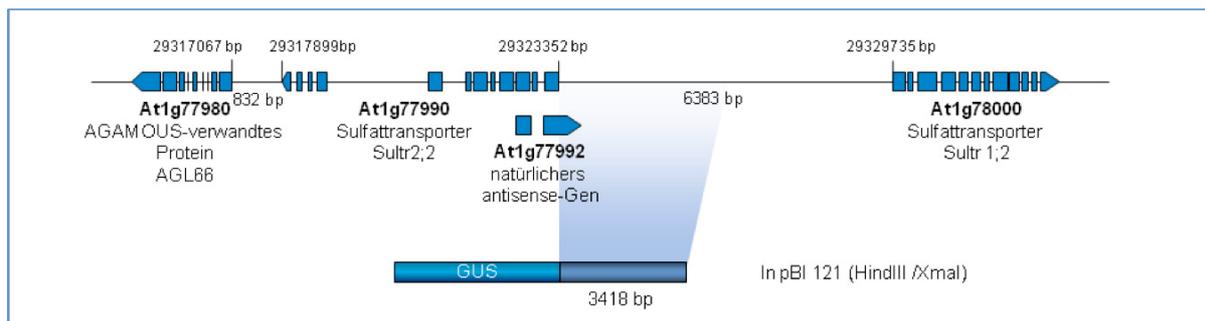


Abbildung 66: Amplifizierung des Stromaufwärtsbereichs des Gens At1g77990. Amplifiziert wurde der Bereich stromaufwärts von ATG (Position: 29323249) das in einer Entfernung von 142 bp vom annotierten Transkriptionsstartpunkt befindet.

Dieser 3418 bp lange Bereich stromaufwärts des Translationsstartpunktes ATG zeigte das beschriebene Expressionsmuster (Abb. 67). Die Expression wurde in Kotyledonen und in Blättern beobachtet. In Keimlingen des Kotyledonenstadiums konnte vereinzelt bereits GUS-Färbung in entstehenden Primärblättern beobachtet werden. In Hypokotyl wurde keine GUS-Färbung beobachtet. Dagegen zeigten einige Pflanzen teilweise Färbung in Leitungssystem der Wurzel.

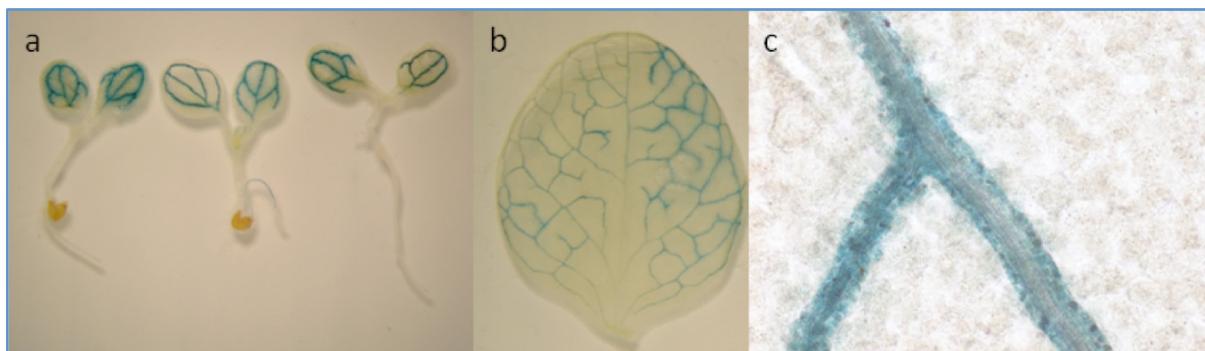


Abbildung 67: GUS-Expressionsmuster des *Sultr2;2*-Stromaufwärtsbereichs. GUS-Expression in Kotyledonen von Keimlingen (a). Aufsicht auf ein gefärbtes Blatt mit GUS-Expression in Bündelscheidenzellen (b). Vergrößerter Ausschnitt der Aufsicht auf eine Leitbündel (c). Erkennbar sind die gefärbten Bündelscheidenzellen.

Die ersten Blätter färbten nach bereits vier bis fünf Stunden. Die meisten wurden 20 bis 23 h gefärbt. Es wurden vierzehn Pflanzen getestet. Elf Pflanzen färbten in den

Bündelscheidenzellen, drei zeigten keine GUS-Expression. Das Expressionsmuster des *Sultr2;2*-Stromaufwärtsbereichs wurde bestätigt (Takahashi et al., 2000). Die Expression ist in den Bündelscheidenzellen beobachtet worden. Der *Sultr2;2* Promotor zeigte nur eine geringe Aktivität. Die erste sichtbare Färbung konnte vereinzelt nach etwa fünf Stunden detektiert werden.

III.5.5. Untersuchung des *Sultr3;3*-Stromaufwärtsbereichs

Die BLAST-Suche hat ergeben, dass das Gen Sb06g030980 aus *Sorghum bicolor*, welches Bündelscheidenspezifisch exprimiert ist, das nächste Orthologe des *Sultr3;3*-Gens (At1g23090) ist. Um zu überprüfen, ob der Stromaufwärtsbereich des *Sultr3;3*-Gens ebenfalls eine Bündelscheidenaktivität besitzt, wurden 3356 bp der Sequenz stromaufwärts des Translationspunktes des *Sultr3;3*-Gens isoliert um diese zu untersuchen.

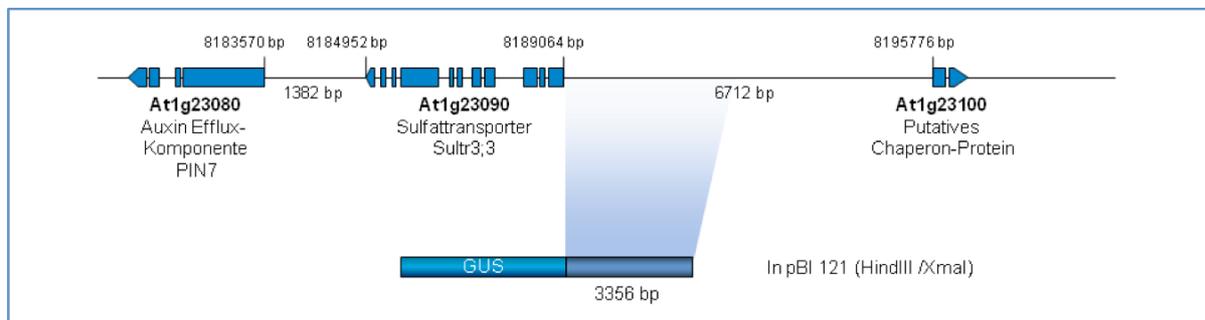


Abbildung 68: Überprüfung der Stromaufwärtsregion des Gens At1g23090. Der Translationsstartpunkt des Gens befindet sich 110 bp hinter dem in der Abbildung annotierten mutmaßlichen Transkriptionsstartpunkt (TAIR).

Das GUS-Konstrukt zeigte eine Aktivität in vereinzelt Bündelscheidenzellen oder in Gruppen von Bündelscheidenzellen in der Blattspreite (Abb.69).

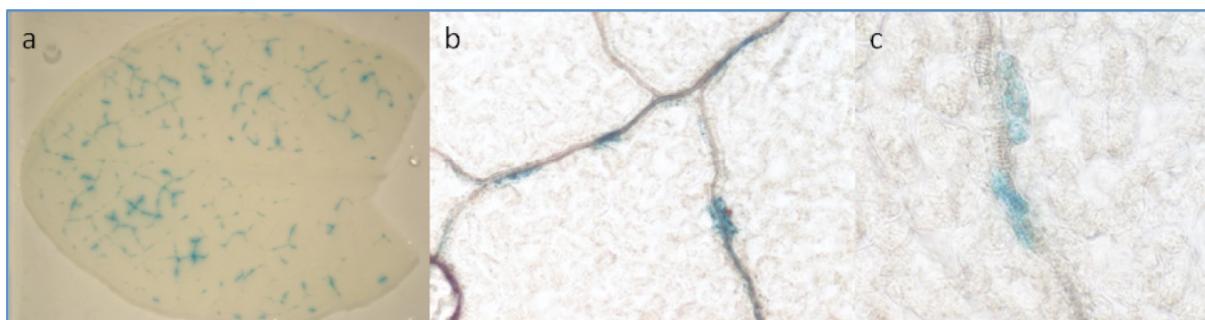


Abbildung 69: GUS-Expressionsmuster des *Sultr3;3*-Stromaufwärtsbereichs. Aufsicht auf ein gefärbtes Rosettenblatt (a). Blattadern mit gefärbten Bündelscheidenzellen (b). Vergrößerte Darstellung von gefärbten Bündelscheidenzellen (c).

Es wurden in diesem Versuch Blätter von fünfzig transgenen Pflanzen auf GUS-Expression getestet. Davon zeigten 37 keine detektierbare GUS-Expression. Dreizehn Pflanzen färbten in Bündelscheidenzellen. Färbungen älterer Rosettenblätter zeigten eine GUS-Expression innerhalb des Leitbündels. Die Blätter wurden 27- 50 h gefärbt.

III.6. Untersuchung des *Sultr2;2*-Stromaufwärtsbereichs auf das Vorhandensein von „Enhancer“-Elementen

Die bündelscheidenspezifische Aktivität des Stromaufwärtsbereichs des *Sultr2;2*-Gens konnte in den vorangegangenen Experimenten bestätigt werden. Folglich enthält dieser Bereich alle Elemente, die zur Aktivierung der bündelscheidenspezifischen Expression notwendig sind. Um diese Elemente zu identifizieren, wurde wie nachfolgend beschrieben, eine klassische Deletionsanalyse durchgeführt, um den Bereich einzugrenzen, in dem sich der bündelscheidenspezifische „Enhancer“ befindet.

III.6.1. Deletionsanalyse des *Sultr2;2*-Stromaufwärtsbereichs

Der 3504 bp lange Stromaufwärtsbereich des *Sultr2;2*-Gens wurde zunächst grob in vier Deletionskonstrukte unterteilt.

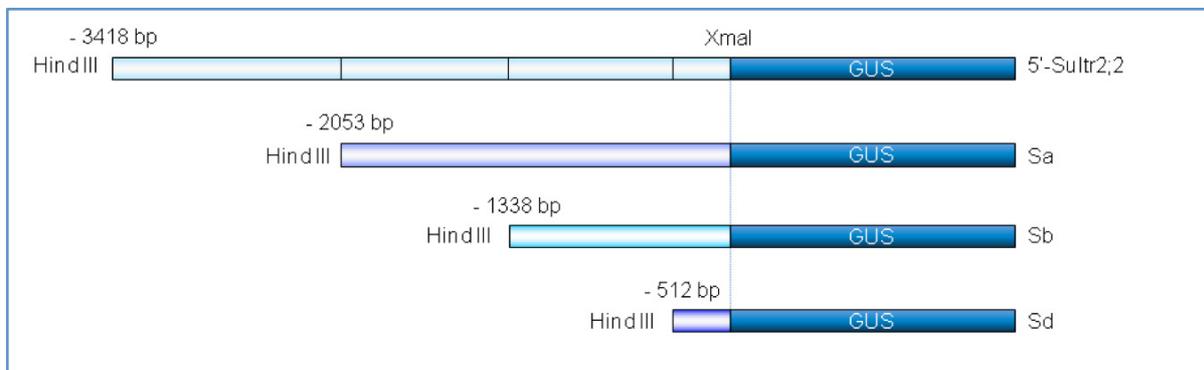


Abbildung 70: Deletionskonstrukte der *Sultr2;2* 5'-Stromaufwärtsbereichs. Schematische Zeichnung der angefertigten Deletionskonstrukte; Sa: 2053 bp, Sb: 1338 bp, Sd: 512 bp. S: Sulfattransporter.

Dabei wurde der Stromaufwärtsbereich, wie in Abb. 70 dargestellt, schrittweise vom distalen Ende aus deletiert. Die XmaI-Schnittstelle wurde unmittelbar vor dem ATG des Gens eingefügt und erlaubte die Klonierung in den pBI121-Vektor, sowie seine Derivate.

Die mit PCR aus genomischer DNA amplifizierten Fragmente wurden in den pBI121-Vektor kloniert, in *Arabidopsis* transformiert und die Expressionsmuster des GUS-Fusionskonstrukts überprüft.

III.6.2. *In-situ*-Nachweis der GUS-Expression von Deletionskonstrukten des *Sultr2;2*-Promotors

Blätter transgener Pflanzen, die jeweils eines der Deletionskonstrukte enthielten, wurden gefärbt, um die GUS-Expression nachzuweisen. Um die Expressionsmuster in den einzelnen Zelltypen genauer zu untersuchen, wurden Blattquerschnitte angefertigt (Abb. 71).

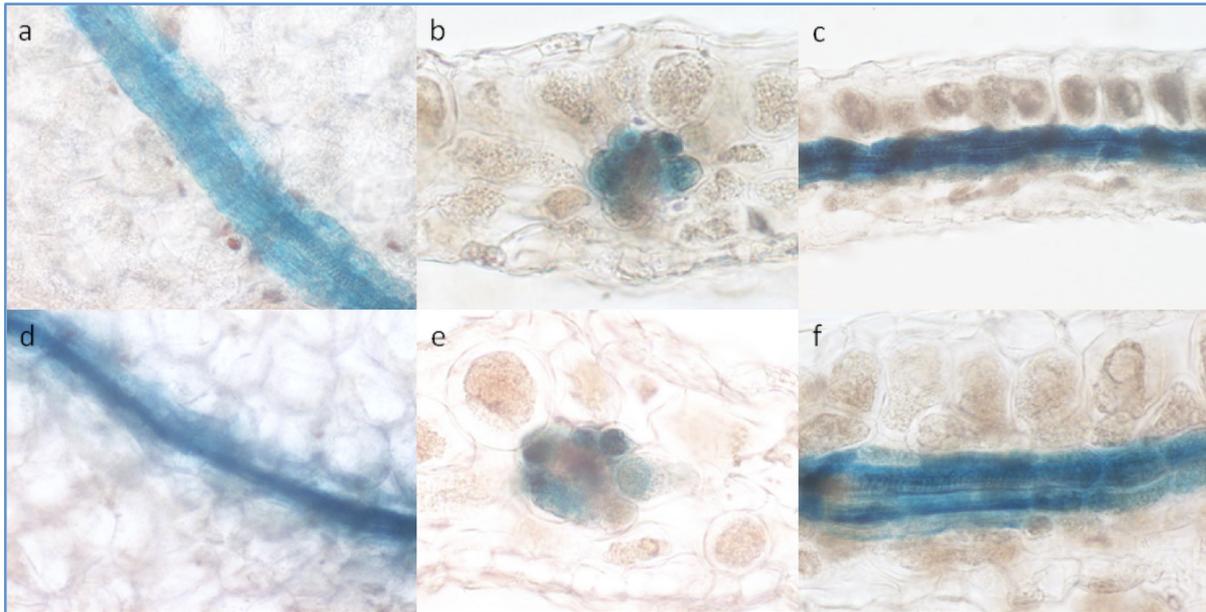


Abbildung 71: Expressionsmuster des *Sultr2;2* Vollängenpromotors (a, b, c) und des Deletionskonstrukts Sa (d, e, f). Leitbündel in Aufsicht (a, d). Querschnitt durch das Leitbündel (b, e). Längsschnitte in der Nähe eines Leitbündels (c, f).

Die Expression des Sa::GUS-Konstrukts war mit dem *Sultr2;2*::GUS vergleichbar. Pflanzen, die mit dem Sb::GUS-Konstrukt transformiert worden sind, zeigten auch nach drei Tagen Inkubation in der Färbelösung keine sichtbare GUS-Expression. Ebenso zeigte das Konstrukt Sd::GUS keine Expression. Ganze Blätter mit Sa-Konstrukt zeigten teilweise eine Verlagerung der GUS-Färbung ins Leitbündel und eine nicht klar auf die Bündelscheiden begrenzte Färbung, während die GUS-Färbung in Schnitten keine diffuse Färbung zeigte (Abb. 71 d-f).

III.6.3. Fluorimetrischer Nachweis der GUS-Aktivität in den *Sultr2;2*-Deletionskonstrukten

Um die GUS-Aktivität der Deletionskonstrukte mit dem Vollängenpromotor des *Sultr2;2*-Gens vergleichen zu können, wurde die Aktivität in Proteinextrakten aus Blättern der Transformanten bestimmt (Abb. 72). Die grafische Auftragung der Aktivität in $\text{mmol MU}/(\text{mgProtein} \cdot \text{min})$ ist in Abbildung 72 dargestellt. Die Aktivität des Deletionskonstrukts Sa war mit der Aktivität des Vollängen-*Sultr2;2*-Promotor vergleichbar. Die Konstrukte Sb und Sd zeigten keine GUS-Färbung und auch im fluorimetrischen Nachweis war die GUS-Aktivität ähnlich der des Wildtyps. Dargestellt sind die gemessenen GUS-Aktivitäten in $\text{nmol MU}/(\text{mgProtein} \cdot \text{Min.})$ in einer semi-logarithmischen Auftragung. Der Median ist jeweils mit einer roten Linie markiert. N ist die Anzahl der gemessenen Proben.

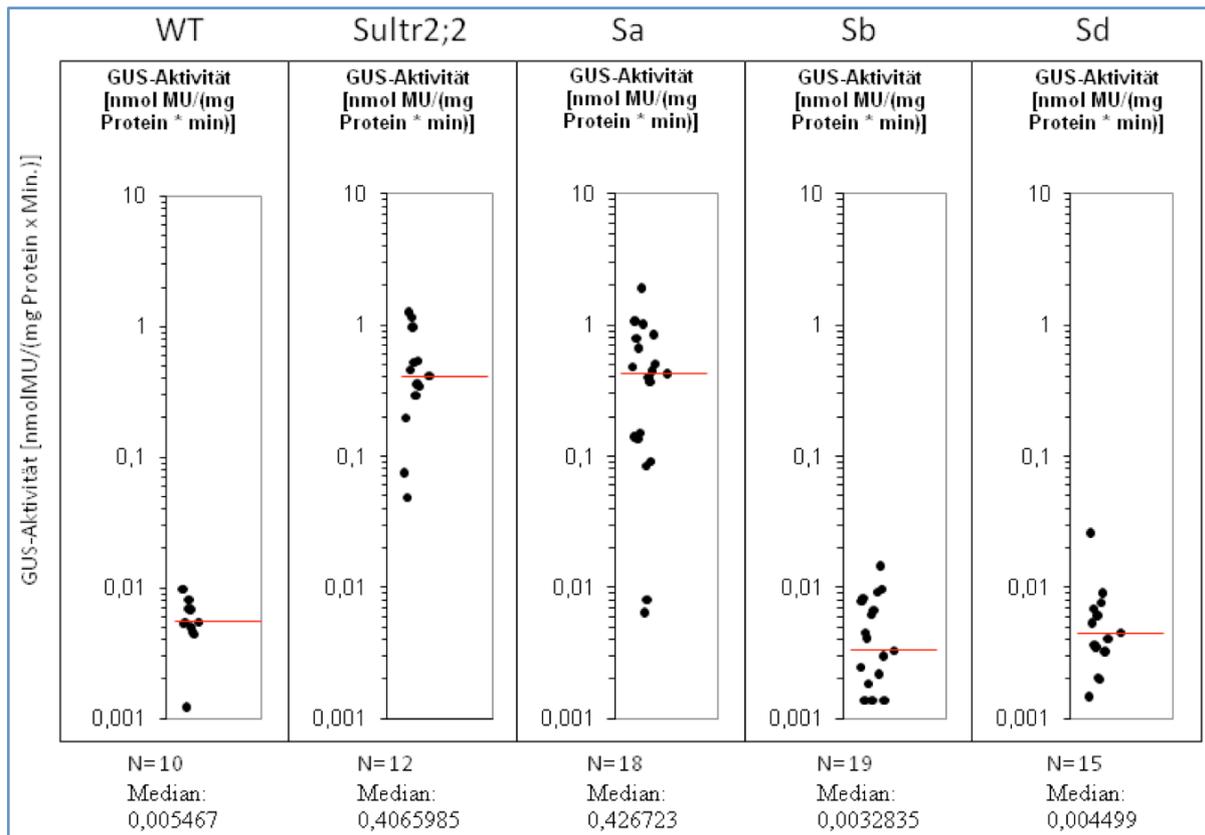


Abbildung 72: Quantitative Bestimmung der GUS-Aktivität in Deletionskonstrukten des *Sultr2;2*-Promotors.

III.6.4. Vergleich der 5'-Stromaufwärtssequenzen der Gene *Sultr2;2* und *Sultr3;3*

Der Sulfattransporter *Sultr2;2* zeigte eine GUS-Expression in Bündelscheidenzellen. Um herauszufinden, wo in dem 3418 bp langem Fragment die *cis*-regulatorischen Elemente liegen, wurden Deletionskonstrukte angefertigt (Abb. 70). Um das Deletionskonstrukt Sa herzustellen, wurden die distalen 1365 bp deletiert. Der verbleibende 2053 große Bereich zeigte weiterhin GUS-Aktivität (Abb. 71 und 72). Die Deletion der nächsten 714 bp im Konstrukt Sb führte zum kompletten Verlust einer sichtbaren und messbaren GUS-Aktivität (Abb. 72). Dies lässt darauf schließen, dass die Elemente für Quantität in einer Entfernung von ca. zwei Kilobasenpaaren vom Translationsstartpunkt des *Sultr2;2*-Gens liegen. In der Abbildung 73 ist ein Ausschnitt des Vergleichs der Stromaufwärtsbereiche des *Sultr2;2*- und des *Sultr3;3*-Gens dargestellt. Dieser enthält die ca. 700 distalen Basenpaare des *Sultr2;2*-Stromaufwärtsbereichs. Farblich unterlegt wurden die Primerbindestellen, mit denen die Deletionskonstrukte erstellt worden sind. An der Position 1457 bis 4188 des Alignments befindet sich die von Muströph et al. (2009) verwendete Primerbindestelle. Demnach müssen sich alle für eine Bündelscheidenspezifische Expression notwendigen „Enhancer“-Elemente stromabwärts dieser Bindestelle befinden.

Sultr221340	GTTCTAATtt	ttttcgtgaa	cacacaatgc	atccaaaaca	tggegccttc
Sultr331963	TTTTAAATag	ttgtcgaat	ctag-----	-----	-----
	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *
Sultr221390	cattattTTC	AAAATTTTAA	CCATTATTAT	TGAcgggcac	ataacacgAA
Sultr331987	-----TTC	AAATTTTGAA	GAAATAAGAT	TTAgtgaatt	gataaaa-AA
	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *
Sultr221440	TTTGTGAGT	TGCGTTagac	caaagaatcc	tacgtaccat	aggactatgg
Sultr332029	TGTATTTAGT	TGCGTTttgc	tcattttaag	ggattgcaat	tgtcttttgg
	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *
Sultr221490	cattaaagta	gctagtttg	aggattctgg	tgggtgaaaa	aaagtaaata
Sultr332079	gttg-----	-----	-----	-----	-----
	*				
Sultr221540	agtgaataag	aattggttca	tagtggaag	acaacctat	atgactcatg
Sultr332083	-----	-----	-----	-----	-----
Sultr221590	cgtagtggaa	agatagagaa	caacttatat	gactcatgcg	tagacatga
Sultr332083	-----	-----	-----	-----	-----
Sultr221640	tcgtacgatg	aatagattcc	attggttatg	attataagta	agcaaaattc
Sultr332083	-----	-----	-----	-----	-----
Sultr221690	caaaacggaa	aaagaaaatg	tggaccgaac	atgccagtg	accacatcac
Sultr332083	-----	-----	-----	-----	-----
Sultr221740	atccgttcaa	ttccatattc	ttccatataa	aaagataagg	aaaagagac
Sultr332083	-----	-----	-----	-----	-----
Sultr221790	ccaaaagaa	aagaacaacc	ttatatgcat	aatcaaactt	tcatttgcatt
Sultr332083	-----	-----	-----	-----	-----
Sultr221840	ttctttttca	tcttcgtttt	ccttcgaaat	caattatata	gtatagtgcc
Sultr332083	-----	-----	-----	-----	-----
Sultr221890	ttctttctcc	aTCAAACCAT	TCTTGTTTTG	TTTGGcaacg	ctgacatctc
Sultr332083	-----	-TCAAACATT	TTTTGTTTTA	ATTAGttgcc	gaaatttagt
		* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *
Sultr221940	cacttaaaat	attcgttttg	gatcaaagct	catatatggt	cttgtgttga
Sultr332122	ttaaattttg	gaaaaatctg	cg-----	-----	-----
		* * *			
Sultr221990	TGATATTTTG	GATATCGATT	TGTTTgtaa	-----T	TTTTGAGCAT
Sultr332144	TGATATATGG	GATTGGAATA	TATTTagaat	gtttttcgtT	TGTTAATCAA
	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *
Sultr222031	TTTATTAAGT	ATATACTAGT	TATTAAtat	taaaaagtac	acgaaatttt
Sultr332194	TTTATTGCTA	AAAACTAAT	AATTAAtat	cagtggcagc	ctttgtaaat
	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *
Sultr222081	ctgatcatct	aacattggtg	gtatgctaca	atcgcacatt	ttaatataatg
Sultr332244	aagttccaac	tccaggattt	atttcacaaa	atggctgcaa	-----
	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *

Abbildung 73: Vergleich der *Sultr2;2*- und *Sultr3;3*-Stromaufwärtsbereiche. Dargestellt ist ein Ausschnitt des Alignments im Bereich der distalen 700 bp des Sa-Deletionskonstrukts. Gelb: Primerbindestellen (vgl. Tab.5). Positionen 1457-1467 des Alignments: Von Mustroph et al. (2009) verwendete Primerbindestelle. Bindestellen für Transkriptionsfaktoren (PLACE-Datenbank): blau: AAACAAA-Motiv, orange: NGATT, violett: GATA, grün: ATATT

Die im Alignment übereinstimmenden Bereiche sind nur wenig konserviert. Diese wurde mit Hilfe der PLACE-Datenbank auf das Vorhandensein von Bindestellen für

Transkriptionsfaktoren untersucht. Hier konnten vier verschiedene Bindestellen identifiziert werden. Auf dem minus-Strang beider Sequenzen befindet sich die AAACAAA-Erkennungssequenz. Bis vor kurzem war diese Sequenz nur in Promotoren von Genen gefunden worden, die aus Tieren, Vögeln und Insekten stammten. Inzwischen ist das Motiv auch in Pflanzen gefunden worden. Gene, die unter Sauerstoffmangel aktiviert werden, enthalten die beschriebene Konsensus-Sequenz, zu der es bisher keinen bekannten Transkriptionsfaktor gibt (Mohanty et al., 2005). Sauerstoffmangel kann auftreten, wenn Pflanzen überschwemmt werden. Dann wird die Respiration des Krebs-Zyklus zur Fermentation hin umgestellt. Dabei werden anaerob-induzierbare Gene eingeschaltet (Mohanty et al., 2005).

Der Faktor ROOTMOTIFTAPOX1 bindet an der ATATT-Erkennungssequenz. Dieses Motiv ist Bestandteil des rolD-Promotors aus *Agrobacterium rhizogenes* (Elmayan & Tepfer, 1995).

Der ARR1AT-Faktor (*Arabidopsis* response regulator) erkennt das NGATT-Motiv (Sakai et al., 2000). In *Arabidopsis* konnten vierzehn ARR-homologe identifiziert werden (Sakai et al., 1998). Diese Faktoren bestehen aus einem zweikomponenten-System. Der N-terminale Rezeptor ist an eine Domäne gekoppelt, die das Signal weiterleitet, indem sie im Zellkern als Transkriptionsfaktor wirkt.

Es wurde auch in beiden Sequenzen die GATA-Box gefunden. Dieser Motiv wurde im Zusammenhang mit Lichtregulierten Genen beschrieben und wird von Typ IV-Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren gebunden (Teakle et al., 2002).

III.6.5. Überprüfung des distalen Fragments des *Sultr2;2*-Sromaufwärtsbereichs auf „Enhancer -Aktivität

Um zu überprüfen, ob der ca. 700 bp große Bereich im distalen Bereich des Deletionskonstrukts Sa die Funktion eines „Enhancers“ besitzt, wurde dieses Fragment vor das GUS-Gen mit Minimalpromoter fusioniert (Abb. 74). Hierzu wurde der Vektor pBI121 MCS2II mit dem -60 +1-Bereich des 35S-Promoters verwendet. Das Konstrukt wurde anschließend unter Verwendung des AGL1-Agrobakterienstamms in *Arabidopsis thaliana* transformiert. Um diesen Bereich mit dem UTR des Gens zu kombinieren wurde das Konstrukt Sf hergestellt (Abb.74). Der Transkriptionsstartpunkt des Gens ist bisher nicht überprüft worden. Daher wurden 349 bp stromaufwärts des Translationsstartpunktes gewählt um das Konstrukt in Kombination mit den distalen 741 bp zu erstellen. Die Sequenz von 349 bp beinhaltet den potentiellen in der TAIR-Datenbank annotierten UTR-Bereich des Gens, sowie zwei TATA-Box-Motive, die sich 118 und 165 bp stromaufwärts des ATG befanden.

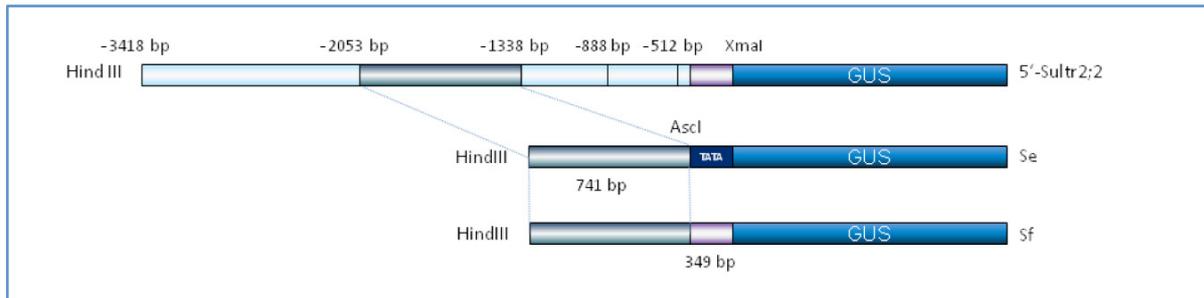


Abbildung 74: Überprüfung des distalen Fragments im *Sultr2;2*- Stromaufwärtsbereich auf „Enhancer“-Aktivität.

Die Expressionsmuster und die Aktivität der Konstrukte in transgenen Pflanzen konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr ausgewertet werden.

III.7. Suche nach *Sultr2;2*-verwandten Gen in *Flaveria bidentis*

Nachdem in *Sorghum* und *Arabidopsis* Sulfattransportergene identifiziert worden sind, die bündelscheidenspezifische Expressionsmuster zeigen, sollte auch in *Flaveria bidentis* nach Sulfattransporter-Sequenzen gesucht werden.

