

Analyse der *in-vivo* Funktion der Transkriptionsfaktoren
TGA2.1 und TGA2.2 aus Tabak nach Fusion mit einer
konstitutiven Aktivierungsdomäne

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Ingo Lenk

aus Herford

Göttingen 2001

Zum Forschen gehört Glück,
zum Erfinden Geist,
und beide können beides
nicht entbehren.

Johann Wolfgang von Goethe

für Andrea und Frederik

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	I
2	EINLEITUNG	2
2.1	DIE ROLLE VON SALICYLSÄURE IN DER PFLANZLICHEN PATHOGENABWEHR	2
2.2	AS-1 IST EIN CIS-ELEMENT IN PROMOTOREN PFLANZLICHER ABWEHRGENE, DAS SALICYLSÄURE-INDUZIERBARKEIT VERMITTELT	4
2.3	ASF-1 UND DIE FAMILIE DER TGA-TRANSKRIPTIONSFAKTOREN	6
2.4	ZIELSETZUNG UND EXPERIMENTELLER ANSATZ DER ARBEIT	10
3	MATERIAL	11
3.1	ORGANISMEN	11
3.1.1	Bakterienstämme	11
3.1.2	Pflanzen	11
3.2	NUCLEINSÄUREN	12
3.2.1	Plasmide	12
3.2.2	Hybridisierungssonden	14
3.2.3	Primer	15
3.2.4	Oligonucleotide	16
3.2.5	DNA-Fragmente für EMSAs	16
3.2.5.1	Klonierung von pUC18 as-103	16
3.2.5.2	Klonierung von pUC18-pas-a	16
3.2.5.3	Gewinnung der im EMSA eingesetzten Fragmente	16
3.2.6	DNA-Längenstandards	17
3.2.7	Radioaktiv markierte Nucleotide	17
3.3	PROTEINE	17
3.3.1	Proteinstandards	17
3.3.2	Antiseren	18
3.4	NÄHRMEDIEN UND ZUSÄTZE	18
3.4.1	Medien zur Anzucht von Bakterien	18
3.4.2	Medien zur Anzucht von Pflanzen und Suspensionskulturen von <i>N. tabacum</i>	18
3.4.3	Zusätze	19
3.5	LÖSUNGEN UND PUFFER	19
3.6	CHEMIKALIEN, VERBRAUCHSMITTEL UND GERÄTE	22
3.6.1	Chemikalien	22
3.6.2	Verbrauchsmittel	23
3.6.3	Geräte	23
3.7	KITS UND ENZYME	25
3.7.1	Kits	25
3.7.2	Enzyme	25
4	METHODEN	26
4.1	ANZUCHT UND MANIPULATION VON BAKTERIEN	26
4.1.1	Anzucht von <i>E. coli</i>	26
4.1.2	Transformation von <i>E. coli</i>	26
4.1.3	Anzucht von <i>A. tumefaciens</i>	26
4.1.4	Transformation von <i>A. tumefaciens</i> durch Elektroporation	26