Kontigs (siehe Anhang), die aus den Daten einer 454-Sequenzierung erstellt worden sind (Gowik & Westhoff, unveröffentlicht), wurden verwendet um Primer zu synthetisieren. Die bekannte Sequenz konnte um etwa tausend Basenpaare in den Stromaufwärtsbereich verlängert werden (1098 bp vor dem ATG) (siehe Anhang VII.1). Eine BLAST-Untersuchung zeigt eine Ähnlichkeit mit Sulfattransportern aus anderen Pflanzen, darunter auch *Arabidopsis thaliana* (AST56).

```
>gi|79384401|ref|NM_106448.3| Arabidopsis thaliana AST56; sulfate transmembrane transporter (AST56) mRNA, complete cds
Length=2203
```

```
GENE ID: 844134 AST56 | AST56; sulfate transmembrane transporter
[Arabidopsis thaliana] (10 or fewer PubMed links)
```

```
Score = 307 bits (340), Expect = 8e-80
Identities = 559/818 (68%), Gaps = 0/818 (0%)
Strand=Plus/Plus
```

```
Query 65      TGGCACCCCTTTGAATTTGGTCTTGGATGTGCATTCCTCATATTCATCCTCATTACCAGA 124
            ||||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 908      TGGCAACCTCTGAACCTTTGTTCATCGGTAGCTCATTTCCTCATCTTCATCCTCCTAGCTAGA 967

Query 125     CAAATGGAAAAAAGAACAAGAAATATTCTGGTTGCCTGCGATTTCCCGGTTATATCG 184
            || ||||| ||||| ||||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 968      TTTATCGAAAAAAGAACAATAAGTTGTTTTGGATTCCAGCGATGGCACCCTAATATCA 1027

Query 185     GTCATTTTATCGACTCTGATAGTGTATCTAACGAGAGCGGATGAACATGGGGTTAATATC 244
            || ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1028     GTTGATATTAGCAACACTAATAGTGTATTTATCCAATGCTGAGTCACGAGGGTTAAGATT 1087

Query 245     ATTAGACATTTTAAAGGAGGACTCAATCCAAGTTCATTGAACCGTTGGAGTTTAAATGGT 304
            ||| ||| ||||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1088     GTTAAACACATTTAAACCAGGGTTTAAACCAGCTTTTCAGTTAACCAATTACAATTCAAAAGT 1147

Query 305     CCACACCTTGGCGAAGTAGCCAAAATCGGCTTCATTTGTGCTATTATTGCATTAACCGAA 364
            ||||| ||||| ||| ||| ||||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1148     CCACATCTTGGTCAAATCGCCAAAATTTGGTCTTATTCTGCAATCATCGCCCTAACGGAA 1207
```

```

Query 365      GCCGTGCTGTTGGTCGATCTTTTGCATCAATCAGAGGGTATAAECTTAGACGGGAACAAT 424
|| | ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1208    GCAATCGCAGTGGGAAGATCGTTTGCACGATCAAAGGATATCGTTTGGATGGGAACAAA 1267

Query 425      GAAATGTTAGCCATGGGCTTTATGAACATTGCTGGATCTATGTCTTCTTGCTATGCTGTC 484
|| ||| | || ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1268    GAGATGATGGCTATGGGATTTATGAATATCGCTGGTCTTTATCTTCTTGCTATGTAGCT 1327

Query 485      ACAGGATCTTTTTCGCGAACTGCTGTAAATTTAGTGCAGGCTGTCAATCTCCAGTATCC 544
|| || ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1328    ACCGGTCTTTCTCAAGAACGGCGTGAATTCAGTGTGCTGGTTGCGAGACGGTGGTTTCA 1387

Query 545      AACATAGTAATGGCGGTAACCGTGTTCATATCATTGCAAGTGTAAACGAAGCTATTGTAT 604
|||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1388    AACATGTAATGGCGATTACAGTGTGATTTCACTAGAAGTTTGGACGAGGTTTCTCTAC 1447

Query 605      TACACACCTCTTACCATATTAGCATCGATTATCTTGTCTGCGCTTCCCGGATTAATCGAT 664
| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1448    TTCACACCAACGGCGATTCTTGCCCTCATAATCCTCTCGGCGCTTCCAGGTCTCATTGAT 1507

Query 665      TACAATGAAGCTTATCATATTTGGAAGTTGATAAAAAGGACTTTTCTGCATGCGCTGGG 724
| || ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1508    GTCTCTGGTGCTTTACACATTTGGAAGTTCGATAAACTCGATTTTCTCGTCTCATTGCC 1567

Query 725      GCTTCTTTGGTGTGCTCTTTGCATCCGTGGAGATTGGTCTTTTGATTGCTGTGGGTGTT 784
|| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1568    GCCTTCTTCGGCGTCTCTTTGCCTCCGTGAGATCGGTCTTCTTCTCGCCGTGGGGATA 1627

Query 785      TCATTTGGAAGATTAATCCCTAATTCCATAAGATCGGACGTAGAAGAATTAGGAAGGCTC 844
|| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1628    TCGTTTGCAAGAATAATGTTGAGTTCGATAAGACCAAGCATGAGGCCTTAGGGAGGTTA 1687

Query 845      CCGGGAACAAACATTTTCTGTGACAAAGCACAAATATCC 882
| ||| | || ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1688    TCAAAAACAGATATCTTCGGTGACATAAATCAGTATCC 1725

```

Abbildung 75: Ergebnis einer Blast-Suche mit der Sequenz des Kontigs 127. Die Sequenz hatte eine Ähnlichkeit mit der Sequenz des Sulfattransporters Sultr2;2 aus *Arabidopsis*.

IV. Diskussion

IV.1. Identifizierung zell- und gewebespezifischer Expressionsmuster in „Enhancer Trap“-Linien in *Arabidopsis thaliana*

In dieser Arbeit ist eine Reihe verfügbarer „Enhancer Trap“-Linien untersucht worden, mit zellspezifischen GUS- oder GFP-Reporter-genexpressionsmustern im Blatt. Darunter gab es Linien mit Reporter-genexpression in den Trichomen (Abb. 6 und 7), in der Epidermis (Abb. 5, 6 und 7), in Spaltöffnungen (Abb. 6 und 7), Hydathoden (5 und 17) und Stipeln (Abb. 6). Für diese Arbeit waren aber Linien mit Reporter-genexpression im Mesophyll oder den Bündelscheidenzellen von Bedeutung, denn es sollten „Enhancer“-Linien isoliert werden, die in diesen Geweben eine zellspezifische Genexpression steuern. Wie im Ergebnissteil beschrieben, konnten elf Linien gefunden werden, die eine Reporter-genexpression in den Bündelscheidenzellen, in Palisadenzellen und in Zellen des Schwammparenchyms zeigen, von denen einige bereits beschrieben worden sind (Kim et al., 2002; Truernit & Hibberd 2007). Die Linien mit der gesuchten Reporter-genexpression in photosynthetisch aktiven Geweben des Blatts machen etwa 1-2 % aller untersuchten Linien aus. Eine leichte Varianz der Expressionsmuster wurde in den meisten „Enhancer Trap“-Linien beobachtet. In einigen Linien kann es damit zu erklären sein, dass mehrere „Enhancer Trap“-Elemente im Genom vorhanden waren. Zu erwähnen ist auch, dass zu Beginn der Arbeit Selektionsmedien verwendet worden sind, die in ihrer Zusammensetzung keine optimale Selektion der transgenen Linien erlaubten. Weil zu Beginn der Arbeiten als homozygot deklarierte „Enhancer Trap“-Linien auf Selektionsmedien ausgesät worden sind und wie erwartet alle ohne Aufspaltung transgen waren, ist dies anfangs unerkannt geblieben. In den Selektionsmedien, auf denen die Pflanzen aufgezogen worden sind, wurde Gelrite als gelierendes Agens verwendet, bei gleichzeitiger Verwendung von 50 mg/l Kanamycin als Selektionsantibiotikum. Wie sich nach späterer Recherche herausstellte, inaktiviert Gelrite Kanamycin zu einem gewissen Anteil, so dass wesentlich höhere Konzentrationen notwendig sind, um einen Selektionseffekt zu erreichen. Die Wirkung von Kanamycin ist abhängig vom verwendeten gelierenden Agens im Selektionsmedium (Laine et al., 2000; Chauvin et al., 2000). Daher wurde für weitere Versuche Agar als festigende Substanz verwendet. Eine Veränderung der beschriebenen Expressionsmuster im Vergleich zu den beobachteten, kann durch eine Reaktion der Genexpression auf veränderte Bedingungen bewirkt worden sein. Viele Gene werden in ihrer Expression durch Licht, Nährstoffzusammensetzung, Entwicklungsstadium und Stress reguliert. Dieser Effekt ist nicht zu unterschätzen.

Bei der Durchsuchung der Bibliothek von „Enhancer Trap“-Linien wurden Linien mit einer zellspezifischen GUS-Expression im Blatt identifiziert. Aus Platz- und Zeitgründen wurde eine „Schnelldurchsuchung“ durchgeführt. Dabei wurden mit Sicherheit nicht alle Expressionsmuster erfasst. Weil einzelne Blätter von etwa drei Wochen alten Pflanzen untersucht worden sind, können Expressionsmuster nicht detektiert worden sein, die in frühen oder reifen Blattstadien vorhanden waren. Die auf MS-Medien kultivierten Pflanzen verblieben in einem Miniaturstadium. Erst nach Umsetzen auf Erde entwickelten sich die Pflanzen normal. Bei der Kultur auf MS-Medien können Mangelerscheinungen aufgetreten sein, die zur Aktivierung der Expression von Genen und auch des „Enhancer Trap“-Konstrukts geführt haben, deren Expression in späterer Kultur unter optimalen Bedingungen nicht nachweisbar waren. Auch die Selektion der Pflanzen auf antibiotikahaltigem Medium war notwendig, denn ein großer Teil der Pflanzen war nicht transgen. Alle transgenen Pflanzen vor dem Test auf Erde umzusetzen, war wenig sinnvoll, denn im Schnitt zeigte nur etwa jede zehnte transgene Pflanze eine GUS-Färbung im Blatt und nur eine von 25 Pflanzen eine GUS-Färbung, die für weitere Versuche zu gebrauchen war.

IV.2. Überprüfung flankierender Sequenzen der Insertion und der Stromaufwärtsbereiche benachbarter Gene auf das Vorhandensein zellspezifischer „Enhancer“

Die Stromaufwärtssequenzen der benachbarten Gene der „Enhancer Trap“-Insertionen, welche im pMDC164-Vektor getestet worden sind, zeigten keine Spezifität. Der Versuch, die beobachtete GUS-Expression der Linie 19956/32, durch Verwendung der Stromaufwärtsbereiche der benachbarten Gene im Wildtyp zu reproduzieren, war nicht erfolgreich. Es ist möglich, dass der Stromaufwärtsbereich des *Shaggy*-Gens eine unspezifische Reportergenexpression verursacht, aber die Aktivität des *ANL2* (*ANTHOCYANINLESS 2*)-Stromaufwärtsbereiches kann auch mit dem Einfluss des 35-S-Promotors erklärt werden. Bisherige Untersuchungen zeigten, dass dieser Bereich keine oder nur leichte GUS-Expression aktivieren konnte (Kubo et al., 2008). Weil auch die flankierenden Sequenzen und Stromaufwärtsbereiche der benachbarten Gene der Insertionen in Linien UCR8 und 19969/50, im verwendeten pMDC164-Vektor ebenfalls unspezifische Expressionsmuster gezeigt haben, wurden weitere Versuche mit diesem Vektor eingestellt. Der Vektor besitzt eine Duplikation des 35 S-Promotors, unter dessen Kontrolle sich das Resistenzgen für Hygromycin als Selektionsmarker befindet (Curtis & Grossniklaus, 2003). Es ist inzwischen bekannt, dass der 35S-Promotor die Expression benachbarter DNA-Elemente beeinflussen kann und damit eine Auswirkung auf die Expressionsmuster haben

kann (Zheng et al., 2007, Yoo et al., 2005). Dies kann zu einer Fehlinterpretation von Expressionsmustern führen. Versuche haben gezeigt, dass das Reporter-gen unter der Kontrolle eines spezifischen Promotors, durch den Einfluss des 35S-Promotors ektopisch exprimiert worden ist (Yoo et al., 2005). Wurde der 35S-Promotor durch einen *mas*-Promotor (Mannopinsynthase) ersetzt, so wurde das Reporter-gen wieder im Muster des spezifischen Promotors exprimiert (Yoo et al., 2005). In dieser Arbeit war es entscheidend, dass der getestete genomische Bereich nicht durch Elemente auf der T-DNA beeinflusst wird. Daher wurde der pBI121-Vektor für die Erstellung weiterer Konstrukte gewählt. Dieser Vektor besitzt ein Kanamycin-Resistenzgen unter der Kontrolle eines NOS-Promotors (Nopalinsynthase). Dieser hatte bisher keinen nachweisbaren Einfluss auf die Expression des GUS-Gens gehabt (Zheng et al., 2007). Bei der Verwendung des pBI121-Vektors und seiner Derivate konnte keine derartige Hintergrundexpression beobachtet werden.

Es ist beschrieben worden, dass ein Fragment von 6,4 kb, welches neben einem Teil des 3'-Stromabwärtsbereichs auch den größten Teil des kodierenden Bereichs des Gens beinhaltet, die Expression im Wildtyp reproduzieren konnte (Kubo et al., 2008). *ANL2* ist ein komplexes Gen, bestehend aus neun Exons und acht Introns von denen zwei besonders groß sind. Es ist nicht auszuschließen, dass sich ein „Enhancer“ in einem Intron befindet.

In situ- Untersuchungen konnten belegen, dass die mRNA-Akkumulation des durch UV-Licht induzierten Gens nicht nur in den subepidermalen Zellen stattfindet, sondern auch in der Epidermis (Kubo et al., 2008). Daher wurde diese Linie nicht weiter untersucht.

Beide Hypothesen, die aufgestellt worden sind, konnten in diesen Versuchen nicht bestätigt werden. Die Hypothese 1 besagte, dass der Stromaufwärtsbereich des benachbarten Gens einer „Enhancer Trap“-Insertion, die Expression steuert (siehe Abb. 44). Die Expressionsmuster konnten unter Verwendung dieser Segmente in GUS-Fusionskonstrukten im Wildtyp nicht reproduziert werden. Eine Erklärung dafür ist, dass „Enhancer“ nicht immer im Stromaufwärtsbereich von Genen liegen. Es sind inzwischen mehrere Gene bekannt, deren „Enhancer“ nicht vor dem Gen liegen. Ein Beispiel ist der „Enhancer“ des *AGAMOUS*-Gens im zweiten Intron (Sieburth & Meroyowitz, 1997; Deyholos & Sieburth, 2000). Auch die „Enhancer“-Elemente des *GLABROUS1*-Gens befinden sich nicht stromaufwärts. Das Gen ist ein myb-Homologes, welches die Initiation der Trichomentwicklung steuert. Während der 5'-Stromaufwärtsbereich eine GUS-Expression in Stipeln aktiviert, konnte gezeigt werden, dass 152 bp im 3'-nichtkodierende Bereich notwendig sind, um eine GUS-Expression in Trichomen zu aktivieren (Larkin et al., 1993). Auch Expression verstärkende Introns wurden

beschrieben (Rose et al, 2008). Diese Promotor-proximalen Introns weisen überrepräsentierte Motive auf. In *Arabidopsis* wurden bisher 21 solcher Introns identifiziert (Rose et al., 2008).

Auch die Hypothese 2, die besagte, dass ein benachbartes „Enhancer“-Element die Zellspezifität steuert, konnte in diesen Versuchen nicht bestätigt werden (siehe Abb. 55). Flankierende Bereiche der Insertionsereignisse waren nicht ausreichend, um die in der „Enhancer Trap“-Linie beobachtete Expression zu reproduzieren. Möglicherweise enthielten die getesteten DNA-Fragmente keine „Enhancer“- oder nicht alle zur Aktivierung der Expression des Reportergens notwendigen Elemente.

Die Betrachtung der Expressionsdaten der benachbarten Gene, um vorhersagen zu können ob ein Gen zellspezifisch exprimiert wird, war nicht hilfreich. Ein „Enhancer“-Element, das die zellspezifische Expression eines „Enhancer Trap“-Konstrukts steuert, muss nicht Teil des Promotors eines benachbarten Gens sein. Es sind bereits kryptische „Enhancer“-Elemente identifiziert worden. Diese Elemente steuern nicht die Expression der benachbarten Gene, sondern wirken möglicherweise über weite Distanzen (Yang et al., 2005) (Abb.76).

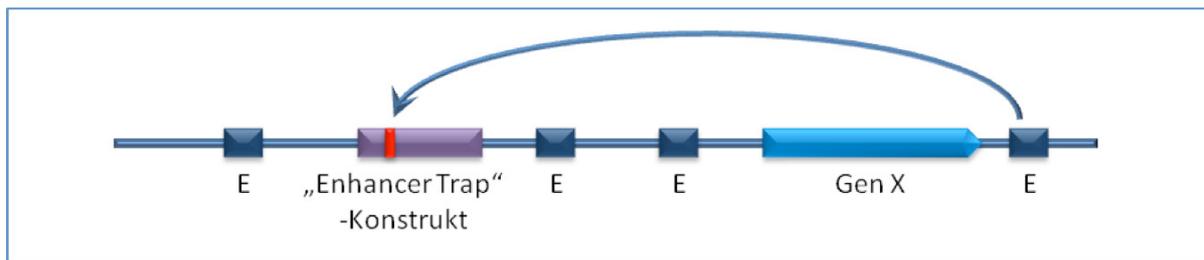


Abbildung 76: Aktivierung der Expression eines „Enhancer Trap“-Konstrukts durch ein „Enhancer“-Element als der Ferne.

Es ist genauso wahrscheinlich, dass nicht nur Elemente stromaufwärts des „Enhancer Trap“-Konstrukts, sondern auch möglicherweise Elemente stromabwärts notwendig sind, die nicht unbedingt in unmittelbarer Nachbarschaft liegen müssen, um die gesuchte Reportergenexpression wiederherzustellen. In den Konstrukten wurde nur die flankierende Sequenz zu einer Seite der „Enhancer Trap“-Insertion überprüft. Es ist möglich, dass Elemente, die sich auf der anderen Seite der „Enhancer Trap“-Konstrukts befanden und zu einer Aktivierung des Reportergens notwendig waren, in den Konstrukten fehlten (Abb. 77).

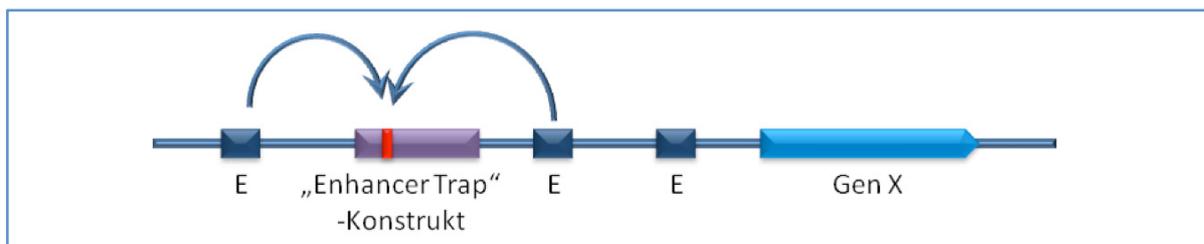


Abbildung 77: Aktivierung der Expression eines „Enhancer Trap“-Konstrukts durch Kombination mehrerer benachbarter „Enhancer“-Elemente.

Bisher sind Reportergenkonstrukte vor allem als neue Strategie benutzt worden, um Gene zu markieren. Die meisten genetischen Ansätze, um Gene zu identifizieren, basierten bisher auf der Identifizierung eines mutanten Phänotyps. Schwierig war es, wenn das mutierte Gen ein Entwicklungsgen war, deren Inaktivierung im homozygoten Zustand letale Folgen hatte. Die Methode „Enhancer Trap“-Konstrukte zu verwenden, um Gene zu markieren und gleichzeitig „Enhancer“-Elemente aufzuspüren, bietet einige Vorteile. So können mit Hilfe des „Enhancer Trapping“ Gene identifiziert werden, die mit herkömmlichen Methoden der Genetik nur schwer zu greifen sind. Durch die Insertion eines „Enhancer Trap“-Konstrukts in die Nähe des Gens bleibt der Organismus vital. Dies ist auch dann der Fall, wenn die Insertion in den transkribierten Bereich des Gens erfolgt. Dabei verhält sich das „Enhancer Trap“-Konstrukt „dominant“, das heißt, sein Expressionsmuster kann in einer heterozygoten Pflanze verfolgt werden, sobald ein „Enhancer“ in Reichweite ist, der die Reporterexpression aktivieren kann. Dies gilt auch für redundante Gene. Durch die Markierung eines Gens mit einem Reportergenkonstrukt ist es im optimalen Fall möglich, sein Expressionsmuster zu verfolgen, auch wenn das Ausschalten dieses Gens keinen Phänotyp verursacht. Die Identifizierung von „Enhancern“ mit Hilfe dieser Methode erfolgt jedoch meistens durch Zufall, denn die Methode hat auch viele Nachteile. Es wird schwierig, wenn der gesuchte zellspezifische „Enhancer“ nicht zu dem markierten Gen gehört, sondern über eine Entfernung von mehreren Kilobasenpaaren mit dem Promotor des benachbarten Gens wechselwirkt. Speziell für die „Markierung“ von Genen sind daher „Gene Trap“-Konstrukte entwickelt worden. Für die Suche nach „Enhancer“-Elementen gibt es bisher keine Alternative.

Insgesamt betrachtet ist die Identifizierung von „Enhancer“-Elementen unter Verwendung der „Enhancer Trap“-Methode wenig effizient, was nicht nur die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen (Gardner et al., 2008). Oft inserieren mehrere Konstrukte in das Genom, was die Identifizierung der Position, an der sich ein für die beobachtete Reporterexpression verantwortliches „Enhancer“-Element befindet, erschwert. Aber selbst wenn das „Enhancer Trap“-Konstrukt nur einmal im Genom vorkommt, ist das Problem noch nicht gelöst. Durch die Insertion kommt es oft zu Umstrukturierungen in der DNA, die einen Effekt auf die Expression des Reportergenkonstrukts haben können. Die Identifizierung von „Enhancern“ in den flankierenden Sequenzen der „Enhancer Trap“-Insertion ist nicht immer erfolgreich und die benachbarten Gene können ein völlig anderes Expressionsmuster haben. Das System hat auch Nachteile, unabhängig davon, ob ein „Enhancer Trap“-Konstrukt oder „Promotor Trap“-Konstrukt verwendet worden ist (Taylor, 1997; Tsugeki and Federoff, 1999; Fobert et al.,

1994). Dieser Nachteil wird besonders deutlich, wenn die Untersuchungen in einem größeren Genom stattfinden, wie zum Beispiel im Säugetiergenom (Durick et al., 1999). Soll ein zellspezifischer „Enhancer“ und das dazugehörige Gen isoliert werden, dann versagen „Enhancer Traps“. Die Insertionsstelle kann sich leicht 100 kb vom Zielgen befinden. Ebenso kann ein „Enhancer Trap“-Konstrukt aus der Ferne aktiviert werden. Die Suche nach einem „Enhancer“-Element in der Umgebung des „Enhancer Trap“-Konstrukts wird dann ergebnislos verlaufen.

Ein Beispiel dafür ist das *Kanadi1*-Gen. Es ist bekannt, dass dieses Gen abaxial im Blatt exprimiert wird. Die „Enhancer Trap“-Insertion in Linie 19960/50 befindet sich nur 2,5 kb stromaufwärts des *Kanadi1*-Gens. In diesem Paradebeispiel ist die GUS-Expression des „Enhancer Trap“-Konstrukts im gleichen Muster aktiviert worden, wie das Transkript des Gens nachgewiesen wurde (Kerstetter et al., 2001), nämlich abaxial im Blatt. Es ist dennoch nicht der Stromaufwärtsbereich des *Kanadi1*-Gens, der eine GUS-Expression im Schwammparenchym aktivieren kann. Somit konnte auch in dieser Arbeit nicht geklärt werden, welches Element dieses Expressionsmuster verursacht hat und wo es sich befindet. Das „Enhancer“-Element war nicht in der unmittelbaren Nachbarschaft des Konstrukts und auch nicht im Stromaufwärtsbereich des *Kanadi1*-Gens zu finden.

Wenn ein zellspezifischer „Enhancer“ in der flankierenden Sequenz eines „Enhancer Trap“-Konstrukts isoliert werden konnte, dann ist zwar ein „kryptischer Enhancer“ identifiziert worden, der als Werkzeug verwendet werden kann, um Gene zellspezifisch zu exprimieren, doch seine natürliche Funktion bleibt weiterhin verborgen und das Wissen unvollständig, solange kein Gen identifiziert ist, welches zu diesem Element gehört.

„Enhancer Trap“-Linien mit zellspezifischen Expressionsmustern des Reporter gens sind also in erster Linie als Material für morphologische Studien zu betrachten. Desweiteren können diese als Material dienen, um Zellen eines ausgewählten Gewebes zu isolieren. Hier können Zellen, die durch die Expression eines fluoreszierenden Reporter gens markiert worden sind, mit geeigneter Technik isoliert werden. Diese können dann in einer Transkriptomanalyse verwendet werden.

Die Suche nach zellspezifischen „Enhancern“ unter Verwendung der „Enhancer Trap“-Linien ist ein Spiel mit dem Zufall und bleibt eine Herausforderung.

IV.3. Überprüfung von Promotoren bereits beschriebener Gene

Bereits bekannte Stromaufwärtsbereiche, die beschrieben worden sind, dass sie eine zellspezifische Reporter genexpression steuern können, wurden untersucht.

Pflanzen, die mit dem Konstrukt aus Stromaufwärtsbereich des *APX2*-Gens (Ascorbat-Peroxidase 2), fusioniert mit dem GUS-Reportergen transformiert worden sind, zeigten keine Expression. Dies war möglicherweise damit zu erklären, dass der Promotor durch Stress induziert wird (Fryer et al., 2003). Eine Kombination aus Stress durch hohe Lichtintensität (ab $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), Wassermangel und einer erhöhten H_2O_2 -Konzentration in den Blättern, kann die Expression des Gens innerhalb von 15 Min. aktivieren (Fryer et al., 2003). Es ist beschrieben worden, dass Peroxidasen H_2O_2 , welches in Blättern bei Stress entsteht, zu Wasser reduzieren, indem sie es als Elektronen-Donor nutzen (Asada, 1999). Daher wurden die Pflanzen einer Lichtintensität von $630 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ für 11/2 h ausgesetzt und anschließend Blätter entnommen und gefärbt. Auch unter Starklicht konnte keine GUS-Expression in den transgenen Pflanzen beobachtet werden. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass der Wassergehalt der Blätter zu hoch war, um eine Stressreaktion auszulösen. Dies ist ebenfalls bereits beschrieben worden (Fryer et al., 2003).

Der Stromaufwärtsbereich des *SCR*-Gens (Wysocka-Diller et al., 2000) zeigte nur in einigen wenigen Pflanzen eine Bündelscheidenspezifische GUS-Expression. In der Mehrzahl untersuchter Pflanzen war keine Spezifität zu beobachten. In der Wurzel war keine derartige Schwankung in den GUS-Expressionsmustern zu beobachten. Es bleibt die Frage, wodurch das Expressionsmuster unspezifisch geworden ist und warum das gleiche Konstrukt in einzelnen Pflanzen Bündelscheidenspezifität verursachte. Es kann nicht nur durch den Einfluss benachbarter Sequenzen erklärt werden, in deren Nähe das Konstrukt inserierte.

Ein bereits bekannter Stromaufwärtsbereich, der eine Bündelscheidenspezifische Reporterexpression aktivieren konnte, gehörte zu einem Sulfattransporter (Takahashi et al., 2000). Dieser Bereich wurde umgehend zur Erstellung von Deletionskonstrukten verwendet, um die Position des „Enhancer“-Elements zu bestimmen. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass Elemente, die die Expressionsstärke steuern, in einer 741 bp Sequenz liegen, die sich im Bereich -1338 bis -2053 vor dem Translationsstartpunkt ATG befindet. Auch wenn im Vergleich mit dem Stromaufwärtsbereich des *Sultr3;3*-Gens einige Hinweise auf Bindestellen gefunden worden sind, muss eine weitere Untersuchung dieser Sequenz erfolgen. Es bleibt zu klären, wo sich die Elemente für Spezifität befinden und welche Transkriptionsfaktoren mit diesen Erkennungssequenzen interagieren.

IV.4. Sulfattransporter: Verwandtschaft, Funktion und Expression

Der Sulfattransport beginnt in der Wurzel. Dort wird Sulfat in Form von SO_4^{2-} aufgenommen. Der Transport geht über das Xylem zu den Blättern, wo es in zahlreiche Verbindungen

eingebaut wird (Saito, 2004). Ebenso sind Pflanzen in der Lage, Schwefel in Form von H_2S aus der Atmosphäre aufzunehmen (Kopriva, 2006). Schwefel ist ein Bestandteil der Aminosäuren Cystein und Methionin, vieler Vitamine und Kofaktoren, sowie vieler sekundärer Pflanzenstoffe. Die Schwefelaufnahme durch Pflanzen und Mikroorganismen ist eine wichtige Komponente des Schwefelkreislaufs in der Natur. Tieren fehlt die Fähigkeit anorganischen Schwefel zu verwerten. Sie sind auf Methionin als essentielle Aminosäure und Schwefelquelle angewiesen (Saito, 2004). Die Sulfatassimilation erfolgt nach Aktivierung des Schwefels. Es wird in Form von Adenosin 5'-Phosphosulfat (APS) gebunden und stufenweise über SO_3^{2-} zu S^{2-} reduziert, bis es schließlich in Cystein eingebaut wird. Während die Sulfatreduktion in Plastiden stattfindet, wird Cystein in Plastiden, Mitochondrien und Cytosol synthetisiert (Leustek et al., 2000). Es ist berichtet worden, dass die Sulfatassimilation und Glutathionsynthese in C_4 -Pflanzen kompartimentiert abläuft. In Mais wird SO_4^{2-} in den Chloroplasten der Bündelscheidenzellen reduziert. Dort findet auch die Cysteinsynthese statt (Kopriva et al., 2005). Cystein wird schließlich in alle Kompartimente transportiert, wo es zu Glutathion umgewandelt wird.

Zu den ersten Sulfattransportern, die aus Pflanzen isoliert werden konnten, zählen *SHST1*, *SHST2* und *SHST3* (*Stylosanthes hamata sulfate transporter*) aus der Leguminose *Stylosanthes hamata* (Smith et al., 1995). Isoliert wurden die cDNAs durch die Komplementation eines mutanten Hefestamms YSD1 (*yeast sulfate transport deletion mutant 1*), der kein Sulfat aufnehmen konnte (Smith et al., 1995). Mit Hilfe des mutanten Hefestammes wurden die aus *S. hamata* isolierten Sulfattransporter auf ihre Fähigkeit Sulfat zu transportieren untersucht. Dazu wurden die komplementierten Hefezellen in einem Medium inkubiert, welches ^{35}S -markiertes SO_4^{2-} enthielt, danach vom Medium gereinigt und die Aufnahmezeit bestimmt. Es handelte sich bei diesen Sulfattransportern um Transporter mit hoher Affinität zum Substrat. Die Proteinsequenzen zeigten eine signifikante Ähnlichkeit zu konservierten Aminosäuresequenzen aus Pilzen, Pflanzen und Säugetieren (Smith et al., 1995).

Seit dieser Zeit konnten Sulfattransporter in vielen anderen Pflanzenfamilien identifiziert und charakterisiert werden. So wurde aus *Brassica juncea* ein Sulfattransporter isoliert der zu 87% mit *Sultr2,2* aus *Arabidopsis thaliana* identisch ist (Heiss et al., 1998). Für den Vergleich des Sulfattransporters (LAST: *low-affinity sulfate transporter*) wurde der C-Terminale Bereich verwendet, ab der siebten α -Helix beginnt (Heiss et al., 1998).

Über Sulfattransporter in Weizen (Buchner et al., 2010), Reis (Godwin et al., 2003; Buchner et al., 2004) und Gerste ist ebenfalls berichtet worden. Aus Gerste konnte der hochaffine Sulfattransporter *HvST1* isoliert werden (Smith et al., 1997; Rae & Smith, 2002).

Auch zu Sulfattransportern in der Pappel (*Populus tremula x Populus alba*) sind Arbeiten durchgeführt worden. Hier konnten achtzehn Sulfattransporterverwandte Gene isoliert werden, die in den homologen Bereichen zu 80-90 % mit denen aus *Arabidopsis* übereinstimmen (Dürr et al., 2010).

Nachdem die Bündelscheidenspezifische Expression des *Sultr2;2*-Stromaufwärtsbereichs (Takahashi et al., 2000) bestätigt werden konnte (vgl. Abb. 25), wurde nach verfügbaren Daten in Hirse (*Sorghum bicolor*) und Reis (*Oryza sativa*) gesucht, ob es auch hier Bündelscheidenspezifische Sulfattransporter gibt. In einer Sorghum-Datenbank, die eine Sammlung differentiell exprimierte mRNAs enthielt (Westhoff, unveröffentlicht), wurde ein Sulfattransporter, der Bündelscheidenspezifisch exprimiert ist gefunden (counts BS: 27170, M: 36). Um zu überprüfen, in welche der aus *Arabidopsis* bekannten Gruppe dieser Sulfattransporter einzuordnen ist, wurde ein phylogenetischer Stammbaum erstellt. Dafür wurde mit BLAST nach Proteinsequenzen von Sulfattransporter gesucht, in *Oryza sativa*, *Sorghum bicolor*, *Populus trichocarpa*, *Medicago truncatula*, *Glycin max*, *Vitis vinifera*, *Brachypodium distachyon* und *Zea mays*. Ein Verzeichnis der gefundenen Proteinsequenzen befindet sich im Anhang (Tabelle 14). Zudem wurden die bereits charakterisierten Sulfattransporter aus *Hordeum vulgare*, *Triticum tauschii*, *Lycopersicon esculentum* und *Stylosanthes hamata* aufgenommen.

In *Arabidopsis* gibt es 14 Sulfattransporter, die in fünf verschiedene Gruppen eingeteilt werden können. Die Einteilung erfolgte nach Sequenzähnlichkeit und Funktion (Hawkesford, 2003). Diese Proteinsequenzen wurden verwendet, um in ausgewählten Pflanzenspezies ähnliche Sulfattransportersequenzen zu finden. Diese Proteinsequenzen wurden genutzt, um den in Abbildung 32 dargestellten Phylogenetischen Stammbaum zu errechnen. So beinhaltet die **Gruppe 1** Sulfattransporter, mit einer hohen Affinität für Sulfat (K_m s: 1,5-10 μ M). In *Arabidopsis* ist *Sultr1.1* in der Wurzel exprimiert, und in den Hydathoden der Blätter. *Sultr1;2* ist wie *Sultr1;1* in der Wurzel zu finden, dort in Wurzelhaaren, Epidermis und Kortex. Im Blatt dagegen ist die Expression in den Schließzellen zu finden. Unter Sulfatmangel akkumulieren in *Arabidopsis* die Genprodukte dieser Gene (Maruyama-Nakashita et al., 2004). Es sind Sulfattransporter mit hoher Affinität zum Sulfat, die unter Sulfatmangel hochreguliert werden. Im Stammbaum wurden die aus *Stylosanthes hamata* bekannten

Sulfattransporter dieser Gruppe zugeordnet, Sowie der Sulfattransporter aus *Hordeum* (HVST1) und *Lycopersicon* (LE2) (Abb.78).

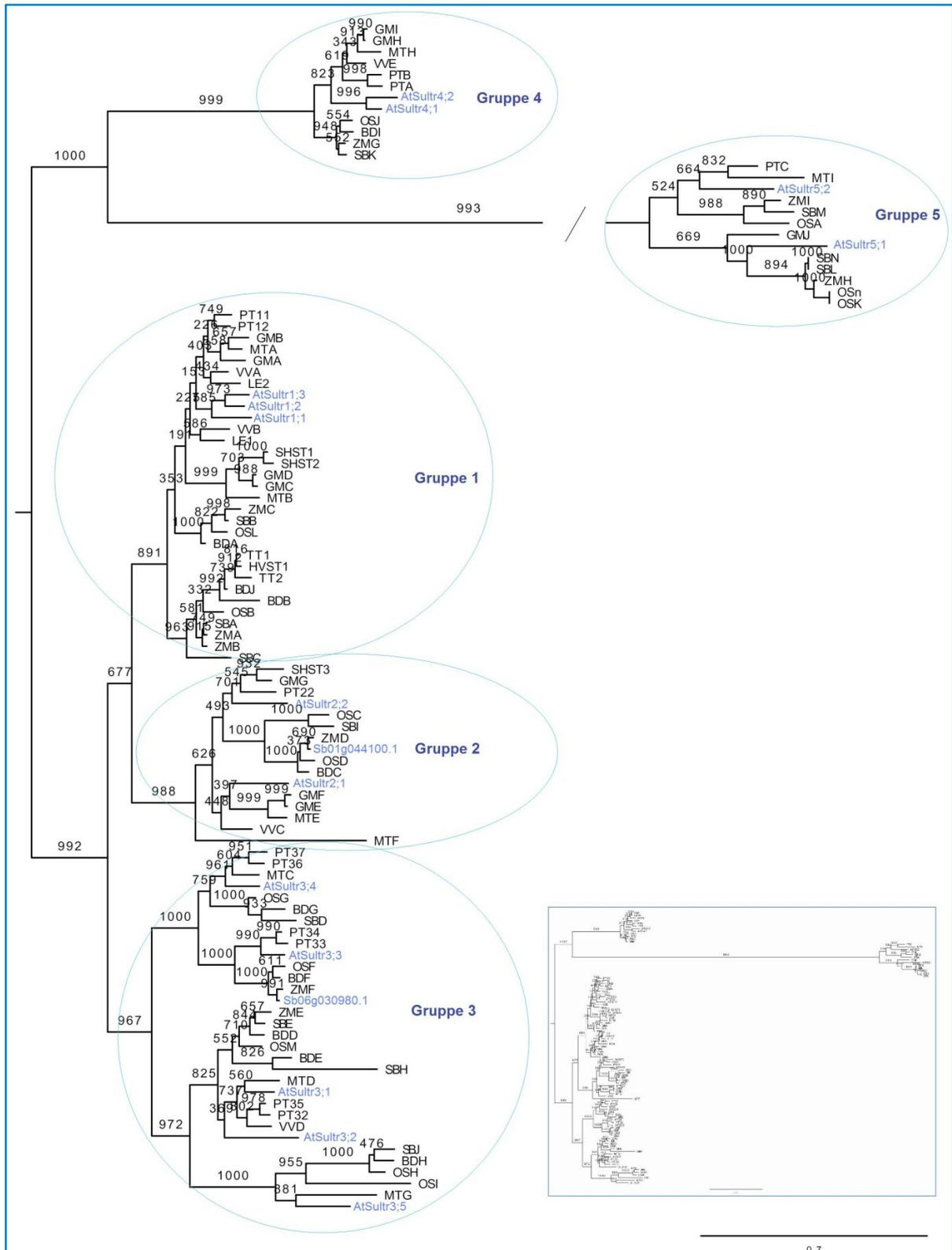


Abbildung 78: Verwandtschaft der Sulfattransporter ausgewählter Spezies. Die verkleinerte Darstellung des Stammbaums befindet sich rechts unten in der Abbildung. Blau gekennzeichnet wurden Sulfattransporterproteine aus *Arabidopsis*, sowie die im Text beschriebenen Sulfattransporter aus *Sorghum*.

Die Sulfattransporter der **Gruppe 2** weisen eine niedrige Affinität zum Sulfat auf (*Arabidopsis*: *Sultr2;1*: 0,41 mM, *Sultr2;2*: 1,2 mM) (Hawkesford, 2003).

Der Sulfattransporter aus *Arabidopsis*, *Sultr2;2* (At1g77990), befindet sich wie beschrieben (Takahashi et al., 2000) in der Gruppe 2 (Abb. 78). In Blättern von *Arabidopsis* ist dieser Sulfattransporter bündelscheidenspezifisch exprimiert (Abb. 67), während die Expression in Wurzeln im Phloem lokalisiert ist (Takahashi et al., 2000). Das Vorhandensein der *Sultr2;2*-Expresion im Phloem der Wurzel weist auf ein Transport des Sulfats über das Phloem hin. Das Vorhandensein des Transporters in den Bündelscheidenzellen deutet darauf hin, dass er hier eine Funktion hat im Transport des Sulfats vom Xylem aus ins Palisadenparenchym und Mesophyll (Buchner et al., 2004). Der Sulfattransporter *Sultr2;1* wird durch Sulfatmangel induziert. An dieser Induktion ist eine Mikro-RNA beteiligt (Kawashima et al., 2009), die wiederum durch den Transkriptionsfaktor SLIM1 (SULPHUR LIMITATION1) reguliert wird (Maruyama-Nakashita et al., 2006).

Die Expressionsmuster von Sulfattransportern der **Gruppe 3** wurden bisher nicht genau beschrieben, jedoch ist bekannt, dass sie blattspezifisch sind (Hawkesford, 2003). Innerhalb dieser Gruppe gibt es mehrere Gene, die Untergruppen bilden. Das aus der Sorghumdatenbank stammende, in *Sorghum* bündelscheidenspezifisch exprimierte Gen Sb06g030980, wurde im Stammbaum der dritten Gruppe der Sulfattransporter zugeteilt. Über diese Gruppe wurde bisher berichtet, dass sie in *Arabidopsis* blattspezifisch exprimiert ist.

Der in dieser Arbeit untersuchte 5'-Bereichs des *Sultr3;3* aus *Arabidopsis* bewirkte in jungen Blättern eine Bündelscheidenspezifität (Abb. 49). Die Bündelscheiden waren dabei nicht durchgehend gefärbt. Es waren einzelne Zellen oder Gruppen von Bündelscheidenzellen gefärbt. Ausgewachsene Rosettenblätter zeigten eine GUS-Expression im Leitbündel.

Die **Gruppe 4** besteht in *Arabidopsis* aus zwei Sulfattransportern. In dieser Gruppe kommen Sulfattransporter vor, die eine Transit-Sequenz für Chloroplasten besitzen (Takahashi et al., 1999a). Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass einige Proteine dieser Gruppe im Tonoplasten lokalisiert sind (Kataoka, et al., 2004).

Die **Gruppe 5** besteht aus Sequenzen, die sich deutlich von den anderen Sulfattransportersequenzen unterscheiden (Abb. 78). Die Sequenzen dieser Gene sind mit ca. 450 Aminosäuren kürzer als die Proteinsequenzen der anderen Gruppen, die aus 631-685 Aminosäuren bestehen. Die Verkürzungen fanden am N- und am C-terminalem Ende statt. Auch wenn es konservierte Bereiche gibt unterscheiden sich die Sequenzen von denen anderer Gruppen, was im phylogenetischen Stammbaum besonders deutlich wird (Abb. 78). Es gibt bisher weder Informationen über die Expression dieser Gene, noch über ihre genaue

Funktion. Es wurde bereits spekuliert, dass diese Proteine eine Rolle im Molybdat-Transport spielen könnten (Buchner et al., 2010). Zudem fehlt den Proteinen dieser Gruppe die für Sulfattransporter charakteristische STAS-Domäne (Hawkesford 2003). Schließlich konnte gezeigt werden, dass der Sulfattransporter *Sultr5;2* aus *Arabidopsis* Molybdat transportiert und Hefemutanten nicht komplementieren konnte. Deswegen wurde der Transporter zu MOT1 (Molybdäntransporter 1) umbenannt (Tomasu et al., 2007). Vor kurzem konnte aber auch gezeigt werden, dass der hochaffine Sulfattransporter *SHST1* aus *Stylosanthes hamata*, der zur ersten Gruppe der Sulfattransporter gehört, ebenfalls Molybdat transportieren kann, wie Expressionsversuche in Hefemutanten gezeigt haben (Fitzpatrick et al., 2008)

Die Erstellung des Stammbaums hat es erlaubt, das *Sorghum bicolor* stammende Gen Sb06g03098 phylogenetisch einzuordnen und die Verwandtschaft mit den bisher untersuchten Sulfattransportern aus *Arabidopsis* darzustellen.

Ein Vergleich der Stromaufwärtssequenzen der Sulfattransporter aus der Gruppe 2 und 3 wurde unternommen, um abschätzen zu können, wann die Sulfattransporter aus *Arabidopsis* *Sultr2;2* und *Sultr3;3* sich in der Evolution von den Sulfattransportern der Gramineen abgespalten haben könnten. Aufgrund der sehr geringen Ähnlichkeit dieser Sequenzen konnten keine zuverlässigen Stammbäume erstellt werden. In der Abbildung 78 erscheinen Sulfattransportersequenzen aus Gräsern in der Gruppe 2 gruppiert auf einem eigenen Unterast. Dies deutet darauf hin, dass diese Gruppe in den Dikotyledonen und Gramineen erst nach der Trennung dieser Taxa entstanden sein muss. In der Gruppe 3 gibt es viele Äste, in denen Sequenzen aus Gramineen und Dikotyledonen gemischt auftreten. Dies lässt darauf schließen, dass diese Gengruppe schon in dem gemeinsamen Vorfahren dieser Pflanzen existiert haben muss.

IV.5. Differentiell exprimierte Gene in *Oryza sativa* und *Sorghum bicolor*

Die Suche nach Genen, die in Mesophyll und in den Bündelscheidenzellen von Reis differentiell exprimiert werden, in verfügbaren Daten einer Transkriptomanalyse (Jiao et al., 2009, <http://bioinformatics.med.yale.edu/riceatlas/>), deckte keine Gene auf, die nennenswert differentiell exprimiert waren. Als in Bündelscheidenzellen spezifisch exprimiert wurden die Gene definiert, deren mRNA in den Bündelscheidenzellen und nicht in Mesophyll (oder um ein vielfaches höher) und in nicht Leitbündeln detektiert worden ist. Als mesophyllspezifisch wurden die Gene definiert, deren Wert für Bündelscheidenzellen bei 0 rpm lag (*reads per milion*). Insgesamt waren die in Reis differentiell exprimierten Gene nur gering exprimiert. Anders dagegen verlief eine Durchsuchung der aus *Sorghum bicolor* bekannten Daten (Gowik

& Westhoff, unveröffentlicht). Die verfügbare Sammlung von Daten wurde hier nach Genen durchmustert, die mindestens zehnfach höher im Mesophyll exprimiert waren, als in Bündelscheiden oder umgekehrt. Dabei wurden alle mRNAs verworfen, deren rpm-Wert unter 20 lag, um Hintergrund auszuschließen. Es waren nach Wahl dieser Kriterien immer noch 177 Gene überwiegend im Mesophyll und 687 Gene überwiegend in Bündelscheidenzellen exprimiert. Dass die Anzahl der differentiell exprimierten Gene höher ist als in C₃-Pflanzen, entspricht etwa der Erwartung, denn der Stoffwechsel der C₄-Pflanzen, zu denen auch *Sorghum bicolor* gehört, ist auf eine Arbeitsteilung von Bündelscheidenzellen und Mesophyllzellen angewiesen. Daher müssen Enzyme der Photosynthese, Transportproteine, Transkriptionsfaktoren sowie andere notwendige Gene differentiell exprimiert werden. Ein Sulfattransporter, der spezifisch in Bündelscheidenzellen von Reis exprimiert wird, konnte in der Liste der Reis-Gene nicht gefunden werden. In der Reihe der mesophyllspezifisch exprimierten Gene war der Sulfattransporter 3;1 (Os10g28440) zu finden (M: 26,664; BS:0). Die nächsten orthologen Gene aus *Arabidopsis* sind At3g51895 (*Sultr3;1*) sowie At4g02700 (*Sultr3;2*). Im eFP-Browser betrachtet waren die Transkripte dieser Gene überwiegend im Leitbündel, sowie in den Bündelscheidenzellen vorhanden, wobei auch in Schließzellen und Trichomen ein höheres mRNA-Vorkommen verzeichnet worden ist, als im Mesophyll.

Eine Frage war, ob es auch einen Sulfattransporter geben könnte, der im Mesophyll exprimiert ist. Um diese Frage zu beantworten muss betrachtet werden, in welcher Form Sulfat in Blättern transportiert wird. Vielleicht ist es nicht immer notwendig einen Sulfattransporter mesophyllspezifisch zu exprimieren. Wie bereits erwähnt läuft die Sulfatreduktion in C₄-Gräsern kompartimentiert ab. Dies geschieht in den Chloroplasten der Bündelscheidenzellen (Kopriva et al., 2005). Dies belegen auch die bereits erwähnten Daten der Transkriptomanalyse (Gowik & Westhoff, unveröffentlicht). Hier gab es drei Sulfattransportergene, die bündelscheidenspezifisch exprimiert waren, aber nach einem mesophyllspezifisch exprimierten Sulfattransporter suchte man dort vergebens. Nach bisherigen Erkenntnissen wird Sulfat in den Bündelscheidenzellen der C₄-Gräser reduziert. Danach wird Sulfat als Bestandteil von Cystein transportiert, bevor es zu Glutathion umgewandelt wird. In Pflanzen dieser Art scheint es keinen Bedarf zu geben, einen mesophyllspezifischen Sulfattransporter zu exprimieren. Weil jedes der Gene aus *Sorghum bicolor* in den Daten bereits mit dem *Arabidopsis*-Genom verglichen worden ist, konnte in der Liste der *Arabidopsis*-Gene nach Sulfattransportern gesucht werden. Es waren folgende drei Sulfattransportergene gefunden worden: Das Gen Sb01g044100, welches dem *Sultr2;1*-Gen

aus *Arabidopsis* am ähnlichsten war (B: 33,494 rpm; M: 1,195 rpm), Sb01g046410 mit Ähnlichkeit zu dem Sulfattransporter *Sultr3;1* aus *Arabidopsis* (B: 58,700; M: 0) sowie das Gen Sb06g030980 (B: 630,819 rpm; M: 1,195 rpm), ein dem Sulfattransporter *Sultr3;3* aus *Arabidopsis* ähnliches Gen. Die Kompartimentierung der Sulfatreduktion trifft aber nur auf C₄-Gräser zu. In *Flaveria*, einer Dikotyledonen Pflanze ist die Sulfatreduktion nicht an Bündelscheidenzellen gebunden (Kopriva, 2006). In Reis ist das Produkt des Sulfattransporters 3;1 überwiegend im Mesophyll nachgewiesen worden. Es ist nicht bekannt in welcher Weise die Evolution Einfluss auf die Funktion und Expressionsmuster dieser Sulfattransporter hatte. Zumindest sind die Bündelscheiden durch ihre Lage in direkter Nachbarschaft zu den Leitbündeln die ersten Zellen, die Sulfat, welches aus den Leibündeln in das Blatt transportiert wird, aufnehmen. So sind die Bündelscheiden vermutlich einer höheren Sulfatkonzentration ausgesetzt als die Mesophyllzellen, was zu einer Entwicklung von mehreren Sulfattransportern, die eine Aktivität in Bündelscheidenzellen und Leitbündeln haben, geführt hat.

Ein Grund, die Daten der Transkriptomanalyse mit Vorsicht zu betrachten, ist die Unschärfe bei der Zelltrennung. Hier sind zwar Mesophyll und Bündelscheidenzellen getrennt voneinander untersucht worden, aber die Methode hatte einen Nachteil. Die Bündelscheidenfraktion enthielt immer noch die Leitbündelstränge. Es ist aus den Daten nicht abzulesen, ob ein Gen in den Bündelscheiden oder im Leitbündel selbst exprimiert ist. Sicherlich wird die Mesophyllfraktion auch mit Epidermiszellen, Trichomzellen und Spaltöffnungen kontaminiert gewesen sein. Doch diese machen einen geringeren Anteil aus, als dies im Fall der Bündelscheidenfraktion ist. Für die Frage nach differentiell exprimierten Genen in Mesophyll und Bündelscheide, war dieses Material optimal. Es kann anhand dieser Daten aber nicht unterschieden werden, welche der Gene in den Bündelscheidenzellen und welche davon nur im Leitbündel exprimiert waren. Nach diesen Daten wären 20 % der Gene überwiegend im Mesophyll exprimiert worden und 80% überwiegend in Bündelscheidenzellen. Dann wäre die Bündelscheide ein Ort intensiver Genexpression. Deswegen kann in den Fällen der drei Sulfattransporter nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob diese in Bündelscheidenzellen aktiv sind, oder den Transport aus dem Leitgewebe in die Bündelscheiden bewirken und daher im Leitbündel lokalisiert sind. Eine Untersuchung der Stromaufwärtsbereiche dieser Gene müsste durchgeführt werden, um diese Fragen zu klären.

V. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es „Enhancer“-Elemente zu identifizieren, die eine Zell oder gewebespezifische Reporterexpression in den photosynthetisch aktiven Blattzellen der C₃-Pflanze *Arabidopsis thaliana* aktivieren können. Dazu wurde eine Sammlung von „Enhancer Trap“-Linien nach Reporterexpression in Palisadenparenchym, Schwammparenchym sowie in den Bündelscheidenzellen durchsucht. Eine Reihe bereits vorcharakterisierter Linien wurde ebenfalls untersucht, um die beschriebenen Expressionsmuster zu überprüfen. Ausgewählte Linien wurden verwendet, um die Insertionspositionen der „Enhancer Trap“-Konstrukte mit Hilfe der inversen PCR zu bestimmen. Die benachbarten Sequenzen sind auf das Vorhandensein von zellspezifischen „Enhancer“-Elementen überprüft worden. Für diese Experimente ist der pBI121-Vektor angepasst wurden. Um die Klonierung zu erleichtern, wurde eine multiple Klonierungsstelle eingebaut, sowie teilweise ein Minimalpromotor, für die Überprüfung von DNA-Fragmenten ohne nativen Kernpromotor.

Die Suche nach „Enhancer“-Elementen in den untersuchten Linien war bisher wenig erfolgreich. Mehr Erfolg dagegen brachte die Untersuchung bereits bekannter Promotoren. So konnte die Bündelscheidenspezifische Aktivität des *Sultr2;2*-Stromaufwärtsbereichs bestätigt werden. Pflanzen, die mit diesem Konstrukt transformiert worden sind, exprimierten das GUS-Reportergen nur in den Bündelscheidenzellen und nicht im Leitbündel. Um den „Enhancer“ zu finden, wurde dieser Stromaufwärtsbereich in vier Deletionskonstrukte eingeteilt. Die Aktivität wird durch etwa 700 bp im Bereich von -2053 bis -1312 bp stromaufwärts von ATG reguliert. Wird dieser Bereich deletiert, findet keine Reporterexpression mehr statt. Dies lässt darauf schließen, dass dieser Bereich alle notwendigen Elemente für die Quantität der Expression besitzt. Ob jedoch auch Elemente für Spezifität in dieser Region liegen, muss durch weitere Versuche geklärt werden. Ebenso wissenswert ist es, ob diese distale Region in der Lage ist alleine, nur unter Verwendung eines Minimalpromotors, die Expression eines Reportergens spezifisch in den Bündelscheidenzellen zu steuern vermag und ob dieses Fragment auch in *Flaveria bidentis* die gleiche Expression zeigt.

Summary

The aim of this work was to identify enhancer elements that activate cell or tissue-specific reporter gene expression in photosynthetic active leaf cells of the C₃-plant *Arabidopsis thaliana*. A collection of enhancer trap lines was screened for a reporter gene expression in palisade parenchyma, spongy parenchyma or in the bundle sheath cells. Already pre-characterized lines were also checked for the described expression pattern. Selected lines were used to find the insertion positions of the enhancer trap constructs by inverse PCR. Flanking sequences were investigated for the presence of cell-specific enhancer elements. For these experiments the pBI121 vector was modified. To make cloning more easy a multiple cloning site was added and partially, a minimal promoter was inserted for testing of DNA fragments without a native TATA box.

The search for enhancer elements in these investigated lines was not very successful. More efficient was the investigation of already known promoter sequences. In this case the bundle sheath specific expression patterns of the *Sultr2;2*-upstream sequence was confirmed. Plants that were transformed with this construct expressed the GUS-gene only in bundle sheath cells but not in the vascular bundle. To find the enhancer element responsible for this expression pattern, the upstream region of the *Sultr2;2*-gene was divided in four deletion constructs. The activity is regulated by at least 700 bp in the region -2053 to -1312 upstream of the ATG. If this region was deleted, no reporter gene expression was observed. This leads to the conclusion that all necessary elements for quantity are located in this region. It must be investigated in further experiments if the elements for specificity are also located in this fragment. Also worth knowing is if the fragment alone is sufficient to drive bundle sheath specific expression when it is used together with the minimal promoter and a reporter gene and if this fragment also shows the same expression pattern in *Flaveria bidentis*.

VI. Literatur

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

Anish R, Hossain MB, Jacobson RH, Takada S (2009): Characterization of Transcription from TATA-Less Promoters: Identification of a New Core Promoter Element XCPE2 and Analysis of Factor Requirements. *Public Library of Science ONE*, **4(4)**: e5103. doi:10.1371/journal.pone.0005103

Asada K (1999): The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **50**: 601–639

Bellen HJ (1999): Ten years of enhancer detection: Lessons from the fly. *The Plant Cell*, **11**: 2271-2281

Bellen HJ, O’Kane CJ, Wilson C, Grossniklaus U, Pearson RK; Gehring WJ (1989): P-Element-mediated enhancer detection: A versatile method to study development in *Drosophila*. *Genes & Development*, **3**: 1288-1300

Bertani G (1951): Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **62**: 293–300.

Bertani G (2004): Lysogeny at Mid-Twentieth Century: P1, P2 and Other Experimental Systems. *Journal of Bacteriology*, **186** (3): 595–600.

Bonke M, Thitamadee S, Mähönen AP, Hauser MT, Helariutta Y (2003): APL regulates vascular tissue identity in *Arabidopsis*. *Nature*, **426** (13): 181-186

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

Braybrook SA & Kuhlemeier C (2010): How a Plant Builds Leaves. *The Plant Cell, Preview*, **22**:1006-1018

Brown DM, Zeef LAH, Ellis J, Goodacre R, Turnera SR (2005): Identification of Novel Genes in *Arabidopsis* Involved in Secondary Cell Wall Formation Using Expression Profiling and Reverse Genetics. *The Plant Cell*, **17**: 2281–2295

Buchner P, Parmar S, Kriegel A, Carpentier M, Hawkesford M (2010): The Sulfate Transporter Family in Wheat: Tissue-Specific Gene Expression in Relation to Nutrition. *Molecular Plant*, **3**: 376-389

Buchner P, Takahashi H, Hawkesford J (2004): Plant sulphate transporters: co-ordination of uptake, intracellular and long-distance transport. *Journal of Experimental Botany*, **55**: 1765-1773

Byrne ME (2005): Networks in leaf development. *Current Opinions in Plant Biology*, **8**: 59-66

Byrne M, Timmermanns M, Kidner C, Martienssen R (2001): Development of leaf shape. *Current Opinion in Plant Biology*, **4**: 38-43

- Campisi L, Yang Y, Yi Y, Heilig E, Herman B, Cassista AJ, Allen DW, Xiang H, Jack T (1999):** Generation of enhancer trap lines in *Arabidopsis* and characterization of expression patterns in the inflorescence. *The Plant Journal*, **17** (6): 699-707
- Chen, J & Dellaporta S (1994):** Urea-based Plant DNA Miniprep. *The Maize Handbook*. Springer-Verlag, N. Y., Inc. 526-527
- Chitwood DH, Guo M, Nogueira FTS, Timmermans MCP (2007):** Establishing leaf polarity: the role of small RNAs and positional signals in the shoot apex. *Development*, **134**: 813-823
- Clough SJ & Bent AF (1998):** Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, **16**: 735-43.
- Cohen SN, Chang ACY, Hsu L (1972):** Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **69**: 2110-2114.
- Curtis DM & Grossniklaus U (2003):** A Gateway Cloning Vector Set for High-Throughput Functional Analysis of Genes in Planta. *Plant Physiology*, **133**: 462-469
- De la Riva GA, Gonzáles-Cabrera J, Vázquez-Padrón R, Ayra-Pardo C (1998):** *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation, *Electronic Journal of Biotechnology*, **1** (3), ISSN: 0717-3458; 1-16
- Dengler N & Kang J (2001):** Vascular patterning and leaf shape. *Current Opinion in Plant Biology*, **4**: 50-56
- Deyholos MK & Sieburth LE (2000):** Separable Whorl-Specific Expression and Negative Regulation by Enhancer Elements within the *AGAMOUS* Second Intron. *The Plant Cell*, **12**: 1799-1810
- Dinneny JR & Yanofsky MF (2004):** Vascular Patterning: Xylem or Phloem? *Current Biology*, **14**: 112-114
- Dürr J, Bücking H, Mult S, Wildhagen H, Palme K, Rennenberg H, Ditengou F Herschbach C (2010):** Seasonal and cell type specific expression of sulfate transporters in the phloem of *Populus* reveals tree specific characteristics for SO₄²⁻ storage and mobilization. *Plant Molecular Biology*, **72**: 499-517
- Durick K, Mendlein J, Xanthopoulos KG (1999):** Hunting with Traps: Genome-Wide Strategies for Gene Discovery and Functional Analysis. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, doi:10.1101/gr.9.11.1019, 1019-1025
- Edgar RC (2004):** MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*, **32**: 1792–1797
- Edwards K, Johnstone C, Thompson C (1991):** A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*, **19** (6): 1349
- Efroni I, Eshed Y, Lifschitz E (2010):** Morphogenesis of Simple and Compound Leaves A Critical Review. *The Plant Cell*, Preview, **22**:1019-1032

- Elmayan T & Tepfer M (1995):** Evaluation in tobacco of the organ specificity and strength of the rolD promoter, domain A of the 35S promoter and the 35S2 promoter. *Transgenic Research*, **4** (6): 388-96.
- Emery JF, Floyd SK, Alvarez J, Eshed Y, Hawker NP, Izhaki A, Baum SF, Bowman JL (2003):** Radial Patterning of Arabidopsis Shoots by ClassIII HD-ZIP and KANADI Genes. *Current Biology*, **13**: 1768-1774
- Engelmann S, Wiludda C, Burscheidt J, Gowik U, Schlue U, Koczor M, Streubel M, Cossu R, Bauwe H, Westhoff P (2008):** The Gene for the P-Subunit of Glycine Decarboxylase from the C4 Species *Flaveria trinervia*: Analysis of Transcriptional Control in Transgenic *Flaveria bidentis* (C4) and *Arabidopsis* (C3). *Plant Physiology*, **146**: 1773-1785
- Esau K (1953):** Plant anatomy, Sec. Ed., John Wiley & Sons.Inc., New York
- Federoff NV, Smith DL (1993):** A versatile system for detecting transposition in Arabidopsis. *The Plant Journal*, **3**: 273-289
- Fitzpatrick KL, Tyerman SD, Kaiser BN (2008):** Molybdate transport through the plant sulfate transporter SHST1. *FEBS Letters*, **582**: 1508-1513
- Fryer MJ, Ball L, Oxborough K, Karpinski S, Mullineaux PM, Baker NR (2003):** Control of Ascorbate Peroxidase 2 expression by hydrogen peroxide and leaf water status during excess light stress reveals a functional organization of Arabidopsis leaves. *The Plant Journal*, **33**: 691-705
- Fu Y, Xu L, Xu B, Yang L, Ling Q, Wang H, Huang H (2007):** Genetic Interactions Between Leaf Polarity-Controlling Genes and *ASYMMETRIC LEAVES1* and 2 in *Arabidopsis* Leaf Patterning. *Plant Cell Physiology*, **48** (5): 724-735
- Fulton TM, Chunwongse J, Tanksley SD (1995):** Microprep Protocol for Extraction of DNA from Tomato and other Herbaceous Plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, **13** (3): 207-209
- Gardner MJ, Andrew JB, Assie JM, Poethig RS, Haseloff JP, Webb AAR (2008):** *GAL4 GFP* enhancer trap lines for analysis of stomatal guard cell development and gene expression. *Journal of Experimental Botany*, doi:10.1093/jxb/ern292, 1-14
- Geisler M, Jablonska B, Springer PS (2002):** Enhancer Trap Expression Patterns Provide a Novel Teaching Resource. *Plant Physiology*, **130**: 1747-1753
- Godwin RM, Rae AL, Carrol BJ, Smith FW (2003):** Cloning and characterization of two genes encoding sulfate transporters from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant and Soil*, **257**: 113-123
- Green KA, Prigge MJ, Katzman RB, and Clark SE (2005):** CORONA, a member of the class III homeodomain leucine zipper gene family in Arabidopsis, regulates stem cell specification and organogenesis. *The Plant Cell*, **17**: 691-704
- Guindon S & Gascuel O (2003):** A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, **52**: 696-704
- Harrison SJ, Mott EK, Parsley K, Aspinall S, Gray JC, Cottage A (2006):** A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation. *Plant Methods*, **2**: 19-25