4.2	ANZUCHT UND MANIPULATION VON PFLANZEN	27
4.2.1	Anzucht von <i>N. tabacum</i>	27
4.2.2	Transformation von <i>N. tabacum</i> (modifiziert nach HORSCH <i>et al.</i> , 1985).....	27
4.2.3	Induktion von Tabakpflanzen mit Salicylsäure bzw. Cycloheximid.....	28
4.2.4	Induktion von Tabakpflanzen mit BION®.....	28
4.2.5	Etablierung und Kultivierung von Suspensionskulturen aus <i>N. tabacum</i>	28
4.2.6	Behandlung von Tabaksuspensionskulturen mit Induktoren und Inhibitoren.....	29
4.3	ISOLIERUNG, REINIGUNG, QUANTIFIZIERUNG, DARSTELLUNG UND MANIPULATION VON NUCLEINSÄUREN.....	29
4.3.1	Isolierung von Plasmid-DNA	29
4.3.1.1	Alkalische Lyse (modifiziert nach ISH-HORROWICZ und BURKE, 1981)	29
4.3.1.2	Schnell-Lyse für anschließende PCR	30
4.3.1.3	Plasmidpräparation für die Sequenzierung.....	30
4.3.1.4	Präparation größerer Plasmidmengen.....	30
4.3.2	Isolierung von RNA aus <i>N. tabacum</i>	30
4.3.2.1	Isolierung von Gesamt-RNA	30
4.3.2.2	Isolierung von polyA ⁺ -RNA	31
4.3.3	Isolierung von cDNA-Sondenmolekülen aus <i>N. tabacum</i>	31
4.3.4	Ethanol-fällung von DNA (SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989).....	31
4.3.5	Quantifizierung von Nucleinsäuren (SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989).....	31
4.3.6	Methoden zur Klonierung von Nucleinsäuren.....	32
4.3.6.1	Restriktionsspaltung von DNA (SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989).....	32
4.3.6.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	32
4.3.6.3	Ligation von Restriktionsfragmenten	32
4.3.6.4	Ligation von PCR-Produkten in pUC57/T	32
4.3.7	Klonierung eines Kassettensystems für die Fusion zwischen TGA- Faktoren und Aktivierungs- bzw. Silencerdomänen	33
4.3.7.1	Klonierung des Vektors pKVPL.....	33
4.3.7.2	Klonierung des Vektors pKENGL	33
4.3.7.3	Klonierung des Vektors pK2.1L.....	33
4.3.7.4	Klonierung des Vektors pK2.2L.....	34
4.3.7.5	Klonierung des Vektors pLVPs	34
4.3.7.6	Klonierung des Vektors pLENGs	34
4.3.7.7	Klonierung des Vektors pL2.1s	34
4.3.7.8	Klonierung des Vektors pUC57 VP2.1s	34
4.3.7.9	Klonierung des Vektors pUC57 ENG2.1s	35
4.3.7.10	Klonierung des Vektors pUC57 2.1VPs	35
4.3.7.11	Klonierung des Vektors pUC57 2.1ENGs	35
4.3.7.12	Klonierung des Vektors pSK 2.2VPs	35
4.3.7.13	Klonierung des Vektors pSK 2.2ENGs	35
4.3.7.14	Klonierung des Vektors pUC57 2.1-57s	35
4.3.7.15	Umklonieren der zuvor beschriebenen Derivate in den Vektor pBINHyg-TX	35
4.3.8	PCR (Polymerase Chain Reaction) (modifiziert nach MULLIS und FALOONA, 1987)	36
4.3.8.1	PCR zur Charakterisierung von rekombinanten Klonen.....	36
4.3.9	Sequenzierung „Cycle Sequencing“	36
4.3.10	Agarose-Gelelektrophorese	37
4.3.10.1	Auftrennung von DNA im Agarosegel.....	37
4.3.10.2	Auftrennung von RNA im denaturierenden Agarosegel (FOURNEY <i>et al.</i> , 1988).....	37
4.4	NORTHERNBLOT-ANALYSE.....	37
4.4.1	Herstellung radioaktiv markierter Sondenmoleküle	37
4.4.2	Transfer von RNA auf Nylonmembranen	38
4.4.3	Hybridisierung von Northernblots	38
4.4.4	Mehrfachhybridisierung von Filtern.....	39