- Haseloff J (1999):** GFP variants for Multispectral Imaging of Living Cells. *Methods in Cell Biology*, **58**: 139-150
- Haseloff J & Amos B (1995):** GFP in Plants. *Trends in Genetic*, **11** (8): 328-329
- Haseloff J, Siemering KR, Prasher DC, Hodge S (1997):** Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **94**: 2122-2127
- Hatch MD & Slack CR (1966):** Photosynthesis by sugarcane leaves. A new carboxylation reaction and the pathway of sugar formation. *Biochemical Journal*, **101**: 103-111
- Hawkesford MJ (2003):** Transporter gene families in plants: the sulphate transporter gene family - redundancy or specialization? *Physiologia Plantarum*, **117**: 155-163
- Hayes JM (1994):** Global methanotrophy at the Archean-Proterozoic transition. *Early Life of Earth*, New York, *Columbia University Press*: 220-236
- Heiss S, Schäfer HJ, Haag-Kerwer A, Rausch T (1999):** Cloning sulfur assimilation genes of Brassica juncea L.: cadmium differentially affects the expression of a putative low-affinity sulfate transporter and isoforms of ATP sulfurylase and APS reductase. *Plant Molecular Biology*, **39**: 847-857
- Hood E, Helmer GL, Fraley RT and Chilton MD (1986):** The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *Journal of Bacteriology*, **168**: 1291-1301
- Hooykaas PJJ & and Shilperoort RA (1992):** *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Molecular Biology*, **19**:15-38
- Husbands AY, Chitwood DH, Plavskin Y, Timmermans MCP (2009):** Signals and prepatterns: new insights into organ polarity in plants. *Genes & Development*, **23**:1986-1997
- Izhaki A & Bowman JL (2007):** KANADI and Class III HD-Zip Gene Families Regulate Embryo Patterning and Modulate Auxin Flow during Embryogenesis in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **19**: 495-508
- Jefferson RA & Kavanagh AT (1987):** GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal*, **6** (13): 3901-3907
- Jiao Y, Tausta SL, Gandotra N, Sun N, Liu T, Clay NK, Ceseranti T, Chen M, Ma L, Holford M, Zhang H, Zhao H, Deng X, Nelson T (2008):** A transcriptome atlas of rice cell types uncovers cellular functional and developmental hierarchies. *Nature Genetics*, **41**: 258-263
- Kataoka T, Watanabe-Takahashi A, Hayashi N, Ohnishi M, Mimura T, Buchner P, Hawkesford MJ, Yamaya T, Takahashi H (2004):** Vacuolar Sulfate Transporters Are Essential Determinants Controlling Internal Distribution of Sulfate in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **16**: 2693-2704
- Kawashima CG, Yoshimoto N, Maruyama-Nakashita A, Tsuchiya YN, Saito K, Takahashi H, Dalmay T (2009):** Sulphur starvation induces the expression of microRNA-395 and one of its target genes but in different cell types. *The Plant Journal*, **57**:313-321

- Kerstetter RA, Bollmann K, Taylor RA, Bomblies K, Poethig RS (2001):** KANADI regulates organ polarity in Arabidopsis. *Nature*, **411**: 706-709
- Kim JY, Yuan Z, Cilia M, Khalfan-Jagani Z, Jackson D (2002):** Intercellular trafficking of KNOTTED1 green fluorescent protein fusion in the leaf and shoot meristem of Arabidopsis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99** (6): 4103-4108
- Kinsman EA & Pyke KA (1998):** Bundle sheath cells and cell-specific plastid development in Arabidopsis leaves. *Development*, **125**: 1815-1822
- Knappe S, Löttgert T, Schneider A, Voll L, Flügge UI, Fischer K (2003):** Characterization of two functional *phosphoenolpyruvate/ phosphate translocator (PPT)* genes in Arabidopsis - *AtPPT1* may be involved in the provision of signals for correct mesophyll development. *The Plant Journal*, **36**: 411-420
- Koncz C, Martini N, Mayerhofer R, Koncz-Kalman Z, Körber H, Redei GP, Schell J (1989):** High-frequency T-DNA-mediated gene tagging in plants. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **86**: 8467-8471
- Kopriva S (2006):** Regulation of Sulfate Assimilation in Arabidopsis and Beyond. *Annals of Botany*, **97**: 479-495
- Kopriva S & Koprivova A (2005):** Sulfate assimilation and glutathione synthesis in C4 plants. *Photosynthesis Research*, **86**: 363-362
- Ku MSB, Kano-Murakami Y, Matusoka M (1996):** Evolution und Expression of C4-Photosynthesis Genes. *Plant Physiology*, **111**: 949-957
- Kubicki A, Steinmüller K, Westhoff P (1994):** Differential transcription of plastome-encoded genes in the mesophyll and bundle-sheath chloroplasts of the monocotyledonous NADP-malic enzyme-type C4 plants maize and Sorghum. *Plant Molecular Biology*, **25**: 669-679
- Kubo H, Kishi M, Goto K (2008):** Expression analysis of *ANTHOCYANINLESS2* gene in Arabidopsis, *Plant Science*, **175**: 853-857
- Kubo H, Peeters AJM, Aarts MGM, Pereira A, Koornneef M (1999):** *ANTHOCYANINLESS2*, a Homeobox Gene Affecting Anthocyanin Distribution and Root Development in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **11**: 1217-1226
- Landy A (1989):** Dynamic, Structural, and Regulatory Aspects of Lambda Site-specific Recombination. *Annual Reviews in Biochemistry*, **58**: 913-949.
- Larkin JC, Oppenheimer DG, Pollock S, Marks DM (1993):** Arabidopsis GLABROUS1 Gene Requires Downstream Sequences for Function. *The Plant Cell*, **5**: 1739-1748
- Lazo GR, Stein PA, Ludwig RA (1991):** A DNA transformation-competent Arabidopsis genomic library in Agrobacterium. *BioTechnology*, **9**: 963-967
- Leegood RC (2008):** Roles of the bundle sheath cells in leaves of C3 plants. *Journal of Experimental Botany*, **59** (7): 1663-1673

- Leustek T, Martin MN, Bick JA, Davies JP (2000):** Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **51**: 141–165
- Li H, Culligan K, Dixon R, Chory J (1995):** CUE1: A mesophyll Cell-Specific Positive Regulator of Light-Controlled Gene-Expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **7**: 1599-1610
- Logemann E, Birkenbihl RP, Ülker B, Somsich IE (2006):** An improved method for preparing *Agrobacterium* cells that simplifies the *Arabidopsis* transformation protocol. *Plant Methods*, doi:10.1186/1746-4811-2-16, **2**: 16
- Long D, Martin M, Sundberg E, Swinburne J, Puangsomlee P, Coupland G (1993):** The maize transposable element system Ac/Ds as a mutagen in *Arabidopsis*: Identification of an albino mutation induced by Ds insertion. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **90**: 10370-10374
- Malamy JE & Benfey PN (1997):** Analysis of *SCARECROW* expression using a rapid system for assessing transgene expression in *Arabidopsis* roots. *The Plant Journal*, **12**: 957-963
- Maruyama-Nakashita A, Nakamura Y, Yamaya T, Takahashi H (2004):** Regulation of high-affinity sulphate transporters in plants: towards systematic analysis of sulphur signaling and regulation. *Journal of Experimental Botany*, **55** (404): 1843-1849
- Maruyama-Nakashita A., Nakamura Y, Toghe T, Saito K, Takahashi H (2006):** *Arabidopsis* SLIM1 is a central transcriptional regulator of plant sulphur response and metabolism. *The Plant Cell*, **18**: 3235-3251
- McClintock B (1950):** The origin and behaviour of mutable loci in maize, *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **6**: 344-355
- McConnell JR, Barton MK (1998):** Leaf polarity and meristem formation in *Arabidopsis*. *Development*, **125**: 2935-2942
- McConnell JR, Emery J, Eshed Y, Bao N, Bowman J, and Barton MK (2001).** Role of *PHABULOSA* and *PHAVOLUTA* in determining radial patterning in shoots. *Nature*, **411**: 709-713
- Mohanty B, Krishnan SP, Swarup S, Bajic VB (2005):** Detection and preliminary analysis of the motifs in promoters of anaerobically induced genes of different plant species. *Annals of Botany*, **96** (4): 669-681
- Morrison DA (1997):** Transformation in *Escherichia coli*: Cryogenic Preservation of Competent Cells. *Journal of Bacteriology*, **132** (1): 349-351
- Murashige T, Skoog F (1962):** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiologia Plantarum*, **15**: 473-497
- Mustroph A, Zanetti ME, Jang CJH, Holtan HE, Repetti PP, Galbraith DW, Girke T, Bailey-Serres J (2009):** Profiling transcriptomes of discrete cell populations resolves altered cellular priorities during hypoxia in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106** (44): 18843-18848

- O’Kane CJ & Gehring WJ (1987):** Detection in situ of genomic regulatory elements in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **84**: 9123-9127
- Otsuga D, De Guzman B, Prigge MJ, Drews GN, and Clark SE (2001):** REVOLUTA regulates meristem initiation at lateral positions. *The Plant Journal* **25**: 223–236.
- Passera C & Ferretti M (1988):** Sulphate Uptake by Leaf Mesophyll and Bundle Sheath Cells of Maize Plants. *Biologia Plantarum*, **30** (6): 451-456
- Plesch G, Kamann E, Mueller-Roeber B (2000):** Cloning of regulatory sequences mediating guard-cell-specific gene expression. *Gene*, **249**: 83-89
- Ptashne M (1992).** A Genetic Switch: Phage (Lambda) and Higher Organisms (Cambridge, MA: Cell Press)
- Rae AL & Smith FW (2002):** Localisation of expression of a high-affinity sulfate transporter in barley roots. *Planta*, **215**: 565-568
- Rose AB, Elfersi T, Parra G, Korf I (2008):** Promoter-Proximal Introns in *Arabidopsis thaliana* Are Enriched in Dispersed Signals that Elevate Gene Expression. *The Plant Cell*, **20**: 542-551
- Sadowski I, Ma J, Triezenberg S, Ptashne M (1988):** Gal4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature*, **335**: 563-566
- Sage RF (2004):** The evolution of C4 photosynthesis. *New Phytologist*, **161**: 341-370
- Saito K (2004):** Sulfur Assimilatory Metabolism. The Long and Smelling Road. *Plant Physiology*, **136**: 2443-2450
- Sakai H, Aoyama T, Bono H, Oka A (1998):** Two component response regulators from *Arabidopsis thaliana* contain a putative DNA-binding motif. *Plant Cell Physiology*, **39**: 1232-1239
- Sakai H, Aoyama T, Oka A (2000):** Arabidopsis ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators. *The Plant Journal*, **24** (6): 703-711
- Sánchez C, Vielba J M, Ferro E, Covelo G, Solé A, Abarca D, De Mier B, Díaz-Sala C (2007):** Two *SCARECROW-LIKE* genes are induced in response to exogenous auxin in rooting-competent cuttings of distantly related forest species. *Tree Physiology*, **27**: 1459-1470
- Sandelin A, Carninci P, Lenhard B, Ponjavic J, Hayashizaki Y, Hume DA (2007):** Mammalian RNA polymerase II core promoters: insights from genome-wide studies. *Nature Reviews in Genetics*, **8** (6): 424-436
- Sessa G, Steindler C, Morelli G, Ruberti I (1998):** The *Arabidopsis Athb-8, -9, and -14* genes are members of a small gene family coding for highly related HD-ZIP proteins. *Plant Molecular Biology* **38**: 609-622.
- Shahmuradov IA, Solovyev VV, Gammerman AJ (2005):** Plant promoter prediction with confidence estimation. *Nucleic Acids Research*, **33** (3): 1069-1076

- Sieburth LE, Mereyowitz EM (1997):** Molecular Dissection of the AGAMOUS Control Region Shows That *cis* Elements for Spatial Regulation Are Located Intragenically. *The Plant Cell*, **9**: 355-356
- Siegfried KR, Eshed Y, Baum SF, Otsuga D, Drews GN, Bowman J L (1999):** Members of the *YABBY* gene family specify abaxial cell fate in *Arabidopsis*. *Development* **126**: 4117-4128
- Siemering KR, Golbik R, Sever R, Haseloff J, (1996):** Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Current Biology*, **6**: 1653-1663
- Sinha N (1999):** Leaf Development in Angiosperms, *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **50**: 419-446
- Sitte P, Ziegler H, Ehrendorfer F, Bresinsky A (1998):** Strasburger Lehrbuch der Botanik, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- Smith FW, Ealing PM, Hawkesford MJ, Clarkson DT (1995):** Plant members of a family of sulfate transporters reveal functional subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**: 9373-9377
- Smith FW, Hawkesford MJ, Ealing PM, Clarkson DT, Vanden PJ (1997):** Regulation of expression of a cDNA from barley roots encoding a high affinity sulphate transporter. *The Plant Journal*, **12** (4): 875-884
- Springer P (2000):** Gene Traps: Tools for Plant Development and Genomics. *The Plant Cell*, **12**: 1007-1020
- Sundaresan V, Springer P, Volpe T, Haward S, Jones JDG, Dean C, Ma H, Martienssen R (1995):** Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Genes & Development*, **9**: 1797-1810
- Takahashi H, Asanuma W, Saito K (1999a):** Cloning of an *Arabidopsis* cDNA encoding a chloroplast localizing sulfate transporter isoform. *Journal of Experimental Botany*, **50**: 1713-1714
- Takahashi H, Watanabe-Takahashi A, Smith FW, Blake-Kalff M, Hawkesford M, Saito K (2000):** The roles of three functional sulphate transporters involved in uptake and translocation of sulphate in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, **23** (2): 171-182
- Talbert PB, Adler HT, Parks DW, Comai L (1995):** The REVOLUTA gene is necessary for apical meristem development and for limiting cell divisions in the leaves and stems of *Arabidopsis thaliana*. *Development*, **121**: 2723-2735.
- Taylor CB (1997):** Promotor fusion analysis: An insufficient measure of gene expression. *The Plant Cell*, **9**: 273-275
- Teakle GR, Manfield IW, Graham JF, Gilmartin PM (2002):** *Arabidopsis thaliana* GATA factors: organisation, expression and DNA-binding characteristics. *Plant Molecular Biology*, **50** (1): 43-57.
- Tomatsu H, Takano J, Takahashi H, Watanabe-Takahashi A, Shibagaki N, Fujiwara T (2007):** An *Arabidopsis thaliana* high affinity molybdate transporter required for efficient

uptake of molybdate from soil. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **104**: 18807–18812

Truernit E & Hibberd JM (2007): Immunogenic tagging of chloroplasts allow their isolation from defined cell types. *The Plant Journal*, **50**: 926-932

Tsugeki R, Federoff NV (1999): Genetic ablation of root cap cells in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **96**: 12941-12946

Waites R & Hudson A (1995): *phantastica*: A gene required for dorsoventrality of leaves in *Antirrhinum majus*. *Development*, **121**: 2143–2154

Westhoff P & Gowik U (2004): Evolution of C4 Phosphoenolpyruvate Carboxylase. Genes and Proteins: a Case Study with the Genus *Flaveria*. *Annals of Botany*, **93**:13-23

Woo KC, Anderson JM, Boardman NK, Downton WJS, Osmond CB, Thorne SW (1970): Deficient Photosystem II in Agranal Bundle Sheath Chloroplasts of C4-Plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **67** (1): 18-25

Wray GA, Matthew WH, Abouheif E, Balhoff JP, Pizer M, Rockmann MV, Romano LA (2003): The Evolution of Transcriptional Regulation in Eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution*, **20** (9): 1377-1419

Wu G, Lin W, Huang T, Poethig RS, Springer PS, Kerstetter RA (2008): KANAD11 regulates adaxial-abaxial polarity in *ARABidopsis* by directly repression the transcription of *ASYMMETRIC LEAVES2*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105** (42): 16392-16397

Wysocka-Diller JW, Helariutta Y, Fukaki H, Malamy JE, Benfey PN (2000): Molecular analysis of SCARECROW function reveals a radial patterning mechanism common to root and shoot. *Development*, **127**: 595-603

Yang W, Jefferson RA, Huttner E, Moore JM, Gagliano WB, Grossniklaus U (2005): An Egg Apparatus-Specific Enhancer of *Arabidopsis*, Identified by Enhancer Detection, *Plant Physiology*, **139**: 1421–1432

Yoo SY, Bomblies K, Yoo KS, Yang JW, Choi MS Lee JS, Weigel D, Ahn JH (2005): The 35S promoter used in a selectable marker gene of a plant transformation vector affects the expression of the transgene. *Planta*, **221** (4): 523-530

Zheng X, Deng W, Luo K, Duan H, Chen Y, McAvoy R, Song S, Pei Y, Li Y (2007): The cauliflower mosaic virus (CaMV) 35 promoter sequence alters the level and patterns of activity of adjacent tissue- and organ-specific gene promoters. *Plant Cell Reporter*, **26**: 1195-1203

VII. Anhang

VII.1. Sequenzen der in den iPCR-Reaktionen aus „Enhancer Trap“-Linien isolierten Produkte:

GRAU UNTERLEGT: Primerbindestellen

GRAU: T-DNA-Sequenz bis zur Schnittstelle

GRAU, KURSIV: nicht zugeordnete Sequenz

KURSIV: T-DNA-Rand

SCHWARZ, FETT: isolierte flankierende genomische DNA-Sequenz aus *Arabidopsis*

UNTERSTRICHEN: Schnittstellen

UCR8:

Restriktionsendonuklease: Kpn21 (T/CCGGA)

Primer: PCRII

Primer 5FI: 5'-GTAGAGCTAGTTTCCCGACCGT-3'

Primer 5RI: 5'-TACGATAACGGTCGGTACGGG-3'

Isolierte Sequenz:

GTAGAGCTAGTTTCCCGACCGT TTCACCGGGATCCCGTTTTTAATCGGGATGATCCCGTT
TCGTTACCGTATTTTCTAATTCGGGATGACTGCAATATGGCCAGCTCCAACCTCCCATCCA
TAACCACTGAGGCCAGCCCATGTAAGAAATACCTAGCGAACGCTGCTCTGCCTCTCTCC
CAGGCGGCCAGGCACCACACGAGTAACAGCATCACACATTACACGCGCCGACGCGCCCA
CGCCGGAGTT **TATATAAAAGTTGGAACAACTCTAGAAGCAACCTTTAAT** CAGGGATGAA
AGTAGGATGGGAAAAT **CCCGTACCGACCGTTATCGTA**

Insertionsposition: 614886, Chromosom 4

UCR9

Restriktionsendonuklease: Kpn2I (T/CCGGA)

Primer: PCRII

Primer 5FI: 5'-GTAGAGCTAGTTTCCCGACCGT-3'

Primer 5RI: 5'-TACGATAACGGTCGGTACGGG-3'

Isolierte Sequenz:

GTAGAGCTAGTTTCCCGACCGT TTCACCGGGATCCCGTTTTTAATCGGGATGATCCCGTTT
CGTTACCGTATTTTCTAATTCGGGATGACTGCAATATGGCCAGCTCCAACCTCCCATCCAT
AACCCTGAGGCCAGCCCATGTAAGAAATACCTAGCGAACGCTGCTCTGCCTCTCTCCC
AGGCGGCCAGGCACCACACGAGTAACAGCATCACACATTACACGCGCCGACGCGCCAC
GCCGGAGTCCTTG **TTTAGGATCAATTCGATGAAATGAAACAAAGACAAGAGGCAACAAG**
TGTGGGCTATATTGCTGCTGCTACTGCTGCTGCTTTGTGTGTAGTAGACAG CAGGGATGA
AAGTAGGATGGGAAAAT **CCCGTACCGACCGTTATCGTA**

Insertionsposition: 26915886, Chromosom 5

UCR10

Restriktionsendonuklease: Bsp 68I (TCG/CGA)

Primer: PCRII

Primer 5FI: 5'-GTAGAGCTAGTTTCCCGACCGT-3'

Primer 5RI: 5'-TACGATAACGGTCGGTACGGG-3'

Isolierte Sequenz:

GTAGAGCTAGTTTCCCGACCGT TTCACCGGGATCCCGTTTTTAATCGGGATGATCCCGTT
TCGTTACCGTATTTTCTAATTCGGGATGACTGCAATATGGCCAGCTCCAACCTCCCATCCA

TAACCACTGAGGCCAGCCCATGTAAGAAATACCTAGCGAACGCTGCTCTC**TCATATAAA**
CAAACATGATCTAATATGGATTGTCTTTGAATGAAGGGGTGGATTGATGATGGGAG CAGG
 GATGAAAGTAGGATGGGAAAAT**CCCGTACCGACCGTTATCGTA**

Insertionsposition: 8678750, Chromosom 2

1744

Restriktionsendonuklease: AvaIII (ATG/CAT)

RP3: 5'-AGTGAATTAATTCCCGATCTAGTAA-3'

LB3: 5'-CCACCCAGTACATTA AAAACGTC-3'

Isolierte Sequenz:

CCACCCAGTACATTA AAAACGTC CGCAATGTGTGTTTTTTTTAAAAAAGAGTATATTTCT
GGTGAGAAGTGGGTCTACTAAATGACACATTTTGCTAAACATCTACCCCTCGTGCTTCGAG
CTTCTTCACCTCTCGTGATTTTTCTATTATATTAATAAGCGAAGAATGCCGCATTTTATG
CGAAAATCTGGAAATAAAAATACTTTTAAGGTTTTCTTTTCTTAACAATGGAGGCTGAAA
CCTGAGTGTGTAAGTATTATCAGTACTTTCTTTTGCATCTGCATTTTATCAGTAGAT
TTTCTGTTCTTGCAAGCATTGGATCAGATTCTTATAAGGTATATTTATGCCTTTATCTT
TTTCTTTCCGTGGGGATCAACAATGCAT GACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATT
 AGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACCTAG
 GATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATG**TTACTAGATCGGGAATTAATTCACT**

Insertionsposition: 18889207, Chromosom 2

2443

Restriktionsendonuklease: EcoRI (G/AATTC)

LB1: 5'-TTGATTTATAAGGGATTTTGCCGA-3'

2443 A: 5'-CCTTCACCTCTCCACTGACAG-3'

Isolierte Sequenz:

TTGATTTATAAGGGATTTTGCCGA TTTCGGAACCACCATCAAACAGGATTTTCGCCTGCT
 GGGGCAAACCAGCGTGGACCGCTTGCTGCAACTCTCTCAGGGCCAGGCGGTGAAGGGCAA
 TCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTGA AAAAGAAAAACCACCCAGTACATTA AAAACGTCC
 GCAATGTGTTATTAAGTTGTCTAAGCGTCAATTTGTTTACACCACAATAAATACACAATT
 AATCTATGAAATATACAATAATTACAATAATTAAT**AAAGATGCATTAATAAAGGTGTATC**
ATAACTACAATAAGTCTTTTTTTCTAGCATTGAAAATTTGCAACAACTGAATCCATTTA
ATAAATTATATCATAGAACCATGCATTAATATTTTAAATGTGTATTATGACTACTCAGTG
TACCCATGTGGTGTGTAATATAGTCAAATGTCCTTTTGATATTTTATTTGTTGCTTCT
CGCATTTTATCTTAAATTAACATGAGTTGGAGAATGCAAATATCCATTTTTTAGAAAG
ATTTGTATCATTCCCACGTATGTCATCGAGCTCATACATCTCTTTTGCAAACCCACGG
AACTTCACTTATTATGAATAACATTTTACATTTAACTATCATTCTACATGGTCTAGT
GGTTTCGTTAGATGTACAATATTTTATTACAGCGGAATTC AGTAAAGGAGAAGA ACTTT
 TCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTGTAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAAATTTT
CTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGG

Insertionsposition: 17078891, Chromosom 5

4369

Restriktionsendonuklease: BclI (T/GATCA)

RP2: 5'-CGATGGAGGACAGGAGCTTCATTGT-3'

FP2: 5'-AACAAAATATAGCGCGCAA ACTAGGATA-3'

Isolierte Sequenz:

CGATGGAGGACAGGAGCTTCATTGT TGGATCCNGGTTCTCTCAAATGAAATGAACTTCC
 TTATATAGAGGAAGGGTCTTGCGAAGATCCAGTGTCTT**CTGAAATTGAAAAGTCAGAGA**

JR11-2

Restriktionsendonuklease: AvaIII (ATG/CAT)

RP3: 5'-AGTGAATTAATCCCGATCTAGTAA-3'

LB3: 5'-CCACCCAGTACATTA AAAACGTC-3'

Isolierte Sequenz:

CCACCCAGTACATTA AAAACGTC CGCAATGTGTTATTAAGTTGTCTAAGCGTCAATTTG
 TTTACACCACAAAATGTTTTGTTGCTTTGGTTCTACTCTCCGCACTGAATCTTTCGATCA
 GCGATAATTGTTTCCTTCTTTTGGGATTTTCTCCTTGGGTACGAGGTTCTTTCCTTCTTT
 TATTTGCTCTGTTTTGAGATTTGGAATTGTTATCAAGTCTGACAAAACGGTCACTAAT
 CTTTCTGGGAAATTGAGCATGTTTCGTGTTCTTGCATCCGTTTGACTCTTTTTCTATGCAA
 AGTCTCAACCTTCAATAGTGGAAATTTATTCTTATCCCTAATTTCTCTTTACCAGACCTA
 TTTT TAGCTAAGTTTGGTTGAATTTAGAAAAGCTTTGATTCATAGTTGAAGAGATTCTCT
 CCATTAATCTTCTCTGTAATGTGTCTCAGATCCACTAAAAGTAAGTAAGAAAAAGATTTTG
 TTGTAATGTTATTAATGTGTCTTTGTAGATGGAACCAGCTCAATTAATGAGATGAGATG
 AGAATGTT CAGCTTGCAGAAGATGGCTATGGCTTTTACTCTCTTGTTTTTGCCTGTTTA
 TGCTCATTGTGTCTCCAGATGCTCAAGGTGATGCCTTTTCTTACTTTTTCAACTGCTATT
 TTGCTGCTCTCATTCTTGTTTTGTTTTCTGGTAATTTCTGAGCTTGTT CAGGTTGAAGAT
 TTAACTCTATGATTCTTTGCTTTTCCATTTT CAGGGGATGCACTGTTTGCGTTGAGGATC
 TCCTTACGTGCATTACCGAATCAGCTAAGTGACTGGAATCAGAACCAAGTTAATCCTTGC
 ACTTGGTCCCAAGTATTTGTGATGACAAAACCTTGTCACTTCTCTGTAAGTTAATGAC
 AACTCTGAATTAGGCAATGTTGTT

Insertionsposition 3238636, Chromosom 5

19956/32

Restriktionsendonuklease: BamHI (G/GATCC)

Oligo 96: 5'-AGTGCCAAGCTTGCATGC-3'

Oligo 86: 5'-TCGGGCCTAACTTTTGGTG-3'

Isolierte Sequenz:

TCGGGCCTAACTTTTGGTGAAAAAAATTGGTAATTACTCTTTCTTTTTCCGGAGAAAACG
 ACGGCGTAACGTCTGGTTTCATCGCAC CAGTCTGTCAAGGGAATGACGTGGCGCAACGAAA
 ATGGCGGAATACGTAAGCCCATATCATGCAAAGGAAGGAGACAAGGTATAGCATTAAAT
 GAATGAATATGCCTGCAAATACATTTAATGCTCCACGAGAGACAGCTTTTTTTTTTTTTT
 TTAACTTGAAACGATACAGATCCCATCCAACATAACATCATCATCTCACAGTTCGCGTTT
 TCTAACCACAACACACCCACGCGTGTGGCTTACTCGCGCTACATAATAAAAATAACAAA
 CACAAACAAAAGAGTAAAGAGGGGTTTTCCAAACCCAGTCAATACCCGAACCACCAAC
 TCCTCCACCGTGATCGGACCCGAACCCTTTTACGTGCTTGTCCCATCACGGTGACAAAGG
 AGTTGGATCTCGCCACTCGCGCGTTTCGTTCTTGACTCGACACCCCTCCCTCCCATAG
 TACAAGACCAAAAAACAAGTTATATAAAAATTCACAATTCATTAAGAAAAGAAACACA
 CGCACGCGCCAGTCTTGATCAAGATCAGCTTTCGCATTGTAAAGCGGCACGAATCTTCTG
 AACGGTGCATGATATTAGGTTGTTGACAGTCTCCACCGACTCAACCGTGAGTTTTGCCGT
 TGGGAGATTGTTTACAAGGATTTGAAACGCCACTGTCTGAGAGGATCCTCTAGAGTCGAC
 CTGCAGGCATGCAAGCTTGG

Insertionsposition: 299202bp, Chromosom 4

19960 50 1:

Restriktionsendonukleasen: TaqI (T/CGA) und XhoI (C/TCGAG)

oligo 156 rev: 5' GATCCGTCGTATTTATAGG 3'

oligo 155: 5' ATAACGCTGCGGACATCTAC 3'

Isolierte Sequenz (TaqI):

ATCCGTCGATTTATAGGCGAAAGCAATAAACAAATTATTCTAATTCGGAAATCTTTATT
TGCACAAATCATTAAATGCCTTGAAATAAAAATATGATAAATTGTAAGACTATGTTTATAT
ATCAGGAAATTTAAATAAGTGAGATTTTATTCAATTGTAAATGGCTTCATGTCCGGGAAA
 TCTACATGGATCAGCAATGAGTATGATGGTCAATATGGAGAAAAAGAAAGAGTAATTACC
 AATTTTTTTTCAATTCAAAAATGTAGATGTCCGCAGCGTTAT

Isolierte Sequenz (XhoI):

GATCCGTCGATTTATAGGCGAAAGCAATAAACAAATTATTCTAATTCGGAAATCTTTATT
 TCGACGTGTCTACATTCACGTCCAAATGGGGGCTTAGATGAGAACTTCACGATCGC**CTC**
GAGAGTATATCTTGAAAACGATAGTTGAGAAAGGTAATATTGTCATTTCGCTATATTCC
AAATATTGGAAGCTTTTTATTTTATTTTGGGATGGTATTTCAATTTGTCTTTTTCACCTT
TCAACAAGTAAACCCATCTATCAATATAATAAATTATTTTACGGCTAGATTAATTGAT
TTCATGTTTTAGTTTTATTCGTTTTAACTACTGAAATTTTGATTTCCATAGATAAAGTTGA
AGAATAATAGCAAAAATAAATCTTGTCTTATCAATTTAGTAGATGAAATTTTCAAATGT
AAAGTGATTTTAATAATCGACCAATTCATAGATGAAAAGCATACAACCTTTAACAATAA
AAATTAATACGATTATCATCCATTAAAACCTTAACAATTTGAGTAATAAATCAAAAATC
AATTGATCTTTAAAATAATAATGTTACAGATTATCATGAAGAATAATAATTAATAATGT
TGGAGAAGAGTACAAGAGGAGAGAGAATAAAGGGTTCGCTCTCTTCTGTCTATCTAATCT
ATAGTCAAAGCAAAAGCCAAAATTAATTAATAAATAAATAACAAGAAGAAAAAAACAA
 ACACAAGACCTATTCTAAAATAAATAAAAAGTTTCATTATAACCAAAAAAAAAAATAAAT
 AAAAAAGAGAGAGTGCTTTGATTTTGGTACCC

Insertionsposition: 5411092, Chromosom 5

VII.2. Sulfattransporter- Sequenz aus *Flaveria bidentis*:

Sequenzen der Kontigs 127 und 23495, die für Primerdesign verwendet worden sind:

>Contig127

TTTTACTACAAAACCTGATGCCATCTCTGTGTTGGAAGCTGTTTTTAATTCATTT
 CACTCCTC**AT**GGCACCCTTTGAATTTGGTTCTTGATGTGCATTCCATATTCA
 TCCTCATTACCAGACAAATTGGAAAAAGAACAAGAAATTATTCTGGTTGCCTGC
 GATTTCCCGGTTATATCGGTCATTTTATCGACTCTGATAGTGTATCTAACGAGA
 GCGGATGAACATGGGGTTAATATCATTAGACATTTTAAAGGAGGACTCAATCCAA
 GTTCATTGAACCAGTTGGAGTTAATGGTCCACACCTTGGCGAAGTAGCCAAAAT
 CGGCTTCATTTGTGCTATTATTGCATTAACCGAAGCCGTTGCTGTTGGTGCATCT
 TTTGCATCAATCAGAGGGTATAACTTAGACGGGAACAATGAAATGTTAGCCATGG
 GCTTTATGAACATTGCTGGATCTATGTCTTCTTGCTATGCTGTACAGGATCTTT
 TTCGCGAACTGCTGTAAATTTTAGTGCAGGCTGTCAATCTCCAGTATCCAACATA
 GTAATGGCGGTAACCGTGTTTCATATCATTGCAAGTGTTAACGAAGCTATTGTATT
 ACACACCTCTTACCATATTAGCATCGATTATCTTGTCTGCGCTTCCCGGATTAAT
 CGATTACAATGAAGCTTATCATATTTGGAAAGTTGATAAAAAGGACTTTCTTGCA
 TCGCTGGGGCTTTCTTTGGTGTGCTCTTTGCATCCGTGGAGATTGGTCTTTTGA
 TTGCTGTGGGTGTTTCATTTGGAAGATTAATCCTTAATTCCATAAGATCGGACGT
 AGAAGAATTAGGAAGGCTCCCGGGAACAAACATTTTCTGTGACAAAGCACAAATAT
 CCTGGGGTGGTTGATGTTTCAGGTGTTTCGCATAATTCGCCTTAACCTCTGGCTCAT
 TTTGTTTTGCCAATGCAAATCCAATTAAGGAAAGGATAACCAACATCTGACAGA
 AAAGAATGAGGCAAGGAAACAGATTACTGGAATCATCTTAGACATGTCCAGTGTC
 GTCAGCATTGACTCTTCAGGAATTCTGGCGCTAGAAGAAATCCACAAGAAATTGG
 TTTCAGAAAACGTACATTTAGCCATCGCCAATCCAAGATGGAAAGTGATCCACAA
 GCTAAAAGTAGCTGGGTTCGTTGAGAAAGTTGGAATGATAGTATTTTCTCACG

GTTGATGAAGCTGTTGATGTTTGTCTCAGTTCCAAGTCTATCGGTGTTGCCAATT
 GCTGATATTTATATATATATGTATGTATGTATGTATGTATGTATAAACGTATATG
 TATATTGGCTAAAAAATTGTTGTCACCTAATTGAAGGACCTATA

>Contig23495

TTTGGGTATCAGCAGGAGCACCTCTGCTTTCAGTGATCCTCTCTACTATCATTGT
 CTTTGTTTTTTAAAGCACAAAACCATGGCATTCTGTGATTGGAGAATTACAAGAA
 GGGTTAAATCCACCTTCATGGAACATGTTGCATTTTCATGGAAGTCATATTGGTT
 TGGTGTGAAAACCTGGTGTCACTGGCATCATTTCCCTCACTGAAGGGATTGC
 TGTAGGAAGAACATTTGCTGCCCTGAAGAATTATCAAGTTGATGGTAACAAAGAA
 ATGATTGCAATTGGAGTTATGAATGTTGTTGGTTCCACCCTTCATGCTACATCA
 CTACTGGTGCATTTTCACGGTCAGCCGTGAACCACAACGCTGGAGCCAAAACCGC
 AGTCTCCAACATAATCATGGCTGTGACGGTTATGGTCACACTCCTTTTCTTAATG
 CCATTGTTTCAGTACACACCCAACCTAGTATTGGGCGCAATCATCGTCACTGCAG
 TCGTTGGCCTCATCGACATCCCAGCAGCTTACCAAATATGGAAAGTCGATAAATT
 CGACTTCGTTGTGATGTTATGTGCTTTCTTTGGTGTGCATCTTTATATCAGTCCAA
 GAAGGACTTGCACCTTGCTGTGCGGGATATCTATATTCAAGATGGTGTGCAAATGA
 CGAGGCCTAAAACAGTGGTGTGGGGAACATACCTGGTACTGACATATTTCCGAA
 CAAACATCAGTACAAGGATGCTGTATCGATCCCAGGTTTCTTGATCTTGAGTATT
 CAGGCTCCCATAAGTTTTGCCAACTCTAATTATCTCAATGAAAGGATTATGAGGT
 GGATACAAGATTATGAAGAGGAAGAACAAACCAAAGTCATACTGATCTCAGATT
 CTTAATTATAGATCTTGCTGCTGTAAGTGGCATTGATGCTAATGGAGTGACCTTT
 TTCCAAGAACTCAGGAGGGTATTGGAGAAGAAGGGTGTGAGCTTGACTGGTGA
 ACCAGTCGGAGAAGTGATGGAGAACTGCAAAAAGCANACGGGACTAACGATCT
 TTTGCAGCCGAATAATC

Nach dem „Genome-Walking“-Experiment zusammengesetzte Sequenz, mit einem Teil des 5'-Bereichs eines isolierten Sulfattransporters aus *Flaveria bidentis*. Unterstrichen wurden die mit der cDNA übereinstimmenden Exons bis zu dem Primer, der in der zweiten PCR verwendet worden ist. Die Primerbindestellen wurden grau unterlegt.

Fett: Translationsstart

Grau unterlegt: Primerbindestellen

Unterstrichen: Teil der cDNA (Exons)

>SultrFb

TTGAGCAGCAACTGGCTTCTTAATTCTCCAGATCCTCCAGGATTTCTCCAACAAGTCTTT
 CAATCAATAAAAGATAATGTCTTTCCCTCAAAGAACACTAGTATGTCTTCTTCATCATTA
 TCTTCCCAGACGAAACATTCATCTTTTGCACGTGTCGTAGAGATGCTCAGTAGTATATTT
 CCTGCACTTAATTGGGCTAGAAACTATAAAGCCTCAATGTTCAAGAATGACTTGATTGCT
 GGATTAACCTTGCAGCCTCAGCATTCCTCAGGTACATACGTACATTATATATATAACT
 AATTCTTCACCTATACAAACATATATGTGTTTAAAGTTTCCTTTTTGAATAAGCAAATT
 CAACTACTCATTGATCGATCTATACTAATAATTATTTTAAATCAAATCGCATATATAT
 TCAATTCTTGATCAAAATGCAAAGAGTAGTTAATGATTTTTTGCAGAGTATCGGATATG
 CTGCTTTAGCTAATCTAGATCCTCAGTATGGCCTATGTAAGTTAACAAAACATGGATGTT
 TGTTCCTTACACTTTCCACAATTTATTGAATGTTGTTACTTATAATATGCTTATTTGATT
 GGTTTGAATTTATTTATTTGATGTGTGTGTATATATATATGTTCAATTCATAGATGGAAGT
 GTTGTTCCTCCTTTGATATATGCTGTCATGGGTACTTCACATGAACTAGCCATTGGTCCA
 GTAGCTGTGGTGTCACTCCTGATATCATCACTTATCACAAAACCTAGCTGATCCTGTCACT
 GATCCTGCTTCCACTTGAACCTTGTTCACAACCTTTTTTCGCCGGCACCTTCCAA
 GCTTTTTTGGATTTCTTAGGTACGCACTTACTAATTCATTCATGTAGAAACAAAGAAAT
 ATATATGTGTGTACATTTATATAATATGTCCGTTAATTTAAGTTGTGGGATATTTCTAAT

ATTCTTTCAGGTTAGGTTTCCTGATTGATTTTCTATCGCATGCGGCAATTGTGGGATTCA
 TGGCGGGTGCAGCCATAGTTATCGGTCTTCAACAACCTCAAGAGTTTATTCGGAATGAGTC
 ATTTTACTACAAAACTGATGCCATCTCTGTGTTGGAAGCTGTTTTTAATTCATTTCACT
 CCTCAGTACGTTAATTAATATTTCCCCATTACCGTGTGATTATGTTTCTTTCTACAACCT
 TAAGGAAATCTAGCTTATTGTATATTCCTATACGTTTTGCAGTGGCACCCCTTTGAATTTG
 GTTCTTGGATGTGCATTCCCTCATATTCATCCTCATTACCAGACAAATTGTGAGTAGATCC
 ATCAGTTTTGCGAACATCAAATTCATTATTAATTTCTTAAATATTAATTGTCATTGGATG
 ATCATTAATTAACCTTGATCAAATTAATTAACCTCCAATTAATCCAGGGAAAAAAGAACAAG
 AAATTATTCTGGTTGCTGCGATTTCCCGGTTATATCGGTCATTTTATCGACTCTGATA
 GTGTATCTAACGAGAGCGGATGAACATGGGGTTAATATCATTAGACATTTTAAAGGAGGA
 CTCAATCCAAGTTCATTGAACCAGTTGGAGTTAATGGTCCACACCTTGGCGAAGTAGCC
 AAAATCGGCTTCATTTGTGCTATTATTGCATTAACCGAAGCCGTTGCTGTTGGTGCATCT
 TTTGCATCAATCAGAGGGTATAACTTAGACGGGAACAATGAAATGTTAGCCATGGGCTTT
 ATGAACATTTGCTGGATCTATGTCTTCTTGTCTATGCTGTACAGGATCTTTTTTCGCGAACT
 GCTGTAAATTTTAGTGCAGGCTGTCAATCTCCAGTATCCAACATAGTAATGGCGGTAACC
 GTGTTTCATATCATTGCAAGTGTAAACGAAGCTATTGTATTACACACCTCTTACCATATTA
 GCATCGATTATCTTGTCTGCGCTTCCCGGATTAATCGATTACAATGAAGCTTATCATATT
 TGAAAGTTGATAAAAAGGACTTTCTTGCATGCGCTGGGGCTTTCTTTGGTGTGCTCTTT
 GCATCCGTGGAGATTGGTCTTTTGATTGCTGTGGGTGTTTCATTTGGAAGATTAATCCTT
 AATTCCATAAGATCGGACGTAGAAGAATTAGGAAGGCTCCCGGGAACAACATTTTCTGT
 GACAAAGCACAATATCCTGGGGTGGTTGATGTTTCAGGTGTTTCGCATAATTCGCCTTAAC
 TCTGGCTCATTTGTTTTGCCAATGCAAATCCAATTAAGGAAAGGATAACCAACATCTG
 ACAGAAAAGAAATGAGGCAAGGAAACAGATTACTGGAATCATCTTAGACATGTCCAGTGTC
 GTCAGCATTGACTCTTCAGGAATTCTGGCGCTAGAAGAAATCCACAAGAAATTGGTTTCA
 GAAAACGTACATTTAGCCATCGCCAATCCAAGATGGAAAGTGATCCACAAGCTAAAAGTA
 GCTGGGTTTCGTTGAGAAAGTTGGAATGATAGTATTTTCTCACGGTTGATGAAGCTGTT
 GATGTTTGTCTCAGTTCCAAGTCTATCGGTGTTGCCAATTGCTGATATTTATATATATAT
 GTATGTATGTATGTATGTATGTATAAACGTATATGTATATTGGCTAAAAAATTGTTGTCA
 CTAATTGAAGGACCTATA

VI.3. Verzeichnis der Proteinsequenzen im phylogenetischen Stammbaum

Die folgende Tabelle enthält die Proteinsequenzen, die zur Erstellung des Phylogenetischen Stammbaums der Sulfattransporter verwendet worden sind. Um die Sequenzen im Stammbaum darstellen zu können, wurden für jede Sequenz kurze Bezeichnungen gewählt.

<i>Arabidopsis thaliana</i>			
Bezeichnung	Gen, Acc.-Nr.	Bezeichnung	Gen, Acc.-Nr.
>ATS11	AtSultr1;1, At4g08620	>ATS33	AtSultr3;3, At1g23090
>ATS12	AtSultr1;2, At1g78000	>ATS34	AtSultr3;4, At3g15990
>ATS13	AtSultr1;3, At1g22150	>ATS35	AtSultr3;5, At5g19600
>ATS21	AtSultr2;1, At5g10180	>ATS41	AtSultr4;1, At5g13550
>ATS22	AtSultr2;2, At1g77990	>ATS42	AtSultr4;2, At3g12520
>ATS31	AtSultr3;1, At3g51900	>ATS51	AtSultr5;1, At1g80310
>ATS32	AtSultr3;2, At4g02700	>ATS52	AtSultr5;2, At2g25680
<i>Populus trichocarpa</i>			
Bez.	Gen, Acc.-Nr.	Bez.	Gen, Acc.-Nr.
>PT12	Pt-SULTR1.2, POPTR_005s16530.1	>PT33	Pt-SULTR3.3, POPTR_0008s12940.2
>PT11	Pt-SULTR1.1, POPTR_002s09310.1	>PT34	Pt-SULTR3.4, POPTR_0010s12190.1
>PT32	Pt-SULTR3.2, POPTR_0002s05030.1	>PT37	Pt-SULTR3.7, POPTR_0001s17960.1
>PT35	Pt-SULTR3.5, POPTR_0005s23530.1	>PTA	POPTR_0008s04930.1
>PT22	Pt-AST56.1, POPTR_0002s09300.1	>PTB	POPTR_0010s21820.1

>PT36	Pt-SULTR3.6, POPTR_0003s05490.1	>PTC	POPTR_0006s26210.1
<i>Medicago truncatula</i>			
Bezeichnung	Gen, Acc.-Nr.	Bezeichnung	Gen, Acc.-Nr.
>MTA	CU651589_4.1	>MTF	Medtr3g101180.1
>MTB	Medtr2g008590.1	>MTG	Medtr6g102060.1
>MTC	AC234703_12.1	>MTH	Medtr7g022760.1
>MTD	Medtr1g083930.1	>MTI	Medtr3g135970.1
>MTE	Medtr3g101160.1		
<i>Glycin max</i>			
Bezeichnung	Gen, Acc.-Nr.	Bezeichnung	Gen, Acc.-Nr.
>GMA	Glyma13g02060.1	>GMF	Glyma18g02240.1
>GMB	Glyma06g11140.1	>GMG	Glyma06g11150.1
>GMC	Glyma15g05760.1	>GMH	Glyma02g10590.1
>GMD	Glyma08g19240.1	>GMI	Glyma18g52270.1
>GME	Glyma11g36210.1	>GMJ	Glyma08g22300.1
<i>Vitis vinifera</i>			
Bezeichnung	Gen, Acc.-Nr.	Bezeichnung	Gen, Acc.-Nr.
>VVA	GSVIVT00015271001	>VVD	GSVIVT00023771001
>VVB	GSVIVT000315001	>VVE	GSVIVT00029532001
>VVC	GSVIVT00019457001		
<i>Sorghum bicolor</i>			
Bezeichnung	Gen, Acc.-Nr.	Bezeichnung	Gen, Acc.-Nr.
>SBA	Sb01g044090.1	>SBH	Sb01g021670.1
>SBB	Sb07g020050.1	>SBI	Sb01g044110.1
>SBC	Sb01g013290.1	>SBJ	Sb03g033045.1
>SBD	Sb10g003050.1	>SBK	Sb02g013390.1
>SBE	Sb01g046410.1	>SBL	Sb03g029450.1
>SBF	Sb01g044100.1	>SBM	Sb01g016450.1
>SBG	Sb06g030980.1 (XM_002448617)	>SBN	Sb03g029450.1
<i>Brachypodium distachyon</i>			
Bezeichnung	Gen, Acc.-Nr.	Bezeichnung	Gen, Acc.-Nr.
>BDA	Bradi3g35510.1	>BDF	Bradi5g24170.1
>BDB	Bradi1g62050.1	>BDG	Bradi1g51200.1
>BDC	Bradi1g71510.1	>BDH	Bradi2g48350.1
>BDD	Bradi1g74420.1	>BDI	Bradi4g08520.1
>BDE	Bradi3g27000.1	>BDJ	Bradi1g71500.1
<i>Oryza sativa</i>			
Bez.	Gen, Acc.-Nr.	Bez.	Gen, Acc.-Nr.
>OSA	13108.m00016, (LOC_Os08g01120.1)	>OSI	13101.m04210, (LOC_Os01g41050.1)
>OSB	13103.m12867, (LOC_Os03g09970.4)	>OSJ	13109.m00489, (LOC_Os09g06499.1)
>OSC	13103.m01102, (LOC_Os03g09930.)	>OSK	13101.m04703, (LOC_Os01g45830.1)
>OSD	13103.m01104, (LOC_Os03g09940.1)	>OSL	13108.m03257, (LOC_Os08g31410.7)
>OSF	13104.m05790, (LOC_Os04g55800.1)	>OSM	13103.m00715, (LOC_Os03g06520.1)
>OSG	13106.m00494, (LOC_Os06g05160.1)	>OSN	13101.m04703, (LOC_Os01g45830.1)
>OSH	13101.m05452, (LOC_Os01g52130.1)		
<i>Zea mays</i>			
Bez.	Gen, Acc.-Nr.	Bez.	Gen, Acc.-Nr.
>ZMA	13103.m12867, (LOC_Os03g09970.4)	>ZMF	GRMZM2G154211_T01
>ZMB	GRMZ2G159632_T01	>ZMG	GRMZM2G068212_T01
>ZMC	GRMZM2G342907_T01	>ZMH	GRMZM2G426922_T01
>ZMD	GRMZM2G080178_T02	>ZMI	GRMZMG083156_T01
>ZME	GRMZM2G042171_T01		

<i>Stylosanthes hamata</i>			
Bez.	Gen, Acc.-Nr.	Bez.	Gen, Acc.-Nr.
>SHST1	P53391.1, High affinity ST1	>SHST3	P53393, Low affinity ST3
>SHST2	P53392.1, High affinity ST2		
<i>Hordeum vulgare</i>			
Bez.	Gen, Acc.-Nr.		
>HVST 1	CAA65291.1, High affinity sulfate transporter		
<i>Triticum tauschii (Aegilops tauschii)</i>			
Bez.	Gen, Acc.-Nr.	Bez.	Gen, Acc.-Nr.
>TT1	CAB42985.1	>TT2	CAB42986.1
<i>Lycopersicon esculentum</i>			
Bez.	Gen, Acc.-Nr.	Bez.	Gen, Acc.-Nr.
>LE1	AAK27687.1 Sulfat transporter 1	>LE2	AAK27688.1 Sulfat transporter 2

Tabelle 13.: Verzeichnis der verwendeten Proteinsequenzen im Stammbaum

VII.4. Verwendete genomische Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana* zur Herstellung von Konstrukten

Die Sequenzen wurden in der dargestellten Orientierung vor das GUS-Gen, zum Teil mit Minimalpromotor fusioniert. Die Nummerierung wurde relativ zu dem jeweils benachbarten ATG aufgeführt.

>APX2	Numerierung relativ zum ATG des Gens At3g09640				
-1407	CCAAGAAGAG	GAAAACCGTT	ACCAAGGTAA	TCTCAATACT	TGACTTGTTT
-1357	TCTTATCAAC	CGTTTTTGGG	TTGTCTTTGT	TTAGTTACTG	ATTACATTTT
-1307	GATCTGTGGT	TGCATTTTCAT	TTGACTTAAC	TTATATTGCA	ATTGTTCTAA
-1257	TTGACTGAGT	TTGTGTATGT	TAAGCTATAC	AATAATCTGT	TCCCCTCTGG
-1207	TTTAGTCTAT	GACTATAGTA	GTCTTTCTTT	ACTAGATCTT	ACCTTTTCTG
-1157	TTCTGAATTG	TGGTCTAGTA	GTTTGTCTTG	TAAATCTGTT	GTGTACGATT
-1107	CTTTGTCTTG	ATATTGATTT	TAGGTTGAGC	TATTAAGCAA	TTGAATCTCT
-1057	TAGCACTTTC	TTGTCCCTTG	TGAAAATTGT	TCTTCATATG	TCCTCTTTTC
-1007	TAACTCCACT	TTGAAATATC	TATTTTTCTT	ACATCAGGAG	GAGGCGTTGG
-957	CAATCAAAGC	AGCAGGCAAG	TCGTGGTACA	AGACTATGAT	CTCCGACAGT
-907	GATTACACCG	AGTTTGATAA	CTTCACCAAA	TGGCTCGGTG	CTAGCCAGTA
-857	ATAATCTCGT	CTGCTTTGGA	ACACTTTCCA	TATTTTAGTC	AAAAGATTTT
-807	GGTTTTTTTA	ATCTGTTTTG	TCTTTGGGTG	TCTGGATATC	AAGTTGAATT
-757	ATGAACAAGT	TTCACTTTTT	TACATCTCCA	TTTCTTACTT	CGCCTTTATC
-707	AGTTTCATTT	ATTTATCTCT	TGCTCCTTCG	TTTCCTATGA	TGATGCTTGT
-657	TATGTTATGA	ACCTACTTAA	AAACAAGCTG	AAGCTTTCTT	TGGTTTACCC
-607	CAGCAGAAAC	ATTAATCAAG	TTCAATTGAT	CAATATGTCG	ATTGATTTAC
-557	TGTTTAAAGG	CATAGTGTGT	CTATCAACCC	TTAAGTCTTT	TTGGTGGATA
-507	GTGAAGCTCA	AACCCAATTC	AAATGTCGAT	CAACCCTAAC	GTTTTTGTGC
-457	TCGATAGTAA	AGCATGAGTA	TAAAAGAAGC	GTCGCTTCTT	CCTACAATCA
-407	CACAGATCAT	TTGAAGCTTT	GATTAGTTGG	TACAACATAC	TCGAGGAATA
-357	CAGAAATGACA	CGTGGTGTGT	ATCTGTTGGA	TAAATTTGTA	TTATTCTTCT
-307	TTACTATGGA	TGGTTTCTGG	AAGGCGCGCC	AAGAGTCTTT	CTTTTCCCAT
-257	CTACAAATCA	TGACCGTCCA	TCTCCAAAAG	AAGACTGAAA	CAGTGAAGCT
-207	AGAAGCTTCA	TTTTGATCAT	CAGCCAGTTT	TATAAATTGA	TCCGTATACT
-157	AAAGTAACAA	CTACTAGCAC	TTTCTTCTGT	GATCGATCAT	TGTGTTTAAA
-107	CTAAAGGTTT	GTATGTTCTT	GTAATCTTAT	TGATCTCGAT	AGGTTCTCCA
-57	TTCTCTTTAG	GTTTTAAAGC	CTTCAACGAT	TTCCAGAAGG	AAGCGAATTT
-7	<u>GAAAAAATG</u>				

>CUE Numerierung relativ zum ATG des Gens At5g33320

-969 ACGCATTATA ACATTTTTGC CTATTTTTGC TATTATCAAT TTTATAAAAT
-919 ATTGATATAT AGTTTTTTAA ACCGAACTCG AAAAGAAGAG TTTAACCTTA
-869 CCTTCAAAAT TTTAAAAATA TAATCTAATG TGTGTGACCT TATAAACGTT
-819 TATAATATAC GTATAAGGAT CATATTGCGT ATCATTTTTAG ACTTCAAATG
-769 ATGAACCTGC ATTTGTTGGA GATGAAGGAT AAAATTCCAA AAATAGATTA
-719 GTTAAAGAAT TTTTTTGCAC AAAGCCTATT TTTTTCTTTG ATGTATGTAA
-669 GCTTATCAAC TGAGGTTGGT CAAAAATGGA TTGAATAAGA ACATGTGCAC
-619 CATAAACCAA ATAATTTAGG TTTTAGATGT TTTAACACTT TGCTAGAAGC
-569 CGAGTATATA TAAAAGGATA TATGACTCAA GTTTTAGGAC CGAATTTTGT
-519 ATAGTTGGTT TGGATCTCCA TAATCTCAGA GCTTGGTGGT CAAGATTGTG
-469 CCTCGTAACC TCGTTATCCA AAAATGAAGT AGAATGTGAG TCGAATATCG
-419 TGAATTCGGT ACCCTCTCGT TAGCTCATAG TCGGTTGAAC CCTTTATCTC
-369 GAATTTGTCA AAACAAATTG ATATTTTGTG GTGAAAAAAA AAAGTTCAGA
-319 CGAAAAATAG TGGTACAAG TCTTGTTCTGA ATTGATACCC GAAAAACAT
-269 CTTAACCAAC TTAAAGTAAA AATTTAAAAT CGGAAATTTA AATATTACCC
-219 TAAAGTTTTA AAAGGCGGAC TTTTCAACGA AGGTTTATGC TAAGGTTAAA
-169 AAAAATACAG AAACGCTTTC TCACATTTCC ATTTCAATAA ATATATATCA
-119 GTCGCCACCC AAATTTCAGA ATTGCTTCTC TTAGTATTTG CTTTCACCAA
-69 CCCACTCGAC GGAGTCTCCA ACGCCTTCCT CCTCATTCTC CACTCTCACA
-19 CCACCAACTT CTGATTCCAG ATCTCAACGA TGCAAAGCTC CGCCGTATTC
+22 TCCCTCTCTC CGTCGCTTCC TCTCCTAAAA CCACGTCGGC TCTCTCTCCG
+72 CCACCATCCC ATAACCACCG CCGCTTCTTC AAGCGATCTA AACGTTTCTC
+132 CAAATGTTGT CTCTATTCTT TCTTTATCTC GTCGATCTTG GCGTCTCGCT
+182 TCGTCTGATT CGCCTCTCCG TGCTTGGTCC GGTGTTCTCT CTCCGATCTC
+242 TCACTCCTTA GACACGAATC GTTTCAGAAC CGCCGCTACT GCAGTTCCTG
+282 AAAGTGCTGA GGAAGGTGAT AACAGTGGT

>SCR Numerierung relativ zum ATG des Gens At3g54220

-2414 TCTCTATGAA AAGTGGAAT TTACCTGGAA GTCCGATTGA GAGGAGAGGA
-2364 TTGACCGGAG AGAGACCGGA GAAAGATGGG AGTGAAGGAG AAGAGATTGG
-2314 GAGACGAAGA GTAACCGGAC GGCGAGAAGA CGAGGAAGGT AATCGGAGTG
-2264 ATGCGGTGGA GGGAAGAGCT GATTTGAGAG AAGACATACT CCAGACTCTG
-2214 CTCACGGAAT CTGTAGGAGT CGCCATTGCC ATGGACATTG GAATCGCCAT
-2164 TAGATTGTGA TCCTCTGCAA CAAAGCGGAT TTTGCTGGTG TTGAATGGAT
-2114 AAGGGATAGA GGAAGAGGAC TTTGTTTATC AGAAACCTTT TGATGGGCCT
-2064 TAATGGGCCT ATAAACTGTA ACTCTGTAGC GCTTTGCCAA CAAGAGACTT
-2014 TTTAAGGTTT TTGTTGCCAA ACAGATATTT GCATTTGGGC TATGTAATGT
-1964 TAGAATTATT TTATAATGTA TGCTATTGCT AGATATTGTT TAAGTGCATT
-1914 TGTGATTTAC AAACATTTCA TTTTTATTTT GGTTTTAATG AGCATTCTA
-1864 TTATAGAGAC TTTGATGTTA ATAAATGGTG TTCTAAGATA TATTTAAAATA
-1814 TTTTATATAC TTTCTTAAAA TTGGATAAAT TTTGGGAAAA TCCTTAATAT
-1764 CAGTTAAATT GAAGATAAAG AGTATTTAAA AAAACTATGT AGTAAAATAC
-1714 ATTTACATT TTTTGTGTAT AATAGTACAT GGTATTCTGT AAGATCACTC
-1664 AAAAATTAAC AAATTAAGTC TAAAAGGGCA GAAAAGACTA TTCAAATATG
-1614 GACTTGGAGA AAGACATTCA GCTTTTTACG CTGAGAAACT TTCATATTGA
-1564 GCCGTGTGTT TGTGTTGTGA AGAGAAGTAA TAAAAAATAA TTTGAAGTGA
-1514 AAAAGGAGAA GAAAAAATAA GATCGTAGAA AGCGTGGATG GTTCTTCTT
-1464 GGGTTCACTG CCATGCGATT ATTA AATTGG CCATGGGGCT AGTGTGTTGAC
-1414 GTACAAAAGT CTAAAAATTG TCAGTCAAAC AGGTCCAAAA CTTTGTAAGA
-1364 AAAATAATAT AATAATAGCA AATTTTCTAA AAATTGTTAA AAAAGAACA
-1314 AAAGGGAAAA GATGAGGATG CAGATGAAAG CAAAATGTCA AACACTAGTT
-1264 TCAGATTTTA TCGGGAACCTG GGGTTTGACA GTTGGTGTAT GTATGTAATG
-1214 GCCTCTCATC AAAACATGTG CATCTTTTTT CTTTTTTGTT ATTTACTGTT
-1164 TTAGCTCTAC GTCTTGTTCCA ATTCCTCTCA AGTAAAATGC CTTTAATATG
-1114 ATACTAATAT ACAAGGGGAC TAATGCTTTT TCCCTTTTCT TATCCTTGTT

```

-1064 TTGTCTAAAT CTTTACTTGG ATTCCTTTAT TTTTCTCCTC TCTTTAGATT
-1014 AGTACGGTTT AAGGAATACC ATCTTTCTAA TTTTAGCACA AAATTGCAAG
-964 TTGGTGCCCC ATCTTAGTAA GCACATCGTA CCACACTTTG ATTGTGTGAG
-914 AGACTTCTTC ATCCCATCTC TCATACCAAA CCTAAATCAA ATGACTAGTG
-864 GTGCAACCTG CTGACTCCAT ATGACCATAA CTAATAAATC GGTTTATGAA
-814 TCCAATCAT GTAGCTCTAT AGAATAGAAA CCCATTCAAT TCACATAATG
-764 AACTGAATCT GACATTTTAT TTACATCATT TACTACTCAA TTTTGTAAAT
-714 AGCAAGATCA TCTTTTTTCAT TATTCAACAA TTTTGATATT CCATAATTTA
-664 TTAAC TTTGT CATAACATCAT AATATTCTGA AATTTTGTTA TATATTGTAC
-614 CGGTTCACG AAATAGAGCT CTATTATTAT AGACCAAACA AACAAAATAT
-564 TATCTTCTTG TGGTTAGTTC GAGAGAGAGG TCAAGAAGAA ACGAAATGGA
-514 TCGGCAAACG GAAGACGTCA AACACACAAC GACGAACATT TTCCGATCAC
-464 CCACCTAATC TCTTCCCATT TTTATTATTT TTCAAACCTC AAATTAATTA
-414 AGAAGAAAAA AACAGAAACA GAGAGAGAAA GAGTTAAGAT GAATAGAGAT
-364 AGAAAGAGTC ATTAAATGTA CGAAGCGACA TTCACAATAA TTCGAAAGGT
-314 GGAAGACGAC TTAGATACGG CCAGGCTTCA CTGTCTCCTC CGTCTCCTC
-264 AATTACCCCT AACCCCTTTT TCCGGGATTC ATCTCCAACC CACATCCTTC
-214 CAAATTCTCA CCCCTCACT GAGTTTTTGC TTTTCTCCT CATCGGAGAT
-164 CGTGAAGACG ATCAAGTAAT TTAAGAATCC CACCATTGAT AAAAGAGTCT
-114 AGCTTTTCTA CTACCAAACC TTTTCTGTG TGGAAATTTT CGATTTTGGA
-64 TTTAACCTT TTCTTACCTT ATTTATAACC ATGCAATCTC ACGACCAACA
-14 ACCCTTCAAT CTCCATG

```

```

>Cax8 Numerierung relativ zum ATG des Gens At5g17850
-2040 ATACCGGTAA GATATCCGGG TATCTAAACC GAGCCATAA ACATCAAAAA
-1990 GGATGGGACG TGACAGTAAT CAATAAATTT GAATTGGACA AATGGATCCA
-1940 TAAAAAAGAT TATGGGCCAA CTTTATCATA ATGAATGCC ATCATCAATT
-1890 ATTTTTGGGA CATCTTTTTG GAGTCAGCCT CTTGTCTAAA GGTGGACGTC
-1840 GGCTAAAAGT GTTCACTTTT AAGATATTTT AGCTCCAATT AAAAAGAGTG
-1790 TTTTAAAAA AACAATCAGA CACTAGTCTA CAACTTTATA TGTTAAGGCA
-1740 TAAGTTTAAA TGATAGCTAA CAATATATAG ATTAAAGGAT TTGTTGGTTT
-1690 GATGTTAGAT AGTATCTGAT CTCCATGAGT AAACGAAGAT TTTTATATCA
-1640 ACTAGAAAAG GTAAAAACAA ATATCACCGT CGAAGGGGAC GTACACGTAC
-1590 GTGCTGATTC TTGTGTTAAT GGATCGCTTC TACTCACTTA GCTCTCAAGC
-1540 AATGAATAAC ATCACAAAAT AAATGCAAAG ATGTAAACAA AAGTAAAGAA
-1490 AAACAAAACG CGTTTGAAGA CCGCGTTGCT CTAAATGACT CGGTACTTTT
-1440 TTAATATTTG CAATTCACAC TCGTAATAAG TCCTCTTATC TTTATATTTT
-1390 GTTCGATTTT ATTTGAAAAA TTCCCTAAAT ATTTTTACAA AAATCGTGTC
-1340 CTAAATCCTA ATCCTTCGAC CGACTTTCTC GTTTTAGTAG TAAAAGTCGA
-1290 CCACACTTTT TTTTCTTTTC TTTATTCACT CGACCTCATT ATACAATTAT
-1240 CTTTGTGTGA CTGTGTGGAG TATACTATTA GTTTCCTCAT TATTAACTTT
-1190 ATCTTGTCAC ACTATACTTT CTTTTTATAT TAGCTTCTTC TACTTGTTTC
-1140 TTTCTGTCTT TTCTTTTTTG GAACCTTCTC TTTATGATCG TGGCTGTCTC
-1090 AATCTATTTG GAAATTCAAT ATCCATGTAT ACTTATTTCT TAAAATACGT
-1040 TCGAATTAAG ATGTTTCAGC TTATATAAAG GAAGTAATTT TGAGCTAATA
-990 GAAAGCCAAA TTATTGAATT AATTTTCTCT TAATTACATT TCAAGTTATT
-940 CTGCCTTGTG TAAACTGGAA GTAACAGAAT AAAGGCGGTG GTTGTGGTTT
-890 ATACTCAATT ACCAATAACT ATTTCACAACT TAATAAAAT AGATTAAAT
-840 GACTGTTATA GATTAGAGTT TTACTTGTTG GAATAAACAA ACATCAATTC
-790 AGTACTGACC ACATCCTTTA AATTAGTTTC TTATATGTAA GTTAACCTTA
-740 AACCGGTAAC TGATTACGAA CCAAACCGGA ATATTTATAT TATTTTTTCC
-690 ATAGTTAGTG GCTTAAGGAA TCAGCACTAA ATACTAAATA TTGCTGGGTC
-640 AGCTCCTTAT AGTAATATTT AATTTGTGGA AAAAGCTTCT AAATTTATGT
-590 ATCCTTTTCG TAACCCTCCC TCCTTCGTCT TCCTATTCTT CGCATAAGTA
-540 ATGGAAAGAG AAAATGACGC ACAGTTCATC GTGAAGCCGA CACATAAGCC
-490 ATTTCCAAAA CCCAAATCAC CCTAACCCCA AAACGGCAAT GACAAAGTGA

```

```

-440    CAAACTTTTT    TCAGATTCTT    TATATAAAAA    AATAGTATTC    CTCATCCTC
-390    TGTTTTTTTTT    TGTCTCTGAC    GTTTGTCTTC    GTCAGGTCTT    GTTAAAGTGT
-340    TTGTTTTGTG    TGTTTGTGGG    TGTTTTCTTC    GCTTCGTCTC    CTTTAAAAGC
-290    TTCGTTTCGA    AATTCGATCC    CTTTTTGTCT    TTTTCATCTT    CCAGATATTA
-240    AAAAAGGTCA    GTGCTTTATC    TTTCTCTTTC    CGCGTATAGT    TCGTGTTTAT
-190    CTAATCTGTT    TTCTTCATGA    TCTGTTCTTA    TGGAGTAAAC    CCATTTATAG
-140    ATTCTCAACA    ATAAACCCAA    ATATCTTCTT    TTTCAATTTG    ACTCTCTGAT
-90     AAAAAACCAA    ACTTTATCTG    TTTCTTCGTT    TGCTCTGTTT    TGATTTGTTT
-40     CTTTTCGTTT    TTTGTTGAGT    TTCCAGGCTT    TAGCTGATTG    ATGGGATTTT
+11     C

```

>JR11-2 Numerierung relativ zum ATG des Gens At5g10300

```

-1     ATGTCTCCGT AGACGTTTTT TTTTTGGTTA AGGTTCTTTG CTTGTTTGAG
-51    AATAGCGTGA TAAAGTTGGG ATATGAGTAT GACGTTATTA TTATATAGTG
-101   ATAGTGGGAT AAGGTTTATA TACGTTACGC TGTTAATAAC TTCTTATGTT
-151   ATGACACATG TTCAGATTTA CTAGTCTCCT CGGTCGGCTG TTGTATACTT
-201   TTGTATACTT GTATTTAGAT ATATTTTAAA TAAATAAAGC AGAATTCCTGT
-251   AATCACACTT AGCTAAATTA CATTAATTTT TTTGGACATT TAAAAAATA
-301   TATGAGTACA TCACAGTTTC AATCTAATAA CGGACCAACA CATGTAAGAT
-351   TTTGACATCC GCGATTAGAT GGACGTAAAA AAGGCTTAAT TAACGGAACT
-401   AATTGAACAC GATAAACACG TGCCTGTTAA GTGTTAACCG ACCTAATCTT
-451   CATATTGATC TGAGAATCTT CACAGCTTCC CTTCTTCTT TGAGTCTAGC
-501   CGGCCCATGG GCCGTGAAAC ACTGTGACTG TGACTCTCTT TTATTGACTC
-551   ATTTTAACCT TTTCCTTTTG CTTTTTGGTA CCAATTTTTA ACTTTTCTT
-601   TGTACAGGGA GATTCGCTTC CTTTTTTTAG GCTGGCCATT TCGTCTTAGT
-651   GAGTGGTGTA TAGTTGGCCA TTTTCAGTCAG CTGTATTATA GCCTCATTGT
-701   CAATGATGTC GAAAATCATT CCTCAATTTA CACAATGGTT GTCAGGTAAA
-751   AAACAACGAG AGTTGATAAG TAGATTTAGG AGGGAAAAAA GAAAAAGACA
-801   ATTTAGTTAG TCTTCTTTTA CATCCACGTA ATTAAATAGC ACATCGTTCC
-851   AAACATCATT ATCAAAGTTC ATTAGTTATT TAGGGAAATT ACAAGTTGCA
-901   CGGAGAAAAA GCAGTTCGTG GACCAACATT GGACTTTTCT TTCAGACAAA
-951   GGCCATTAGC GAGCGAGAGT GATAATTGCG AAATTGCCAA AAAACGCAA
-1001  GTCTACCACT AGACAAGAAA ATCGAAGCTT TTTACTTTCT CTTTTTTTCT

```

>JR11-2; Numerierung relativ zum ATG des Gens At5g10290

```

-1513  ATGTCTCCGT AGACGTTTTT TTTTTGGTTA AGGTTCTTTG CTTGTTTGAG
-1463  AATAGCGTGA TAAAGTTGGG ATATGAGTAT GACGTTATTA TTATATAGTG
-1413  ATAGTGGGAT AAGGTTTATA TACGTTACGC TGTTAATAAC TTCTTATGTT
-1363  ATGACACATG TTCAGATTTA CTAGTCTCCT CGGTCGGCTG TTGTATACTT
-1313  TTGTATACTT GTATTTAGAT ATATTTTAAA TAAATAAAGC AGAATTCCTGT
-1263  AATCACACTT AGCTAAATTA CATTAATTTT TTTGGACATT TAAAAAATA
-1213  TATGAGTACA TCACAGTTTC AATCTAATAA CGGACCAACA CATGTAAGAT
-1163  TTTGACATCC GCGATTAGAT GGACGTAAAA AAGGCTTAAT TAACGGAACT
-1113  AATTGAACAC GATAAACACG TGCCTGTTAA GTGTTAACCG ACCTAATCTT
-1063  CATATTGATC TGAGAATCTT CACAGCTTCC CTTCTTCTT TGAGTCTAGC
-1013  CGGCCCATGG GCCGTGAAAC ACTGTGACTG TGACTCTCTT TTATTGACTC
-963   ATTTTAACCT TTTCCTTTTG CTTTTTGGTA CCAATTTTTA ACTTTTCTT
-913   TGTACAGGGA GATTCGCTTC CTTTTTTTAG GCTGGCCATT TCGTCTTAGT
-863   GAGTGGTGTA TAGTTGGCCA TTTTCAGTCAG CTGTATTATA GCCTCATTGT
-813   CAATGATGTC GAAAATCATT CCTCAATTTA CACAATGGTT GTCAGGTAAA
-763   AAACAACGAG AGTTGATAAG TAGATTTAGG AGGGAAAAAA GAAAAAGACA
-713   ATTTAGTTAG TCTTCTTTTA CATCCACGTA ATTAAATAGC ACATCGTTCC
-663   AAACATCATT ATCAAAGTTC ATTAGTTATT TAGGGAAATT ACAAGTTGCA
-613   CGGAGAAAAA GCAGTTCGTG GACCAACATT GGACTTTTCT TTCAGACAAA
-564   GGCCATTAGC GAGCGAGAGT GATAATTGCG AAATTGCCAA AAAACGCAA
-513   GTCTACCACT AGACAAGAAA ATCGAAGCTT TTTACTTTCT CTTTTTTTCT

```

```

-463      GTTTTGTTGT  CTTTGTTCT  ACTCTCCGCA  CTGAATCTTT  CGATCAGCGA
-413      TAATTGTTTC  CTTCTTTTGG  GATTTTCTCC  TTGGGTACGA  GGTTCCTTCC
-363      TTCTTTTATT  TGCTCTGTTT  TTGAGATTTG  GAATTGTTAT  CAAGTCTGAC
-313      AAAATTGGTC  ACTAATCTTT  CTGGGAAATT  GAGCATGTTT  GTGTTCTTGC
-263      ATCCGTTTGA  CTCTTTTTCT  ATGCAAAGTC  TCAACCTTTC  AATAGTGGAA
-213      TTTATTCTTA  TCCCTAATTT  CTCTTTACCA  GACCTATTTT  TAGCTAAGTT
-163      TGGTTGAATT  TAGAAAGTCT  TTGATTACATA  GTTGAAGAGA  TTCTCTCCAT
-113      TAATCTTTCT  CTGTAATGTG  TCAGATCCAC  TAAAAGTAAG  TAAGAAAAAG
-63       ATTTTGTGTG  AATGTTATTA  AATGTGTCTT  TGTAGATGGA  ACCAGCTCAA
-13      TTAATGAGAT  GAGATG

```

```

>Shaggy;  Numerierung relativ zum ATG des Gens At4g00720
-2733      TCAAGACTGG  CGCGTGCGTG  TGTTTCTTTT  TCTTAATGAA  TTGTGAATTT
-2683      TTATATAACT  TGTTTTTTTG  GTCTTGTAAT  ATGGGAGGGA  GGGGGTGTCTG
-2633      AGTCAAGAAC  GAACCGCGCG  AGTGGGCGAG  ATCCAACCTCC  TTTGTCACCG
-2583      TGATGGGACA  ACGACGTAAA  AGGGTTCCGGG  TCCGATCACG  GTGGAGGAGT
-2533      TGGTGGTTCT  GGTATTGACT  GGGGTTTGGG  AACCCCTCT  TTACTCTTTT
-2483      TGTTTGTGTT  TGTTATTTTT  ATTATGTAGC  GCGAGTAAGC  CACACGCGTG
-2433      GGGTGTGTTG  TGGTTAGAAA  ACGCGAACTG  TGAGATGATG  ATGTTATGTT
-2383      GGATGGGATC  TGTATCGTTT  CAAGTTAAAA  AAAAAAAAAA  AGCTGTCTCT
-2333      CGTGGAGCAT  TAAATGTATT  TTGCAGGCAT  ATTCATTCAT  TTAATGCTAT
-2283      ACCTTGCTCT  CTCCTTTTGC  ATGATATGGG  GCTTACGTAT  TCCGCCATTT
-2233      TCGTTGCGCC  ACGTCATTCC  CTTGACAGAC  TGGTGCATG  AACCAGACGT
-2183      TACGCCGTCG  TTTTCTCCNC  TTCTGTTTGT  TTGGTTCTTT  TCTCTTCTC
-2133      AATATGTTGT  TTTTAAGTTG  CAGACAGGAA  AAGAAAAACG  TAAGCAAGTG
-2083      AATTTAAATA  GCTGTACGGT  GGTGGGCTTT  ATTTTAAAGC  CCTGGCCCGT
-2033      TATGGCTAAT  GATTCCTAGA  TCTTATAACA  TTAATTGGGC  CTACAACAAT
-1983      ATCATGTGCC  ATTATTTATC  CGTTCATTTT  GCAAAGACTT  TAGATTGATA
-1933      CTGCACTAAT  AAGCCCATAA  GGCAAGTGAA  AAATGTCATT  TAATCCCCCA
-1883      ACTTTCAAAA  AATGGTCATT  TTATATATCA  ACTTCGTATG  TGGCCGTTTA
-1833      AAACATGAAC  TAAAGTTTGA  CTAATTTTTT  AAACATGATC  TTTTCGTTGAC
-1783      CAGACTAAAA  TAGACATGCC  GTTATCAGTC  ATTAACGGAA  CTTCTAATGT
-1733      CCGTTATCAT  CCGTTAATTT  TATTAGTCAA  GTTTCAAATT  GTGGCCATTT
-1683      TAAACATCAA  CTCCTTATTT  GGCCATTTAA  AACATGAAGT  AAACGTTGAC
-1633      TACCATTTAA  GACATGAAAA  ATTCGTTGAC  CAGGCCAAAA  TAGACATGTC
-1583      TTTATCAGTA  GAACCTAGAA  ACTCGTTAAT  GACTGCTAAT  CTATCCAAAA
-1533      CAACGTCGTT  TGAGAATAAT  CGAAAGAACA  TAAAGATTTT  TTCCATATGA
-1483      AATTTCCATA  TCAAAAAGTT  TTAAGCAGAA  CCCAAGAACA  TAGTTTGATA
-1433      TAGAGATAAC  CGCAGTGCCA  GTAATTGGAA  GCAAATAAAG  GTGTTTTCGT
-1383      TTATATATTT  GTTTTAAATT  TAAAAGGAA  TCATGGAAGC  AAATTGAAGA
-1333      CTCATTATAA  GATTGTTCTG  CTTGTTTGG  CGGTTGTAGA  AATAGATTTG
-1283      GGGAACTGGA  GTTTCATTTA  GAAAACAATC  CTGATTTTCT  TTGGATTATT
-1233      CTCAAAACAA  AGTCATTTTA  GGGATACTAA  TAGAGTCGTT  AACAAGTGAT
-1183      AATGAATGTT  ATAAGTTCTT  TTAATGAATG  ATGACAACAT  GTTTATTTTG
-1133      GCTTGGTCAA  CGAATTTCTC  ATGTTTTAAA  TGGTAGTTAA  CTCTTAGTTC
-1083      ATGTTTAAAA  TGGCCACATA  TAAAGTCGAT  GTTTAAAATG  ACCACAATTT
-1033      AAAACTTGAC  TAATAAAGTC  GTTAACGGAT  GATAACAGAA  GTTAGAAGTT
-983      CCGTTAATGA  CTGATAACGG  CATGTCTATT  TTGGCCTGGT  TAACGAATAA
-933      TCATGTTTTA  AAAGTTAGTT  AACGTTTAGT  TCATGTTTTA  AACGGCAGCA
-883      TACGAAGTTG  ACGTATAAAA  TGACCATTTT  TTGAAAGTTG  GGGGATTAAT
-833      TGACATCTTT  TCCCATAAGA  CAATGGTTCA  ATCAGTAATA  ACCACATCCT
-783      CATTAACATT  CCTCAGATAG  TAAACTAACC  AATATATGTT  TTATTTTACT
-733      TCGTTTCTCA  ATCTAATAGA  TTACTTGAAT  TGTTTATAGA  TTACCTCATA
-683      GGATGATGAT  AATTAATAGT  TAAAATTTT  GAACAGAGAC  ATTATTAATA
-633      ATGTCTAAAA  ACAGTAAGAA  ATTACTAAAA  TTATCTGTTG  CAGGAGCAAA
-583      AAGAGGGAAG  TGGTCAAAGA  TGGTCAAATG  AAAATAATAC  AGTGCCCGCA
-533      TATTCGCGT  GGGCTTAGAT  GCAATCATTC  AAAACCCCA  AATCCTTTTG

```

```

-483   CCTAATCCCG  GGATACGTAA  ATAGACAAAC  AATACAGGGG  TACTTTAGTA
-433   ATCACAGCTT  GTCGAAATCG  GGCGGATTCA  TCCTAACCCG  TCGGATGAGC
-383   TGCTGCGATA  AATCAACGGT  GAGGAGTCAA  TGTTTGACCA  AAAAAAGAGT
-333   AGAGAGAGAT  AGAGAAAGAG  AACGAGGCTG  GCATGATTGG  CTTTGCCAC
-283   GAGAGAGAGA  GAAAGATTCC  ACCTGGGTG  GGTCGTGAAG  AAAGAGAAGA
-233   AGAAACCGAA  GAAGCTCGAA  GAAGAACGAA  GGAGATTCTT  CCTTTCCCA
-183   GATTTTTCGT  TTGAAGAAGA  ATCGAAAAAC  TTAGATTTTT  GGTTTTGCTT
-133   TCGGAGTTAT  TCGAATTTGA  AATATCTGAA  TCTGTTGATT  CATTTATTCT
-83    CCGCATGAAG  CTGTGTTGGT  GAAGTTTTTC  GGAGATTTAG  GGTTTCTGAG
-33    TTGTTCTCG  TTTGGTTGGT  GAATAAAGCG  AAGATG

```

```

>An12   Numerierung relativ zum ATG des Gens At4g00730
-2000   GAGATCTTCG  AGTCATGTTG  ACCTTTACGA  CTTCAACTCA  TATTTGTCCT
-1950   TTCAAAATTT  GTCATGGCCA  TATTGTTGTC  TCATGGAGAA  ACACCTTTGA
-1900   GCCAACAGTC  GGAAAACAAC  CATCACTTAG  CTTTTTTTTTA  TTTTTAATAC
-1850   TACTATTTTT  TTTTTTGTA  TTAGTCGAGT  GTACCAATCC  CAAATTTAAT
-1800   GGGTATCTTT  CATAACCAA  AAGAAAAAAG  CACAAAAACA  AAATACTACT
-1750   ACTATACTAT  AATGGTGAAA  CACACATTAC  ATTAGCATT  ACCGCTATTC
-1700   CTTAAAAGAT  ATATGAGCAG  ACTACAAGGA  AGTACATTTA  AATCAGTGTG
-1650   CTAAGTTTTC  TCAATTATCA  ATCTAATAAT  TGTACTTACA  TAAATTTACC
-1600   AAATCATCTC  ACCATTTAGG  GCATACAATT  TTTGCTCAAT  AATGGAGCTT
-1550   GAAAAGACTA  ATTATAGAAT  GTCTTTTTTG  TTGACACAAG  CTCGCTTCTT
-1500   CATGTCGTTT  ACTTTAAAA  TTGTAGATTC  TTTACAAC  TATAAGATTC
-1450   TATAGCCTAT  TTGATTATCC  TTTAGGATGA  TGAGTATAAT  ATCTCAAAC  T
-1400   ATAAAATAAA  AATGTTTACA  TCAATAATTG  AAAAAAATG  CATGTATGAA
-1350   TTCACGAAAA  TATGGTTACG  GTTGTGTGTT  GCTGCTAGAC  AAAAGTCTTT
-1300   CATATATTCA  GTTATATTT  TTTAAACTAA  TCAAAATTGT  TTTATGCAAT
-1250   TTTGGCGAGT  AGAGAGAAAA  AGCGCGTGGG  ATAAATAAAG  AAAGGCGTTA
-1200   TAAAAAAGA  GAAAAAGTCA  ACCGAGTAGT  TCTGGTAAGA  GAGTCTCGTG
-1150   CATTCGTAAG  GTTTCCAAGA  GTCCACATAT  CTATTTTCATC  ATCCTCTTAA
-1100   CGTTTTTCTC  ACTTACTTTT  TTCCCCACTC  TTAATTGATT  CCGTTGATAA
-1050   AATTTGTTTCG  TTATATAGAA  ATAATCAGAA  TATAATTAGG  GTTAATTTTG
-1000   GAGTAAAGAC  CATTCAATCA  ATGGTTTGGC  TTGATTCTTG  TTTGAAATTC
-950    TATGTTTTAAA  AAGGGTAATA  CTTACAAACT  TGACTTTATT  AGTATTTTAA
-900    AAAATGACAA  AACTTAAAT  GGATTTGAAA  TCTAGCATAT  TTAACTTTAA
-850    TACAGTTTTG  GTTTAAGTTT  CACTCTCTTT  TCTATCAAAA  ATATAATTTT
-800    AAAATTTGAA  AGATGTTAAA  ATAGACAAAT  GTCATTAGTT  TGTTTCAGATT
-750    TAGTTATGTT  TTTAATATAC  AGACAATTAT  ATTAATAA  TAATAAAAAA
-700    GTCAGATCAG  TTATAAAGA  AAGTCAGTTC  AGTTTTAAGA  CTTAAGTTTG
-650    AGCTTTTTGG  ATTTGAATTT  AATAGATTCA  CTTTTATTAA  AAATTGTTGA
-600    AACACTTTTT  AAAAATAAA  ACATTTGTCA  AAAAATGCAT  TTAACCAAAA
-550    AAATGAAAT  GAAAGGTAGT  AAGTAATAAA  AGAAGAAAAC  AAAATCTAAA
-500    AAAGTGTCTT  TAAAATCTCA  AAATTAATAA  ATACAAAAAA  GTACAAGAAA
-450    ATAAAAGAAA  AGGGGGAAAA  AGAGAGTCAA  TATCAACATG  CAAGTGTGAA
-400    TATTAGACTC  TTCTTCTCTC  ATCAGTTACC  CAAAACACTAG  GGTTTACCCA
-350    TTTTCATCAT  CTTCTTCTTC  CCCACATCAC  TCTCTGAAAG  ACAATAAGAG
-300    AGAGAGACAC  ACACACCAA  AAAAAAACC  CATTGATTTT  TAAGAGAGAG
-250    AGAGAGACTG  AGAACGAAGA  GCAATGAGA  GAGAAGTTGA  ATCAAATTT  C
-200    CGCTTTCGTT  CTCTTCTCT  CTCCTCCATT  TCAGTAATAA  ACACTCCTTC
-150    CTCTTTAATT  TTTCTGGGT  TCTTCTTCT  CCCTCTTTG  TTGTTTCTGT
-100    GTGATTAGT  TCTCGATCCA  TCTTTTCGTG  AAAAGTATCA  ATCTTTAAT
-50    TCTCTAGTTG  TTTGTCAAA  CTGGTTAGTT  TCTTCTCTG  TATTTATTTG
+3     ATG

```

```

>Kan1   Numerierung relativ zum ATG des Gens At5g16560
-5205   CCGACGTACG  TTCGTGTCCA  TGCATTATAT  TATCACACGT  TTAAGAGATC
-5155   CATCTACTCT  GCAATTTATT  CAGATTTAGT  AATTACGCTT  TTCCTTAATA

```

-5105 AACGAGAATT ATTGTATACC AACATTTTCAT TTTTATTCTC CAGTATTTTT
-5055 TATTCTAAAT TTTCTTTTAA ACTTTGATAG CTCGAATTTT GCTATAAATT
-5005 TTTCAAACA TAAAAAAGC ATTAATCTCG ATGCTTAAAT TTATGAATCC
-4955 TAAACCGTTG TTTGGATGTA TGACATTAAG TAAGCTATAA ATTCAAAGTT
-4905 TTTTTTTTTT CCATTAGTTC ATTAGTTCAG AATTAAGAAT AACATCAATT
-4855 TTTCATTAGC AAATTGCGCA TGTAGATTCT TTCATGCATT TAAACATGTT
-4805 TGTGTGTTAC CACAACACCT AGGATCATGC ATTCGATTTT TAATACAATT
-4755 ACACAAATA CAATTTAGAT GAAGAAACCA AATGATATTT CTCTAAATCA
-4705 ACATCTCAA CTATGAAAAC TAATTAATG GCATTCTTTT CCATCTTAAT
-4655 GTGACCTCAC CGTTCATTC CACATATAAT AATAATAATA ATAATTTT CAG
-4605 TTACACAATT TCACAATGCT ACTAATATAA ATCACTGTAT TAGCAAAGAT
-4555 CAATGATATG ATTTTCTATA TGTGTTCAA GTAATTCAAG TTTTAATTAA
-4505 GCAACCATAA GAAAACTCG CTTTTTATAA TATAATTTTT GCAAGAAGTT
-4455 TTTTTTTTCT AAAGTTTCGC AAGACTTGTT ATAAATAATA TAATGGAACC
-4405 ATATATATTT TGC GTTAAAT TCCAATCTAA TTGACAATAG TCAAAACCAT
-4355 TAAATTAATA CGAAATACAC GTAGCAAAAA GCATAGGGAA AAATATATAA
-4305 ACTCATAAGA CACATGCA TATGATGGAC CTACATTAAC TATCTCTCTA
-4255 AAGTTAGCAA CTAATCAGTG GAAGACACGT GGGTATTAAT TTGGTAGGAA
-4205 AATAATAGAG ATCCTGCTAT TAAAATTATA TATGTTTTTCT TAAAGAAAGT
-4155 TAAACTAAGC CTTTTTTATC AATTTTCTGT ATGACCATTC ATTATGGCCT
-4105 AGTTCCATAT ATAATGCATA TATATTTGGC ATATATCTGC CTTTTGTACA
-4055 AGGAATATCA ATTTAACTTC TTATTAGACA AGTGGTCTAC TCTATTTTTT
-4005 TTTGTTTTCT TGTTCGTAGT CGTAGGAGAC TAATCTGCTT TATATTTTCT
-3955 TCGAACGTTT CTTTTGATAT AATTTTAAAA TGTTTTATTT AATTTGCTTA
-3905 TAACTTTATA AAGTTTATTA CACTAATCTT CATAATAAAA GTTTAGTTTT
-3855 TATATGATGA AAACACAAAT GGAAAAGAGA AGAGACTAAA GTTTCGGTCC
-3805 AAAATCTAAA TCATAAAATT ATGATATATT TCACTTCAA CTCTATTTAA
-3755 CTGAAACTGA ATTATACTAC AATTATAAAA TATTAATAAT TTGCATAGAA
-3705 AATAATTCAC ATAATGATAT TACAATTTTCT TTAGTAAACT AATTATATCA
-3655 AATGTTAAGT TTACAAATAA TTACAAAAAA GTGACTTTTT TCTTTTTAAT
-3605 TACTTTCACA TATTTTCATCA TAAACAAAAA AGACCAACAC AAACAAATTA
-3555 CCCCCACCC CCACCCACC ACACACACAC ACATATATAT ATATGTAAAA
-3505 TTTATTTAAA ACTTTTTTAG ATCTAATTAT CTACAAATAT CATTATAAAA
-3455 ATTAAGTTAT AACATAATCA AAGTCGTAAT ATTCAAATTC GTCCTAATCT
-3405 TGGAAAGTAT TTTCATTCAT CGACTTTGAA ATCGTTTAAA CAAATATTCT
-3355 GATAATCTGT TTAAACCAA ACTCCTAAAA TACTCTTCTT TTTTTTCTTG
-3305 ACAAACAAC TTCAAACAC TAAAAACATG ACTTTCTTGA CAATTATACT
-3255 TTACTGCAAC GCCCAACCAT AGTGACAACA TAATTTTGAC TATCATAACC
-3205 ATTCAAAACA ATTGTTTTCCG TAGAACAAAA CATTCAATTT TTTTATAACT
-3155 ACGACTTTAT ATTTTATCCG CTGCGTAAAT TTAATATTTT TTGGATTTTT
-3105 TCTGGAGATA GAGAATTTGA TAACGGAAAG AATAAAACAT TAGAGCCAAA
-3055 GTAAAGCTTA TGTCCTTCGA GAAATTAATG GGGCACAGAA TCCGATCAA
-3005 CGTCAATAAC TAAGCCAAA ATCAAGCTTC GTTGCTCTCT AGTTTCAATG
-2955 TTCCTTTAAT TAACTAAACA GAAAAGGTT TAGTTCCCAA TATAGGAATT
-2905 CATGGATCAG CTAATAGTTT AATACTACTA CTTCTGTACT ACTGTTAATT
-2855 AATGACAATC CTTTGGGTAA GCCTAGGGGT TTTAAAAAAA AAAAAACATT
-2805 TTTCAAAGT ATAAATGTAG CTCGTTGAGG GACTCATTC AAAAAACGAAA
-2755 ATATGAGTAC ATTGCTAGGT TTGGAATATA GGAGTTAATG AACTCAATTC
-2705 CTTGTACCAT TAACTAAAGA TAAAAGAAAT TAAGTGTATC CTAGGAGTTT
-2655 TAGAAACCTA ACTCAAATTT AGGAATGGAC CTCATTCAA AACGTTAGAA
-2605 GTATAGCTAG GGTTGTTATA CTGTTTTTGA TTGAAAATGC TTTTAAATA
-2555 GATCATAATA GTATCTTGTT TAACTCACAT GCAGCAAAAC GTCTAAAAAC
-2505 TGCAAGCATA CTGTACTTCT TTACTTTCCA ATAATTAATA TTTATATCTA
-2455 ATAAGAAAA TATATATTAC TGTATAATCA ACGAATAAAA TCTCACTTAT
-2405 TTAAATTTCC TGATATATAA ACATAGTCTT ACAATTTATC ATATTTTTAT
-2355 TTCAAGGCAT TAATGATTTG TCGAGATGTT GTATTGATAT GGTCAATGTA

-2305 GGAGTGAATA GTTTATTTTT TTTCTTAGAA GACAATTTAA AGAAAATTAG
 -2255 AAAAGAGTTA TTAAATTGAG AAGGAATATT TGGGAGAATG AAAAGGGAAT
 -2205 TAGAAGCAAA TATTTAGGTT CTTTAGGGTT CACTTGTTTT TGTTTATTAA
 -2155 GGGAAACAAA CAAAATCCAC TTTCTGGCTG AGTATTTTCT TAGGTCTAAT
 -2105 ATATATTTAA CTTCACGTAT AATCTAAAAG CATGCATGTT ACGTTACAAT
 -2055 AATTGATCGA ATTCCTTTATA TGACACTTGG TTTATATACG TACGAGGGCA
 -2005 CCTTGTATTG TACACACGTA TGCATATATG TATGTATTTG AAGAGAAAGA
 -1955 TACTTTCTAA GACAATAATT TCCGTACCTT TGGAAGGCAA AACACAGAGT
 -1905 TTATATATTC CAAATTAATA GTGGGATAAA AAAATATAAT AATTCTTTGA
 -1855 CAAAAACATA CGAATAGTTA AATACTATTC AATTTTGTAT ATTTTTCATT
 -1805 ATTTTTCAGT ATGACATATT TCTGTTTCAC AGTAGATAAA GTCAACTCCA
 -1755 TAATTTTTTT TGTAGAATTA TAAACGAACA ATGTGAATGT AAAAAATGTCG
 -1705 AGTACAAAGA AAACAGAAAC ACTAGAATGC ATACATTATT ACATTGACA
 -1655 CAAACAAGTC AAAAATATAT ATAAATCTGC CTAATTTTAT TTCTTTTCAA
 -1605 GTACGTATTT TAAAGCGACA TGTATATGAC TTCGATTTGG CTCTAATTGA
 -1555 TAGACAACAC AAAACGGTCA AACAAGTAGC CGGTTGATAT TGTAGTCACA
 -1505 TCTCTAGGAA CTAAATGTCT ATACGAGCTA TTCATAAACT CAAGAACGTA
 -1455 CTGATATTTA ATGTATATTT ATCTCTTTAG GTATAGTTGA ACAATCTACG
 -1405 GTCAGAAACT TGAATTTGTT TGATTCCAAA ATCGTATAAG GAATTATTAT
 -1355 AATAAGATGT GAATAGAGAG TGAAGTGAGA AGCGAAGAGA GTGGGGGAGA
 -1305 AAATAAAAAA GGAGTCAGAG AGGACACAGT CTCTTTCTCT CTCTCAAGTC
 -1255 TCAACATATG TATCCCGTCG TCTCCGGGGT ACCAAAATCA AAGCACTCTC
 -1205 TCTTTTTTTA TTTTATTTTT TTTTGGTTAT AATGAACTT TTTATTTATT
 -1155 TTAGAATAGG TCTTGTGTTT GTTTTTTTCT TCTTGTATT TATTTATTTA
 -1105 ATTTAATTTT GGCTTTTGCT TTGACTATAG ATTAGATAGG ACAGAAGAGA
 -1055 GCGACCCTTT ATTCTCTCTC CTCTTGTACT CTTCTCCAAC ATTTTAAATT
 -1005 ATTATTCTTC ATGATAATCT GTGAACATTA TTATTTTAAA GATCAATTGA
 -955 GTTTTTGATT TATTACTCAA ATTGTTAAGG TTTTAAATGGA TGATAATCGT
 -905 ATTAATTTTT ATTGTTAAAA GTTGTATGCT TTTTATCTAT GAAATGGTC
 -855 GATTATTAAA TACACTTTAC ATTTGAAAAA TTCATCTACT AAATTGATAG
 -805 AAAACAAGAT TTATTTTGCT ATTATTCTTC AACTTTATCT ATGGAAATCA
 -755 AAATTTTCTAGT AGTTTAAACG AATAAACTAA AACATGAAAT CAATTAATCT
 -705 AGCCGTAATA TAATTTATAT TATATTGATA GATGGGTTTA CTTGTTGAAA
 -655 GGTGAAAAAG ACAAATTGAA ATACCATCC AAAATAAAAT AAAAAGCTTC
 -605 CAATATTTGG AATATAGCGA ATGACAATAT TACCCTTTCT CAACTATCGT
 -555 TTTCCAAGAT TACTCTCGA GGAACAACAT CTCACACATA CACATACACA
 -505 TACATGTACA TGAACGAACA CACATATATC TCTCTCTCTT ACCTGTTTTT
 -455 AATTTTCCTG GATTTAGTTT TATTCCTTTT TTCTCTTCTG CCTTTGCTTC
 -405 ACAACACACA TACCTCTCTC TATCTCTCTC TTCCTTCTTT TTCTCTCTCT
 -355 CTGCGTCTTA CTTTGAGCAT GTTTGTTTCT TCAAGAAGAT CATCACTCAA
 -305 CTTCTCTCTC TTCTTCTAAG CTTCTCTTTA ACTTCATCTC TCTCACTTTC
 -255 TCCTTTCTTT CTGAGATATA GAGAGAGAAA GAGAACAAAA AAAATATCAA
 -205 ATCTTTCAGA CACCCTTTTG ACTTCTTTGC CTAAAGAATC TCTCTGCTTT
 -155 CTCTTCTCCT TAGAGAAAAT CATTTTAAAT TCCTAAGCAA AACCCAGGA
 -105 GAAAAAATAA ACAAAGAAT AGTCATCATC ATCATACCA TCATCATCCT
 -55 TATCATCATC ACAACTTCA GTGGCAGCAA TAGCAAGAGA AAGGTTTCTT
 -5 TAATTATG

>19960/50 Numerierung relativ zum ATG des Gens At5g16560
 -6807 CTAGAAGGTG AAACCAACAT TCTTTGCATT TCTTTTATTA ATATTGTTTA
 -6757 TACTTCGCTG TTTGTTAGAA ATTACACTAC AATCAAATAG TAGACTCAAT
 -6707 CATAATTAAT ACACAAAAAG TGAGCACATA TGATTTTTTAT ATATAATTAA
 -6657 GCAAAATTTA GATTTTTTTC CTTTCTAAAG AAATATCATT AAAAAATAAA
 -6607 TATTTATAAT AGCTAAGAAA AAAATCAGTG CTAGAATTTT TATGTTTATT
 -6557 AAGATACCAC ACAAGAAAAC ACTTTTTTCAA AACCCCTCGA TAGGGTCGAT
 -6507 TATTTCTTAT ATTCTCTTAA ATCATTCTCT CTTTCTCTCT CTCAATAAGA

-6457 AAAATGAGCA AATGTTTATT TCAGTCGAAA GTTTTTTTTT TTTTTTTTCT
-6407 CTCTAATGTG TAGGACAATT TTTCCATAAT GGTAACAGAA TGCAAGAAAC
-6357 ATATGGGTCC ATTACGAAAA GATAAATTAA TATTCAACAT ACATATAGAC
-6307 AGAGGACGAC AGCTGGTTTA TTAGGCAGCT ATATGAGTCT TGCCTTTTGC
-6257 CCTACTTGAA TAATTTTCAC TAAACACACT CTTTATTTAT TTTGTGATC
-6207 TTTATAACAA GAATTTATTT TGAAATCGAA ATTCGTAATG AATTTCCGAT
-6157 CTACAACACT CAAAATAAAT AATACACTAC TTAAGTATAA TTGTATCATG
-6107 TATCCAAATA CTTAGACGTT TATAAAATCT CCCAGTGGAT GAAAAAAAAA
-6057 AAGAAAAAAT CTCCCAGTTT TCAAATTCOA CAAACCCTAC CAAAACCAAG
-6007 CTTCTAAACC CTATCCTAAA TTAGTGTGCA TAAAAGAACA TCTAGCAAGC
-5957 TTATTTGATA TATATATCCC AACTAAATTT TCAAAATAGA ACCACATCTA
-5907 GAAATTGTAT AGAAATATAA GTATATTTGT TATTCAGTAC TGCATTTAAA
-5857 TAGAGGAATC AGTTTTTTAA AGCATCTAAA AACTTAATGG AGTTTTTGTT
-5807 TAATTCAGTT TCCAATTCTG ATTTGAATGT ATTTGTTGATC AATAATAATG
-5757 AGAATATATA TGGTTGATTG TTTTTAAATA TAGCCATCAT AGTTTGTTC
-5707 ATTTTTAGAG AAAACAAGTA TGGATTTGCT GCGAATGTTA TTTGGTTTTG
-5657 CAAGAAATTC TTCATCTTCT ACAACCAAAC CTTTTTTTAG TTTAAGAGAA
-5607 AAAAACCTAC AGCTACATGT ATTTAACATA AATTTTACAA ATCAATTCAT
-5557 CATTCAGGAA ACAGAAGACA GTGTGCTTTA AGATAAGATA CAGATTTATA
-5507 TATATTACAA CGAAAGAAAA TAAATAAATA ATTTTTTTAA AAAAGAAATA
-5457 GAATGTGTGA CAAAGAGATA TGAACGTCAA CGGATTGGTA GAATCAACGG
-5407 AGACTTTCAT TCTCCGATAT ATTCAAAAA GGTGTAAATT ATTAATTTAG
-5357 ACAATATGGA ACCTCACGTT CTGTTGGATC CATTTAATGC GTGCAGTGAT
-5307 AATTTATTTT AATTTTTTTT ATATAATTTT ATATAAAATC AGAAAAGTTA
-5257 AAACAAAACA GCATTAATTG TTTAATTACT TGTCATATTG GATCTCACTC
-5207 ACCGACGTAC GTTCGTGTCC ATGCATTATA TTATCACACG TTTAAGAGAT
-5157 CCATCTACTC TGCAATTTAT TCAGATTTAG TAATTACGCT TTTCCTTAAT
-5107 AAACGAGAAT TATTGTATAC CAACATTTCA TTTTTATTCT CCAGTATTTT
-5057 TTATTCATAA TTTTCTTTTA AACTTTGATA GCTCGAATTT CGCTATAAAT
-5007 TTTTCAAAAC ATAAAAAAG CATTAATCTC GATGCTTAAA TTTATGAATC
-4957 CTAAACCGTT GTTTGGATGT ATGACATTAA GTAAGCTATA AATTCAAAGT
-4907 TTTTTTTTTT CCCATTAGTT CATTAGTTCA GAATTAAGAA TAACATCAAT
-4857 TTTTCATTAG CAAATTGCGC ATGTAGATTC TTTTCATGCAT TTAACATGT
-4807 TTGTGTGTTA CCACAACACC TAGGATCATG CATTTCGATTT CTAATACAAT
-4757 TACACAAATA ACAATTTAGA TGAAGAAACC AAATGATATT TCTCTAAATC
-4707 AACATCTCAA ACTATGAAAA CTAATTTAAAT GGCATTCTTT CCCATCTTAA
-4657 TGTGACCTCA CCGTTCATT CCACATATAA TAATAATAAT AATAATTTCA
-4607 GTTACACAAT TTCACAATGC TACTAATATA AATCACTGTA TTAGCAAAGA
-4557 TCAATGATAT GATTTTCTAT ATGTGTTCAA AGTAATTCOA GTTTTAATTA
-4507 AGCAACCATA AGAAAACTC GCATTTTATA ATATAATTTT TGCAAGAAGT
-4457 TTTTTTTTTT TAAAGTTTCG CAAGACTTGT TATAAATAAT ATAATGGAAC
-4407 CATATATATT TTGCGTTAAA TTCCAATCTA ATTGACAATA GTCAAAACCA
-4357 TTAAATTAAT ACGAAATACA CGTAGCAAAA AGCATAGGGA AAAATATATA
-4307 AACTCATAAG ACATACATGC ATATGATGGA CCTACATTAA CTATCTCTCT
-4257 AAAGTTAGCA ACTAATCAGT GGAAGACACG TGGGTATTAA TTTGGTAGGA
-4207 AAATAATAGA GATCCTGCTA TTAAAATTAT ATATGTTTTT CTAAGAAAG
-4157 TTAAACTAAG CCATTTTTAT CAATTTTCTG TATGACCATT CATTATGGCC
-4107 TAGTTCATA TATAATGCAT ATATATTTGG CATATATCTG CCTTTTGTAC
-4057 AAGGAATATC AATTTAACTT CTTATTAGAC AAGTGGTCTA CTCTATTTTT
-4007 TTTTGTTTTC TTGTTGCTAG TCGTAGGAGA CTAATCTGCT TTATATTTTC
-3957 TTCGAACGTT TCTTTTGATA TAATTTTAAA ATGTTTTATT TAATTTGCTT
-3907 ATAACTTTAT AAAGTTTATT AACTAATCT TCATAATAAA AGTTTAGTTT
-3857 TTATATGATG AAAACACAAA TGGAAAAGAG AAGAGACTAA AGTTTCCGTC
-3807 CAAAATCTAA ATCATAAAAT TATGATATAT TTCACTTCAA ACTCTATTTA
-3757 ACTGAAACTG AATTATACTA CAATTATAAA ATATTAATAA TTTGCATAGA
-3707 AAATAATTCA CATAATGATA TTACAATTTT CTTAGTAAAC TAATTATATC

```

-3657 AAATGTTAAG TTTACAAATA ATTACAAAA AGTGACTTTT TTCTTTTTAA
-3607 TTACTTTCAC ATATTTTCATC ATAAACAAAA AAGACCAACA CAAACAAATT
-3557 ACCCCCCACC CCCACCCCAC CACACACACA CACATATATA TATATGTAAA
-3507 ATTTATTTAA AACTTTTTTA GATCTAATTA TCTACAAATA TCATTATAAA
-3457 AATTAAGTTA TAACATAATC AAAGTCGTAA TATTCAAATT CGTCCTAATC
-3407 TTGGAAAGTA TTTTCATTCA TCGACTTTGA AATCGTTTAA ACAAATATTC
-3357 TGATAATCTG TTAAACCAA AACTCCTAAA ATACTCTTCT TTTTTTCTT
-3307 GACAAACAAA CTTCAAAACA CTAAAAACAT GACTTCTTGT ACAATTATAC
-3257 TTTACTGCAA CGCCCAACCA TAGTGACAAC ATAATTTTGA CTATCATAAC
-3207 CATTCAAAAC AATTGTTTCC GTAGAACAAA ACATTCATTT TTTTCATAAC
-3157 TACGACTTTA TATTTTATCC GCTGCGTAAA TTTAATATTT TTTGGATTTT
-3107 TTCTGGAGAT AGAGAATTTG ATAACGGAAA GAATAAAACA TTAGAGCCAA
-3057 AGTAAAGCTT ATGTCCTTCG AGAAATTAAT GGGGCACAGA ATCCGATCAA
-3007 ACGTCAATAA CTAAGCCAAA AATCAAGCTT CGTTGCTCTC TAGTTTCAAT
-2957 GTTCCTTTAA TTAATAAAC AGAAAAAGGT TTAGTTCCCA ATATAGGAAT
-2907 TCATGGATCA GCTAATAGTT TAATACTACT ACTTCTGTAC TACTGTTAAT
-2857 TAATGACAAT CCTTTGGGTA AGCCTAGGGG TTTTAAAAAA AAAAAACAT
-2807 TTTTCAAAG TATAAATGTA GCTCGTTGAG GGACTCATTC AGAAAACGAA
-2757 AATATGAGTA CATTGCTAGG TTTGGAATAT AGGAGTTAAT GAACTCAATT
-2707 CCTTGTACCA TTAATAAAG ATAAAAGAAA TTAAGTGTAT CCTAGGAGTT
-2657 TTAGAAACCT AACTCAAAAT TAGGAATGGA CCTCATTCOA AAACGTTAGA
-2607 AGTATAGCTA GGGTTGTTAT ACTGTTTTTTG ATTGAAAATG CTTTTTAAAT
-2557 AGATCATAAT AGTATCTTGT TTAATCACA TGCAGCAAAA CGTCTAAAAA
-2507 CTGCAAGCAT ACTGTACTTC TTTACTTTCC AATAATTAAA ATTTATATCT
-2457 AATAAGAAAA ATATATATTA CTGTATAATC AACGAATAAA ATC

```

>UCR8 (in pMDC164)

Numerierung relativ zum ATG des Gens At4g01455

```

-2910 TCTCAGAGGA TTGGTGGATA ATGACGAGGA AGAGAAGAAG CATAACATCT
-2860 TTGATTAAAG ATAAAAAAT AAAAACAAAA GGATATCTTG TAAAAGCTTT
-2810 TTTTGTGGCC TTTTTTTTTT ATTTTCAATTT CAAGCCATAT TTATAGTAAA
-2760 ATATGGAGGA CTGAAGGTG AAAAAGGGAT TCTAAAACAT TATAAAGTTC
-2710 TTTTTTACAA GATATTTGGT AAAATTCCAA TGCAAAAGGA TTCTAAAACA
-2660 TTATAAAATG GAACAGAGGA AAATGCTCTA GGCAAAGCTT AGGCCTTAGA
-2610 AGTCTTTAGA GGTCGCCAAT TAAAAAATAA AAAGACTTGA AAGACTTGAT
-2560 CAATTTTTTAT TCATTTAATT TGTAGATACA AGTGAAGGAA AAAACTTTCA
-2510 AAATCATCAA GTGGATGAGA AAAAAAATTG CCATAAAGAA AAAACGGGTC
-2460 CAATATGAAC CAATTAAGGT GGCTAACATT TGTTAAGTAA CTAATTAAGG
-2410 TGGCTTACAG CTTACTGATG CAATGATACG TCGTCCTGTG TACGTAATCA
-2360 ATGTCTTAAA TAAGCAGTAA TAAAAGAGA ATTTATATTC TCCAGCAAAT
-2310 TTATCTTTGT TTGGAATCCT CCAGAAAAGG TAATCCATAT TCTCCAGCAA
-2260 ATTATCTAAA GAAATGTTAT TACTACTAGG TACCATAAAA CCTTACAAAG
-2210 AGTCGGATTG TCGGAATATT GATTCGTATA CTAGTTATAT TTCTCTAGC
-2160 CCTAATAAAT CAAAGTTTTA GATATTTTTT TTGAAATAAA ACAATAGATT
-2110 TATAAAAATT GTCTATGCAT TTTTTATTAG TTAATGATAT AAATTGTAAA
-2060 AGTTAATAAA AATATATTAA TACCATTGAT TTTTAACTAT AAAAAATTCT
-2010 TAATCACAAA ATGATGTGAT TATATAAATT TTTTTCTAAT ATTTGATTCA
-1960 GTATTAATAA AAAAAAATT TCGTCTGTTT AATTTTATAA TGTTTTAGAA
-1910 TCCTTTTGCA TTGGAACCTT ACCAAATATT AGCCACCGTT TTAGCTAGTT
-1860 TCTTAAAAAA AATTGAATGC AGAAAATACT TATGACATTG TATATATATG
-1810 TCGGAATGGC AATGCCCTG ATTTTATCAT TTTTATACAA GTAACACTTG
-1760 GTGCCTCGTC CATTAATCCA ACGATTGATT ATCTTATGTC GAGACAAAGC
-1710 ATTGGTTCAA TCATGCAAAA TCTACCTTAT CTATAGCTTT ATAGTTAATT
-1660 AAATTTAAAT CCATTTCTTT ATATTGTTTT TAAAAATAAT TGATTCATAG
-1610 TTACGTCATA CGTTTTTTTTG TTTCTGTAA CAAATCGGTT TTGCTTCTT
-1560 TGATTGTCTC TTTCAAGATA AACGACCAAA ACTTCAATAT GACCAAGCTT

```

```

-1510   TTTGACGCAT   TTCGTTTATA   GAATACTGAT   CCATTTCTCT   TTTTCGTGAAA
-1460   TATATGTTTT   CGATCTTGTC   CATTTGCAAA   TACTTTCTAA   TCCACTAACT
-1410   TGAGTTGGAA   TTGTATTAAT   AAATCAACTT   GCTTGTCTCT   TCCATTTTTA
-1360   AAAAGATCTC   ATAACTATTT   TACAATAGTA   TTATCAAAAAG   GTGAGCAAAA
-1310   GAAAATTTAC   AAAAAACAA   AGTGAGCAAT   ATATAACTAC   ATATATAGTT
-1260   GGTAAACCGG   ACTTTAGGGA   CCAATGAAAT   TTGTAGTGCT   TAAGCGTAAG
-1210   CATTCAGTAA   AAATGAATTA   CGATTAATAT   ATTTGTAGTG   CTTAACCGTA
-1160   AGCAGTCAGT   GAAATTGAAT   TACGATTAGT   ATCTCAAAAAG   ATAACATAAA
-1110   GTATATACAT   TTTAGATTTA   TTTGTTTTTT   ATAAC TAGAA   GGAGTTTGGG
-1060   TTTAAGCGTT   AATCTTCTCC   ATGGCCCAGG   ATCAGTCTTT   GCTAAAATCT
-1010   TATAAAGACG   TAAAACATCC   GCTCCACCAG   GAATTGAACT   AGGGAGAACT
-960    TTATAGAAAG   ACAATATATA   TAAACAAAAC   ATGCATGATA   TTTTATGTCG
-910    TAAATTCAAT   AATATTGATG   TGGCTGAGGA   AAAGCTCAAT   TATTTTGATG
-860    TCATTGATCA   GTGATCAGTA   ACGGAGTCGT   TTGGTCAATA   AAGAGTTTCA
-810    ATAACCATCA   CCACTTTTTA   CGTGTGTGTA   CTTTATATAT   TAAAATGACT
-760    ACATATAATG   GATTTTCGAC   TTTAATTACT   TTTTAAATAT   ATATGTTATG
-710    CATGAATTAA   GCGGTCGAAA   TCGTATTCTA   GGTGATTCTG   ACATGTGTTC
-660    ATGCTTTCTT   GCTAAAAGAT   AAGAACTGT   CGTGGGGTTC   GCCATGCAAA
-610    AATGCGAAGC   CATTAAATAT   AATTAAGCAA   ACGCAGCCAA   CGAAGTAAAT
-560    AACCACGAGA   CAATTTCAA   CATATTTTAT   CACCATAATT   ATCGTCTTTT
-510    TCATTAGTTT   ATGTTTTTAT   TTAACCGTTT   TTGTATAAAG   CACACGAATT
-460    CCGTAATTAT   GGCTGCTATA   TAAATTCCAC   GGTCAAACAA   TCAAGCATGT
-410    ACAATACATA   AGATTAAAAT   TCAGCTCATT   AATATTTTAT   GGTAGTATGT
-360    GATAAATTTA   TATAACATGT   TTTTTTCTAG   TCACGGATTT   CACGCAACAA
-310    ATGTAGAATT   TGAAACTTAA   CGTGAATCTT   GATTTAAAAT   ATTTATGCAT
-260    TAAATGTATA   GTCAAAATAG   ATCAGGTACA   AAAC TTAAAG   TTAAATAAAA
-210    AAATATTCTA   AAGCAAATA   AAATATCCAT   GATTTGTGAA   TTCATTCAAT
-160    AAGAATGACG   TGGAAAAGAA   GCTCGTCATG   ATTACACATT   CCAAAGTGTC
-110    GTTGTGGGTG   TTATTAGACT   AGTAGTTTTA   CAATAATATC   TCAGTAGCCA
-60    TTAGTTATCT   TGACATCATT   TTAGTCAAAA   AAAAAAAAAA   CATGACAAAA
-10    CAGAAGGTAA

```

>UCR8 (6,4 kb in pMDC164)

```

Numerierung relativ zum ATG des Gens At4g01460
-6451   TTAAAGGTTG CTTCTAGAGT TTGTTCCAAC TTTATATAAC TTTTAATTTT
-6405   TATTTTGGGT TTAAACCTTT ATATAGAATT TAATTA AAAAG TAGCCTTATA
-6351   GTATACAAGT TTATCCTGTT ACCTTG TATT TGGATGATTT TTTTCATCGC
-6305   CAACCAAATT CGGATACGTA ATTATCCTTG ATTTCTCGGT TTTCTATTCA
-6251   ATTATGTTGC TTTATTTTGA TTTTTGGGTA ACAAAGATTT TTTGATAGGG
-6205   CAATCCACAT TTCTTATTCG GCATGCTATT GTTGTGACTT GTGAGTTGTG
-6151   ACCGTGTTAT TGTTTAGAAA AGTTTTACTC GCTATGGATC ATTTTAAGTA
-6105   GTTGAGTAAG GTTTCTACAC ATAAATTAAA AAAAATATAT ATAGCTTAAT
-6051   TTTCTCTTTT TACATAGAAA TATAATGAAG TAAAAAATT TCTACCAATA
-6005   AAAAAAGTGC TGTAGAATAT AATTTTTTCAG AAAA ACTAAA TCCATTTAAG
-5951   TTCTGCATCA AAATTA AAAA CGTCACAAAA ATAATAATGT AGAAGAAGTT
-5905   ATGTTTTTAC TTCTCTTTTA AATAACTTTA CCGAAAATAA ACAACATCGC
-5851   GTAGACCGT CACACACCGT GGTT CATGAA AAGGTCTTTT TATGGACTTT
-5805   ATGGACCCAA TAGATTTACT AATTTCTACT GCAAGGGCTT ACAGTTATAG
-5751   ATATTGTCTT TAACGCTTGT TGATATATTA TGGGCCTTTG GGCCAATCTA
-5705   TAGAACAAAA TCAGCTCCTC TAACTACGAC GAAGATTTAT GAAAGCTAAT
-5651   TTCATGAACT AGCGACAGCA ATTTTATGTA TCTATTAGCG TTTTATTAAT
-5605   CTAAAGAAGT TTAACCAGCC CCGTAAACAC TTGAAATATT TTTTACA ACT
-5551   TGATAGTATA TTACTTTTGC GTTCTTTTTT TACATAGTAT ATTACTCTGC
-5505   AAGATTGTTA TTTCACCCAA CTATTGTATA CCAATATTTT ATACACATCT
-5451   AACATTTATC CCCGAACAGA AATGAAGAAA GAAAACA ACT CTGATTATCA
-5405   ACTATTTGGT GGCTGTTTTA CTAAAAATAA CAAAAAAAAC AA ACTATTTCG

```

-5351 ATAGTTAAAT CTTTTAAAT AAAAAGAAAT TTGTTGGTCG TAAATATTA
-5305 TTCAAGACAA GGAAAAA ACGAAAGCGA TAGTGGCTAT GTGGCAAAA
-5251 GTCTATTCCC TTGGTACTAA CACTTTCCTG AGGCTACGAA GGTCTATCAT
-5205 ATGAAGAAAG AGATAAGATT CTCAATTTT ATATTTTTTCT AGCCGTGATT
-5151 TCCATTGGAT TTGGTGTTGG AATGGATAAG ATCTTTTAAA AAATAAAAA
-5105 ATATATAATC AATTTATCGT ATGTAGATAT AAATTGGATC ATTTTCTTGT
-5051 CATTATACGA TTCCTCTGTT TACGTTGATA TGTATGTGTC TGTATATATG
-5005 TATCTAGTAT TTGATGATTC ATTAGGAATT CCAATTCCTT CATTATATG
-4951 TGTACGGGAT AAATATGGAT ATTTCTATTT ATACGAAAGTT GTTGGTTCTC
-4905 AGTTTGTCTC TCTGTGCATG GGAGAATTTA CAATAAATTT GCAGTGGAAAT
-4851 CGATGTCTCT CTATAACATA TTTACATCGA TTTAATTTCA AATAAGTTTT
-4805 TTTTTTTTTT ACAACAGATG AAAATAAGAT ATATTTTTAAA GAAAGGTAAT
-4751 AACTATGATT TAACAAAATA AAACCAATAA CTGGATAAAT GTAAAGCCAA
-4705 AACCGACCAG TTACAAAAAG ACAAGAAGT GTTATAAAAC ATATTTTCAA
-4651 TAAAATAAAA TAAGAAAAAT CTTATTCGGC ATGCTATTGT TAAAACCAAT
-4605 GTTACTTAAA ACTGTATTTG CCTAATTCTC GAACGCATCA GAAGGAAGAA
-4551 AATCCAAAGT GAAAGATGAT ACACTTTGAG TTTAGTTTAA TAAAATACAT
-4505 GGATTACTTA CTCTACGTAT TACTCTGATA TGCATGAAAA GAGATATTGA
-4451 CTCTATTAGG CTTATTTTGT CTCTGCTACG GAAAATCTAG TTTTATCGCA
-4405 TTATACTGAA AATATTATAA TTTAAAGAGT ACGGATTGAA TGATGATAAA
-4351 AAAAAAGTGG TTTAAGGTTT TAAACAGAAG AAGGCGCAGT ATTAATAATA
-4305 ATAAATAAAA ATAGATTTTA TTAAGTTTAT TCTATCATTC CGACAAAGTT
-4251 CCGATTAATA TGTAATTGTC GAATTTTTTTT TATTTTTCTA ACGGATTTTT
-4205 GATAAAGTAT TGTTTTCGGA ATTTTCGTCAG AATCCCGTCA AAAAAAATTC
-4151 AACCAAACAT TTCTTTGAAA ATTTTTGTTG GAAATGGTTA TGTTTTCTTG
-4105 TAGTATATTA ACTATTGTAG TGTTATAAGT TTTATCGCAG AGATATAAAA
-4051 AAAAAACAAT TACCCTACTT TTTTTGTAAT CCTTATATCT CTTTTTGTGTA
-4005 CAAAAGGAAC TCTTGTAGAC ATCTGCTAAA AATTATCAGA AAGAAAAAAA
-3951 AATGTTACAA GAAAACATTA TTACCAGTAA ATTGCCAATA CAAATATTCA
-3905 AACTATCAGT TTTGTTTGCA ACCCTACTTC CTAGATTTAT AAGATGCGAG
-3851 ATTAATATTC AACTTGCTAC AACCTCGTAT TATATAATTT TTGACAGTAA
-3805 CTAATACACT CTGTGTTTTT TTATAATTAT GATATTACTT TTTTTGAAAT
-3751 AAAATTGAGA AACAAAACG TGAAGGGGAC GGGGAATCAA GCATTTGACC
-3705 TCATCGACAA ATCGACATAA GGATTTGAGT TTTACCTTT TGTTGTTCCA
-3651 ACTTCTTTTC GTTTTAGTTG TCCAAAACGG CCTAGTTTCA TAATATGTTA
-3605 GATAAAATAC ATGGTGTTAT ATGGTCAAAAT ATTGTGGAAG ACTAGCTACA
-3551 GTAGAAACTC TATAAATTA TACTCGATAA ATTAATAAAC ACGATAAATT
-3505 AATAAATTTT ACCGGTCCCA AGTCGGGCCA ATGTAAAAAG TAACCAAAT
-3451 CGATAAGATA ATAAGATAAT ATTTTTTTTG AAATCCCTAT ATAAAAATTAT
-3405 AGTCCCAATA ATATTATAAAA TTAATAATCA TAGATCTTAA GTATATATTT
-3351 TAAGACTAAT TAATTTTTTAT ATGAAATTTT TGTTCAAAGT ACAATTACAA
-3305 CTCTTTTTTAA AATATAACTG GTATGATCTC TGTTGTACTC ACATAACTAT
-3251 TTGCGTATTT GATCTGTCAT AGTTGATTTT GTAAAATCTT TTATTTGAAA
-3205 AAGCATTGCT AAGATTTGTG TAAATAAAAA TTGGATTAAA CTTTATGTTT
-3151 ACGTTTACGT TCACGTTAAT GTCGTGGATA TACAAACACA ATATATTTTG
-3105 AAAAAATAAT TTAATAAGTC AAAGAAAAAT AAAAAACTAA CATAATTATA
-3051 TATACAAACA ACAAAGCATA TAGAAAATTA ATTAATAACA TTTTAAAAAG
-3005 AATATAGTAT TGTATTTTAC ATAAATATTT TTATAAATTA ATATTTATTA
-2951 ACTTATACGA TAAATTAATA AATATTAATT TATAGGATAA ATTAATATCA
-2905 CTATAAATTA ATAAAATTTT ATGGTCCCAA CATTATTAAT TTATAGAGTT
-2851 TCTACTGTAT ATGGTTGAGT GACTTATATG ATAATCTTGC AATTTTTTTA
-2805 ATGTGGAGAG TAGATTTACA AAAATATTAG ATTTTAAAAAT TTGTTTTGCA
-2751 ATTTTCTCTT TACTAATCTT AGGTCCAACC AAACCATTTT AAGTCATTTT
-2705 CTTGTTATCT GTAATACATT ATATATCTAA AAACCTTCAA ATTAATTTGA
-2651 TTAGTTTGCT TAACATAACAG AAAATATTGA ATGATACATT TATTACAGAT
-2605 GAAATAATGA ATTTTTATTT GTGGCCAATT GCATAATGGA TGTGAGATTG

```

-2551 TATAGACATA TTTAACTTGT CAACTCTACA TGCCTTCTGG AAACAAGTCA
-2505 AATCGAATAA AGTAAACTGA GAGACAATTC ATGGAATTGA TCTAAACACA
-2451 AGTGGGTAAA CCCATTACCA TTTTCCTCGC TCGTCTAAAT TCCTATATGT
-2405 TCTCATTTAC TAGTATCGTA TCTTCTTTTT TTTTCTTAA ACAAACTAGT
-2351 ACCGTATCTT CGGTTATATG GATGGTACAT AGAACTATAA ATTGTAATAA
-2305 CATATTCTAC ATACTTACTT TGACGATAAA TAAGTGCTAT TTCGGGTCTA
-2251 ATGTTACACG TAGGGAACATA CCTAAGAAAA TGTGGTTCGC GTGTCTAATG
-2205 CAAACTGATT FCCATTTCGAA CCTATAATGG CTGAAGAAAT AGCTATCCAC
-2151 ATATGATATG TTGATAATGA TATATATTAT AGATATTCTT GTGTTTAGCT
-2105 AAGTAATATA TAAAAATTTA CTCCACTTTT TTCTCAATTG GTATGTGACA
-2051 TGCTCTTATT GGGTGGATAA TGTACTAGAC AAAACTTGTA ATTTTTTTTTT
-2005 TCTTTATCTA TAATAATATA AAAACATTTT GTGTGTTATA TTTTCATACA
-1951 TCTATTTTCC TTTCTTCATA ATTCGTTTGG CCTATTTTTC AAATGTAGTC
-1905 TATTCAATTT TATTAGGTTG CATGTGAGTT TTGGACTCAC TTATGCATGG
-1851 TACAAAATCC AAGTTCTTAA AAGACTTTGA GGTAGAATAA AAATCTGTAG
-1805 TTTGGGAGAA GGAAACAAAA ATAAAAAGGT AAATTTCTTT TGGGGGAGAG
-1751 TACTGTTGTT TGCCCTACAG ACCAAGGCAC TGAAATCGAG TTGGTATTAT
-1705 TAGGATACTT AACGTTTGGC ACCCATGGCC TTGGCCTTGG CCATGTGCAT
-1651 TGTTCGTCCT CTTCTTAAAG GGTACTATTG TCATTCTTAA TTTTATAGC
-1605 ACTAAGTCAA CACACCATAT TGGGAAATAC TTAAAGACCC ATAATGTACT
-1551 TGTCTAGCT CGATTAANAAG AGAAAAACA AAGTAAATGA AAAGTTGAAG
-1505 TAAAAGACAT GAAAACCCTT TTTGGATTGG AGAAAATAA TTCTCTAAG
-1451 ATAGAAAAGA AAAAGAGGAA GAAGCAAGAG AGGCTTGGTC TTCTTTTCTG
-1405 ATCCTGAAAC TGTCTTAATA AGAGTGAGAA GTACTGTTCA TGGAAAGACGT
-1351 GTCCCCACCA AACAAAACCTG TCTTCACTGC CCTCTTCAAT AATACTTTTA
-1305 CGGGACCCCT CCTAGTCCCA ACGCACAAATC TCATTGTGTC TATACAGAGT
-1251 TATATTATAT ATATACACTT AATTTCTAAT AGTTGTAGCA AAACATATGG
-1205 TAAGAAAATG AAATAAATAC GGTTAATATA TTATTATTTT TTGGTCAAAA
-1151 CGGTTAATAT ATATGTAACA CCAATGAAGC CAACATATCC AAACACAGAA
-1105 GAAGATTTTT GGATGATGAT TTAACATGT ATATATGTTA GTGTGAATCT
-1051 TCAAAGTTTC TGTTAAGTA GAATTATTTT TATAGATAAA GTATTTTATA
-1005 TGTTTTTTGG TCGAGCCAAA TATCGAATTC CTTTATCAA GTCTATCGAA
-951 TTCTTATAT TTACCAAAGT AAAATTTCGT AAGAACAAAA ATCAAAGAGT
-905 ATTGTCCCGA AAGAAAATTA TTTTGAAGGC CCAAAGAGGA CAAGGTCATA
-851 AATATTTGAT CTGGAGGACA GGACACCAC GTATATTTTT GTCCAAAATT
-805 TAGGTTAAAA AAAGAAGAAG AAAGGTTATC TGTTTCACGG ATTAATATT
-751 TAATTAATA TACATACATA TATTACTGTA TGTGTGCGTG TAAAAACTA
-705 AATATCGACG ACTATATATA TAACTAGATA ATTTAGCTAT AGTATAGTAT
-651 TTTTATTTTT CACCCTTGGT TTTTTTATAC ATATATGCAC CGAACCTCTT
-605 CTCTTCTCT TCCTCGTCTT CTCTCCTTTT ATATATGTGG AAAACTGCAT
-551 TTATTAAGAA CAGTTTAGAA AGTGTCAACC CCTAAAGGAA TGTTTTTAGT
-505 TTAGAGGAAA GAGAGAGAAG AAGAAGCAGC AGCAGAAGTT GTTAATTTGA
-451 AGACTATTTG AGGAAAGACA CCTATATCTA AATACTCAA GTTACAAAA
-405 TATTACTTCA GAAAACAGTT CCATTAGAGA GACTCATAAA GCTTCTCATG
-351 TAAGCCTCTC TTGTAATTTA TTCTCATATA CAGAATACTG TTTTGTGCAT
-305 TTACTTCTCT TCTTCTCTCT CTTTCATAT GATTAACATT CAATGCAAAA
-251 TTCTTGTAATA TTCATTTTAC AATAGCTTAT CCAAATCTG CTACTTTTAT
-205 TATTGTTTCC TCTCGCTGCG ACATTCTTTA TTTCTCATCA TTTAATGTTC
-151 TCTCCTCGTA CATCCTCTTT GTTCTGTCTT AAGAATTCAC CTACCAAACC
-105 ATTTATTTCT CATACCCACT TTAAGATTTA GTAGATTTTT GTTTTCTTGT
-55 CAAAATGGTA TCCTAAAAC AATCTCTCTT GTTTTTTTTCT TTGTTGAAGC
-5 TAATT

```

>UCR8 (in pBIMCS3)

Numerierung relativ zum ATG des Gens At4g01455

```
-1 TTACCTTCTG TTTTGTGATG TTTTTTTTTT TTTTGACTAA AATGATGTCA
```

-51 AGATAACTAA TGGCTACTGA GATATTATTG TAAAACACT ACTAGTCTAATAA
-101 CACCCACAAC GACACTTTGG AATGTGTAAT CATGACGAGC TTCTTTTCCA
-151 CGTCATTCTT ATTGAATGAA TTCACAAATC ATGGATATTT TATTTTGCTT
-201 TAGAATATTT TTTTATTTAA CTTTAAAGTTT TGTACCTGAT CTATTTTGAC
-251 TATACATTTA ATGCATAAAT ATTTTAAATC AAGATTCACG TTAAGTTTCA
-301 AATTCTACAT TTGTTGCGTG AAATCCGTGA CTAGAAAAAA ACATGTTATA
-351 TAAATTTATC ACATACTACC AATAAATATT AATGAGCTGA ATTTTAATCT
-401 TATGTATTGT ACATGCTTGA TTGTTTGACC GTGGAATTTA TATAGCAGCC
-451 ATAATTACGG AATTCGTGTG CTTTATACAA AAACGGTTAA AATAAAACAT
-501 AAACATAATGA AAAAGACGAT AATTATGGTG ATAAAATATG TTTGAAATTG
-551 TCTCGTGGTT ATTTACTTCG TTGGCTGCGT TTGCTTAATT ATATTTAATG
-601 GCTTCGCATT TTTGCATGGC GAACCCACG ACAGTTTCTT ATCTTTTAGC
-651 AAGAAAGCAT GAACACATGT CAGAATCACC TAGAATACGA TTTGACCCG
-701 TTAATTCATG CATAACATAT ATATTTAAAA AGTAATTAAA GTCGAAAATC
-751 CATTATATGT AGTCATTTTA ATATATAAAG TAACAACACG TAAAAAGTGG
-801 TGATGGTTAT TGAAACTCTT TATTGACCAA ACGACTCCGT TACTGATCAC
-851 TGATCAATGA CATCAAAATA ATTGAGCTTT TCCTCAGCCA CATCAATATT
-901 ATTGAATTTA CGACATAAAA TATCATGCAT GTTTTGTTTA TATATATTGT
-951 CTTTCTATAA AGTTCTCCCT AGTTCAATTC CTGGTGGAGC GGATGTTTTA
-1001 CGTCTTTATA AGATTTTAGC AAAGACTGAT CCTGGGCCAT GGAGAAGATT
-1051 AACGCTTAAA CCCAACTCC TTCTAGTTAT AAAAAACAAA TAAATCTAAA
-1101 ATGTATATAC TTTTAGTTAT CTTTGTGAGT ACTAATCGTA ATTC AATTTT
-1151 ACTGACTGCT TACGGTTAAG CACTACAAAT ATATTAATCG TAATTCATTT
-1201 TTACTGAATG CTTACGCTTA AGCACTACAA ATTTCATTTG TCCCTAAAGT
-1251 CCGGTTTACC AACTATATAT GTAGTTATAT ATTGCTCACT TTGTTTTTTT
-1301 GTAAATTTTC TTTTGCTCAC CTTTGTGATA TACTATTGTA AAATAGTTAT
-1351 GAGATCTTTT TAAAAATGGA AAGAACAAGC AAGTTGATTT ATTAATACAA
-1401 TTCCAACCTCA AGTTAGTGGA TTAGAAAGTA TTTGCAAATG GACAAGATCG
-1451 AAAACATATA TTTCACGAAA AGAGAAATGG ATCAGTATTC TATAAACGAA
-1501 ATGCGTCAAA AAGCTTGGTC ATATTGAAGT TTTGGTCGTT TATCTTGAAA
-1551 GAGACAATCA AAGAAAGCAA AACCGATTTG TTACAGGAAA CAAAAAACG
-1601 TATGACGTAA CTATGAATCA ATTATTTTTA AAAACAATAT AAAGAAATGG
-1651 ATTTAAATTT AATTAACAT AAAGCTATAG ATAAGGTAGA TTTTGCATGA
-1701 TTGAACCAAT GCTTTGTCTC GACATAAGAT AATCAATCGT TGGATTAATG
-1751 GACGAGGCAC CAAGTGTTAC TTGTATAAAA ATGATAAAAT CAGGGGCATT
-1801 GCCATTCCGA CATATATATA CAATGTCATA AGTATTTTCT GCATTCAATT
-1851 TTTTTTAAGA AACTAGCTAA AACGGTGGCT AATATTTGGT AAAGTTCCAA
-1901 TGCAAAAGGA TTCTAAAACA TTATAAAATT GAACAGACGA AATTTTTTTT
-1951 TTATTAATAC TGAATCAAAAT ATTAGAAAAA AATTTATATA ATCACATCAT
-2001 TTTGTGATTA AGAATTTTTT ATAGTTAAAA ATCAATGGTA TTAATATATT
-2051 TTTATTAAC TTTACAATTT ATATCATTAA CTAATAAAAA ATGCATAGAC
-2101 AATTTTTATA AATCTATTGT TTTATTTCAA AAAAAATATC TAAAACTTT
-2151 ATTTATTAGG GCTAGAGGAA ATATAACTAG TATACGAATC AATATCCGA
-2201 CAATCCGACT CTTTGTAAAG TTTTATGGTA CCTAGTAGTA ATAACATTT
-2251 TTTAGATAAT TTGCTGGAGA ATATGGATTA CTTTTTCTGG AGGATTTCCAA
-2301 ACAAAGATAA ATTTGCTGGA GAATATAAAT TCTCTTTTTA TTTACTGCTTA
-2351 TTTAAGACAT TGATTACGTA CACAGGACGA CGTATCATTT CATCAGTAAG
-2401 CTGTAAGCCA CCTTAATTAG TTACTTAAACA AATGTTAGCC ACCTAATTG
-2451 GTTCATATTG GACCCGTTTT TTCTTTATGG CAATTTTTTT TCTCATCCAC
-2501 TTGATGATTT TGAAAGTTTT TTCCTTCACT TGTATCTACA AATTAATGA

-2551 ATAAAAATTG ATCAAGTCTT TCAAGTCTTT TTTTTTTTTA ATTGGCGACC
 -2601 TCTAAAGACT TCTAAGGCCT AAGCTTTGCC TAGAGCATT TCCTCTGTTC
 -2651 CATTTTATAA TGTTTTAGAA TCCTTTTGCA TTGGAATTTT ACCAAATATC
 -2701 TTGTAAAAAA GAACTTTATA ATGTTTTAGA ATCCCTTTT CACCTCAAG
 -2751 TCCTCCATAT TTTACTATAA ATATGGCTTG AAAATGAAAT GAAAAAAAAA
 -2801 GGCCACAAAA AAAGCTTTTA CAAGATATCC TTTTGTTTTT ATTTTTTTAT
 -2851 CTTTAATCAA AGATGGTATG CTTCTTCTCT TCCTCGTCAT TATCCACCAA
 -2901 TCCTCTGAGA

>Sultr2;2 Numerierung relativ zum ATG des Gens Atlg77990

Unterstrichen und fett: Primerbindestellen, fett und kursiv: von Mustroph et al. (2009), verwendeter Primer

-3418 GCTAATCTT AGTCATCTT GTTTGACATT ATAAACCATT ATTTTATAGC
 -3368 AATTTTACAT AAATATATTT AGATATTGTA CGCTATTTTA GATCATATTA
 -3318 AAAAAATGCA TTCTATTTAA AAATAACCAT ACTTAAGATT ATTTATATAT
 -3268 ACCGGTATTA ATAATGTTCT ATAACATCCT ACGAAGCATT CAACGAAGAT
 -3218 GATTAAGAAT TGTGATAACC ATGTTAGAAA TTGCGAAAAG AACAAATCCG
 -3168 TACCAACCAG AAAAATAAAA TAATCGATCG GTTTCTTATA TTATGAGAGA
 -3118 CCAAACGTTT CAAATTTGTC GGGGGCATAT AATCGACTAA AAATTTTCAG
 -3068 GTGCCGCCTA AAAATGGGTA ATATATTTAT CTAGTCAACC GTTCAGTTTC
 -3018 TATACATGAA TTTAATCAT AGTATATGCA TTTCAATCTG TAAATTAGTC
 -2968 ACGATTATGT TTGACAAAA CAATATTATG TACGTATGAG TATGTTAGCT
 -2918 TGGTTGGTTA GAACCTCTCGT CTATAAAGAT TTTTTTATTT ATTAATAGT
 -2868 TTATCGTTTT GTACCGATGA ATAAAGTTTA TAAAAATTAT TTTGATTGGT
 -2818 TGTTGCACAT CAAGTACCAA GTAATGTAAC ATTTGCATGT AAAATATCAA
 -2768 AACATATACT ACATCATAAG TTTGCCATCG CAAACGCTGA CAAAAAGTAG
 -2718 TTTCTTATTT TATTTTTAAA TTTTTGTTAA GGGACAAAA GAAGTTTTAA
 -2668 TTTAAAGTAT TTTATAGAGG TAAAATAATG TGAAGTGGTC TTTATGACTA
 -2618 AATTTAAACG CAGCAACCAA AATTCTTAGA AATGTTATGT TTTGTTCCGA
 -2568 TCTAAACCAA CTTTATTCAC ATGTTTTTAG TATTTGTTAA CTCATGATTC
 -2518 TATAGAATAA TCTATAACTA TATTTTATAA ATAAAGTTCT GAAGGCACAG
 -2468 TTGATGGACG CGGCCACACG TAGAATTTGC CTTTTAGATA AAGGTCATCA
 -2418 TGCATAATGC GTTATCTCAG TGAATAGATT CGTTCGGTGC ACTGAACAAT
 -2368 TGGTTTGGA CAGATTAATT CTTCAGATAT CGTGAAC TAC AGGAACACCA
 -2318 GTGTGGCCAA AAGCACTATA TAACGTTTAC GTACGTCAA ATAATTAACC
 -2268 GATGAAGTTT GGTATGTTAA TAACTTAATA TAATGAGATA TATTATAGTC
 -2218 TATTTTCCGG GTGCTTTCCC CTTTATAATC TGAAAACAGA AAAAAATTA
 -2168 CACATATATT TTAGAGTTTA AGCAAATTTT CTCACTTTGG CTGACTTCAT
 -2118 TCACACAAAT TGGTCTTTTT TTTTTTACTA AACTAATGG TTCTAATTTT
 -2068 TTTCGTGAAC ACACAATGCA TCCAAACAT GGCGCCTTC ATTATTTTCA
 -2018 AAATTTTAAC CATTATTATT GACGGGCACA TAACACGAAT TTGTTGAGTT
 -1968 GCGTTAGACC AAAGAACTCT ACGTACCATA GGACTATGGC ATTAAGTAG
 -1918 CTAGTTTGGA GGATTCTGGT GGGTGAAAA AAGTAAATAA GTGAATAAGA
 -1868 ATTGGTTCAT AGTGGAAAGA ACAACCTATA TGACTCATGC GTAGTGGAAA
 -1818 GATAGAGAAC AACTTATATG ACTCATGCGT AGACCATGAT CGTACGATGA
 -1768 ATAGATTCCA TTGGTTATGA TTATAAGTAA GCAAAATTC AAAACGGAAA
 -1718 AAGAAAATGT GGACCGAACA TGCCCAGTGA CCACATCACA TCCGTTCAAT
 -1668 TCCATATTCT TCCATATAAA AAGATAAGGA AAAAGAGACC CAAAAAGAAA
 -1618 AGAACAACT TATATGCATA ATCAAAC TTT CATTGTCATT TCTTTTTTCA

-1568 CTTCGTTTTTC CTTCGAAATC AATTATATAG TATAGTGCCT TCTTTCTCCA
 -1518 TCAAACCATT CTTGTTTTGT TTGGCAACGC TGACATCTCC ACTTAAAATA
 -1468 TTCGTTTTGG ATCAAAGCTC ATATATGTTC TTGTGTTGAT GATATTTTGG
 -1418 ATATCGATTT GTTTGTTAAT TTTTGAGCAT TTTATTAAGT ATATACTAGT
 -1368 TATTAAATAT TAAAAAGTAC ACGAAATTTT **CTGATCATCT AACATTGTTG**
 -1318 **GTATGC**TACA ATCGCACATT TTAATATATG TTGCGATCAA AGTTTGAAAA
 -1268 GTTGAATAGA AATTTCTTAA AGAAACGATG TGATAATTCT TGTGGTCAGG
 -1218 CACTCACTTT TTTACCTCCA GAGGTTAAGA TGATTTTATG AAGGATTAAA
 -1168 ATAAAATCTC AAAGACAAAT GCAGTTTTTC CCCTTGATCT TATACGAATG
 -1118 ATCCATATAA AATCTCTAAA AGTATTTCTT GATTCAGTCA GCAATGTGTC
 -1068 CGAGATCACC AAACAAAATA GTCACAAGAT AGTACTTATC TTCACCTGCC
 -1018 TAATATTCTT CATATTATGA CCGTGACATA TTACGACAAA GCTATCATTC
 -968 CCTCTTGTTG TATTCATTTT TTTCTAAGTT AAACAAAAGAA TATGTACAAT
 -918 CGGATAAAAA CAATTGATTT ACTGGCATGT **TCTACTATAC CAGGTAAGTA**
 -868 **TACGC**TAAAA AAAAAGAAAA AGAACAAAAA AAAACTATTT TCAGTATATT
 -818 AACTAAAACC AAATCGAAAA AAACATATGCA CTTTTTATAG AATTCTGAAC
 -768 TAGACCATGA TTATGCACCA ACAAATAATT ACAAACAAAA CAACACATAG
 -718 GGAAGAAAAA AAAGATATAC AACAAATTTAT TGGCTTTACA AAAAGAAAAA
 -668 AGAAACCAGA ATTTTATTAA TAATTATTTA TGTTTTTTCA CATAAGCATT
 -618 CACTTGGAAA CTTGTTATTT ATATCGTAGT CTAATGAGGA AATAAGAAGG
 -568 TTATATCATA AATCATAATA ATTAATTTAT ATAGTCAAAT TACATGCAGT
 -518 AACAAA**ATCT CAAGCATGAG TGATAATTC AAC**TATAGTT TGGCTAAAAA
 -468 CATAATTACA AATTCAGTAT CCTATAATTC CCTATGTCTC GGATTATAAA
 -418 ATTTTCTAGA TAAAAGCACA CAGTTTAAGA AACCATAAAT GTTTTATGTT
 -368 ATTTTATAA TAGAAAAAAG ATTGTAGAAA TGATTATAAC ATTCTAATAA
 -318 ACATAAATTA TGTATGTATA TTTGCGAAAA TCTGACTAAA TAAGAAAAAG
 -268 TCTAAAATAT CTAATATAAT GGGACATAAT TAGGAGTATC ATTTTGTAAA
 -218 TCTAATGGTA ATTTCTAAAG TCAATATAAA AAAAAAATAG AGTAATATTT
 -168 TATTTTTTCT ACATACAGTA AAGTAACAGC TTTCAATTAT TGCATATAAA
 -118 TTATATTCAA AATTTAGGGC CAAAGTTTGG AATTATACTT ACTTTCTTTC
 -68 TAATTTTAAG TATAAGTTAT GGATATATAT GACCAAAAAA **GTTAATATAT**
-18 ATCTAGAGAG AGAGCTGAAT G

>Sultr3;3 Nummerierung relativ zum ATG des Gens At1g23090

-3356 A
 -3306 GAGCCACGCG AATACATTAA CAAGTGCGCA ATGTGCATAC ATTCCAAAAG
 -3256 AGTTGGGTAT CAGATCCTTT TTCTATGAAT AACTCCATTC ATGTCCCGTT
 -3206 ACTTTTCCCT TTTGTTTCTT TCTTATGATA TTCTTTTTCA ATATTTTAAAT
 -3156 TCGATTTGGC CTACCAGTAT CCATACCATT TATAATATTC ATTTACTTGT
 -3106 ATTATTTGAC TTCGTGTTCA CTGCCCTCCC ATGTGACGTG GTTCACGTTT
 -3056 TCATAGATCA TTCTCATTTT TCAGTTATTC TCTCTTTCAC ACAATGATTT
 -3006 GTTTCGCACC CAACCAAGAC AACGTTATAA GAACTTAAGA AGAGCAAACC
 -2956 ATAAGCATAC TTAGTTAAGG TTTTTAACGA GGACAAGGAA ACGAGGAAAT
 -2906 TAACAGTGCA TAAAGAATAT ATAGATACCA AATGGAATGA ATGTTTTTTT
 -2856 TATATATAAT TAAATCGAAT AAATGTTATT AGTAATAGTA TTAATAAAAC
 -2806 AAAAGTGGTG AAACGAAACA GAAATGTGAT TTAAATGGAT ATAATAACTA
 -2756 GAAAATTTGA TCAAATGCTT CGTATGATTT ACCTATAGGC AAAACGTTTCG
 -2706 TGTTTCGATAC AAAACTAAAA AAAAAAATCT TTGAAAAATA CATTGTTATA
 -2656 TCAAGCTAAT TTTCTAAAGA TGCGGGAGCT AGTGGAAATT GTGATTTCAA
 -2606 ACTCCTTGGT TGATCATTGT AAAGAATAAG AAAAAAAAAA CACGATCAGA
 -2556 AATCATAATG AAACCAATGC TCACTTTTTG TTCCACCATT TTTTAGATGG
 -2506 ACCCGGTAAC AATTAGTGGA TCTAGAATCT TCAGTTTGGA TTATAACTTA

-2456 TCGAAAACAG TTTAGTATTT TGACTCAATT CTGTACATTG GAATCAATTA
-2406 TGAACAAATT TCATTATATA TAGTTAGCTC ATCTTATTCT TCTTAATTTG
-2356 TGTTCGACA TAAAAAACA TAGAAACCGA AATAGATTCA GTTAGCATTTC
-2306 ACTTCTTATT GAGAAAATAT GTAGGTTAAA ATTGTAGGTT TTTGCCATGC
-2256 ATATTACCGA CGTAGATAGG TTTGGTCGGA ATTTTTTCTA CTTCTTTAAT
-2206 AAGTTTGGTT AGATCATTCA TCTTATATGA ATATGTAAAG AATGCTTTTA
-2156 ATTATGGTCG TTTCGTTTCT TTCACCAGAA ACAAGGAATG TCCGAGATTC
-2106 ACTTATTAAA TTAATATATA CTTGATCTGA TTCACACGAA AAGACAATCT
-2056 TGGAGTATCA AACTATAATA TCACCTATTA TACTTTGAAT TACTAGGAAT
-2006 TTTTATCCTC CGATTTTATA ATGATCCTAC TAACATTGGA TCACAACAAG
-1956 TTGGCTCGGT TATGAATTTG GTTTGCAACA TATACAGTTT TTCAACCGCT
-1906 GTTAATTTTA GTGTTAATCA ATTATCTTGG ATAATTGTTG ATGCAAGATC
-1856 AGACATTATA TCCATATATA TAAATATGTT ATATAGATAT GTATTAATAT
-1806 CTTTAGCCAA AGACGATAAG TCTAAAATCA TCAACATTTT TTGTCCGGGT
-1756 CAATGTAACA ACTAACAACCT CCTACTGTAG ACTAGCTAGT TGGTCGTCTG
-1706 ATCGTCTCTC TGTTTGTAG CGATCTCAAC GGGTACATGA ACAGATAGTT
-1656 ATGCATTATT GATACTCAA TTTTCTTAGT TGTTATGTTT TTAATATGTA
-1606 ACTAGATTTT AATCCGCGGT ACACCGCGGA GATAATTTAT TTTTTTAAGT
-1556 TAATATATAT AAAAATTTTG CAAATTATAT CTATTTATAA ATTATTTTTA
-1506 TTTTATAGTT TACAATTGTT ATTAAGTAAC GTCCTTCCAA ACCCGTTCCG
-1456 CCAAACCCGT CCTGTAAAAA AAGCTCGCGG TACCCCGCTA ATTTAAATTT
-1406 ATAATTAATA TAAATATTTT ACGGGATTGC AATTGTGTTT TAGTTTGTCA
-1356 AACAAAATTT TGTTTTAAAT AGTTGTGCGAA ATCTAGTTCA AATTTTGAAG
-1306 AAATAAGATT TAGTGAATTG ATAAAAAATG TATTTAGTTG CGTTTTGCTC
-1256 ATTTTAAGGG ATTGCAATTG TCTTTTGGGT TGTCAAACAT TTTTTGTTTT
-1206 AATTAGTTGC CGAAATTTAG TTTAAATTTT GGAAAAATCT GCGTGATATA
-1156 TGGGATTGGA ATATATTTAG AATGTTTTTC GTTTGTTAAT CAATTTATTG
-1106 CTAAAAAAT AATAATTAAA AGTCAGTGGC AGCCTTTGTA AATAAGTTCC
-1056 AACTCCAGGA TTTATTTTAC AAAATGGCTG CAAAAATGTA TATATAGATT
-1006 CACCCATTTA TTTATTATTC ATAGTATTAT AGTACTATCT TCGTGTCTTT
-956 TTACTTGGTG TTTAAAGTTT TTGTACACCG ATTGAATCAT TTTTAATTTT
-906 ATTTTTTTAA ACATCAATTT ATCTAATTAA CCAATAGAAA AAATTATCTG
-856 TATATTATAA ATCATCAAAA CCAATAAAAA AAAACTAATT AATATTGCAT
-806 TAAAAATTAA AAACATCATC TAATTTAGAA CTTTTTTTCC TACTATAACA
-756 TTAACATCAA CTAAATACGG AGAAAACGTT GTACTGAGGT TCTTGCATTT
-706 TAAAAATTTG GAAACTAAGA ATGTTAAAAA AATTATGGTT ACAAATATAT
-656 ATATAGTGTT ATAATTAGTA CTTATCGTAC TTAATAAAAA AGATACTAAT
-606 TAGTTGTTGT TATATTATTT TCTACAAAAA TAAAAATCATT CAACTAAAAAT
-556 GTTCTATTTG TCAGTCGCTT CACAAAATA TGCATCTACC ATACCAGTGA
-506 TCATAATTAT AAAACTCTGT TTTTGTTTTT TGTCTTTACA ACCACTTAAA
-456 TACGTCATAG CTATATATGC ATTATTACAA GTTCTCAAGG TGGCGCGCGA
-406 ATGTTTTAAT TAAAATATTA TGTTTTTCTT ATGTATTTCA TCTTTAATCG
-356 AACATAGAAA ATGTGAAAGA TTTGGAGCAT AGACACGAAT CAGTTTTTTTT
-306 TTTTACACG AATCAATATT CATAGGGTAA ATAATAGACA AACGCCAACA
-256 AAAAAAAAAA AGAGAAATTC ACAACGGATT ATCGGCTCAA ATTACAAAAC
-206 AAAAAAAAAA TACAGAGACA ACAGTATACG TGTAACCTTC CGAATTTTTT
-156 TTTTTTTCAT ATCAAAAATA AAAGATAGGC CAAGATAAGA CCATTATAAA
-106 ATGTAAAGAC CGACCCGAAA TAATACTCAT GTTTAAATTA TCAGCAAAGA
-56 GCCAAGAGAG GAAACATCAC ACATTGGTGA CAAAAATCT TAGGAAAACC
-6 AATTAAATG

Danksagung

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Peter Westhoff für Betreuung dieser Arbeit, sowie für die Ermöglichung diese Arbeit in seinem Institut anzufertigen.

Die vorliegende Arbeit wurde gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 590 der Universität zu Düsseldorf.

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbstständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Düsseldorf, den