4.5	ISOLIERUNG, REINIGUNG, QUANTIFIZIERUNG UND DARSTELLUNG VON PROTEINEN	39
4.5.1	Isolierung von Proteinen aus <i>N. tabacum</i>	39
4.5.1.1	Denaturierende Gesamtzellextrakte	39
4.5.1.2	Denaturierende Kernproteinextrakte (modifiziert nach PRAT <i>et al.</i> , 1989; NIGGEWEG, 1999).....	39
4.5.1.3	Normalisierung der Proteinmengen mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung	40
4.5.1.4	Native Gesamtzellextrakte (JUPIN und CHUA, 1996).....	40
4.5.1.5	Native FixProt-Gesamt zellextrakte (modifiziert nach KEGLER, unveröffentlicht).....	41
4.5.2	Fällung von Proteinen (nach WESSEL und FLÜGGE, 1984).....	41
4.5.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten (nach BRADFORD, 1976).....	41
4.5.4	Affinitätsaufreinigung von Antiseren (modifiziert nach OLMSTED, 1981)	41
4.5.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970).....	42
4.6	IMMUNOBLOT-ANALYSE.....	42
4.6.1	Proteintransfer auf Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membranen (modifiziert nach KYHSE-ANDERSEN, 1984)	42
4.6.2	Detektion mit spezifischen Antiseren (Immunoblot-Analyse)	43
4.6.2.1	Detektion mit affinitätsgereinigtem Antiserum gegen TGA2.2	43
4.6.2.2	Detektion mit affinitätsgereinigtem Antiserum gegen TGA2.1 bzw. polyklonalem Antiserum gegen Streptag® II	43
4.7	EMSA	43
4.7.1	Herstellung radioaktiv markierter DNA-Fragmente für den EMSA	43
4.7.2	Gelshift	44
4.7.3	Supershift	44
4.7.4	Quantitative Auswertung von EMSAs	44
5	ERGEBNISSE.....	45
5.1	HERSTELLUNG VERSCHIEDENER FUSIONS- UND DELETIONSDERIVATE VON <i>TGA2.1</i> UND <i>TGA2.2</i>	45
5.2	HERSTELLUNG UND CHARAKTERISIERUNG TRANSGENER TABAKPFLANZEN	46
5.2.1	Herstellung transgener Tabakpflanzen	46
5.2.2	Charakterisierung der transgenen Pflanzen auf Protein-Ebene	47
5.2.2.1	SNN VP2.1s	47
5.2.2.2	SNN ENG2.1s.....	47
5.2.2.3	SNN 2.1VPs	48
5.2.2.4	SNN 2.1ENGs	49
5.2.2.5	SNN 2.1-57s.....	49
5.2.3	Charakterisierung auf RNA-Ebene	50
5.2.3.1	SNN 2.2VPs	50
5.2.3.2	SNN VP2.2s	50
5.2.3.3	SNN 2.2ENGs	50
5.3	VERGLEICH DER RELATIVEN PROTEINMENGEN TRANSGENER UND ENDOGENER TGA-FAKTOREN DER KLASSE II.....	52
5.3.1	Vergleich der Proteinmengen in Gesamtzellextrakten	52
5.3.2	Vergleich der Proteinmengen in Kernextrakten	53
5.4	AUSWIRKUNG VON FUSIONS-PROTEINEN AUS VP16-AKTIVIERUNGS-DOMÄNE UND TGA2.1 BZW. TGA2.2 AUF DIE EXPRESSION VON ZIELGENEN NACH SALICYLSÄURE-INDUKTION	57
5.4.1	Untersuchungen zur Expression von Zielgenen drei Stunden nach Salicylsäure-Induktion.....	57
5.5	EINFLUSS VON CYCLOHEXIMID AUF DIE EXPRESSION VON ZIELGENEN	59
5.5.1	Untersuchung endogener TGA2.1-Proteinmengen bzw. transgener Proteinmengen in Gesamtzellextrakten.....	60

5.5.2	Untersuchung endogener TGA-Proteinmengen bzw. transgener Proteinmengen in Kernextrakten.....	61
5.5.3	Einfluss von Cycloheximid auf die Expression von <i>as-1-GUS</i>	63
5.5.4	Einfluss von Cycloheximid auf die Expression von <i>Nt103</i>	65
5.5.5	Bewertung des Einflusses der Fusionsproteine im Vergleich zum Einfluß der überexprimierten Wildtyp-TGA-Faktoren	66
5.5.6	Einfluss der Fusionsproteine auf die Expression von <i>PR-1a</i>	68
5.5.7	Einfluss der Fusionsproteine auf die Expression des CaMV 35S Promotors.....	69
5.5.8	Untersuchungen zur Expression der endogenen Transkriptmengen von <i>TGA2.1</i> bzw. <i>TGA2.2</i>	71
5.5.8.1	Untersuchung der endogenen Transkriptmengen von <i>TGA2.1</i>	71
5.5.8.2	Untersuchung der endogenen Transkriptmengen von <i>TGA2.2</i>	72
5.5.9	Phänotypische Beobachtungen an Pflanzen, die die Fusionsproteine VP2.1s bzw. 2.2VPs überexprimieren.....	73
5.6	AUSWIRKUNG VON FUSIONSPROTEINEN AUS ENG-SILENCERDOMÄNE UND TGA2.1 BZW. TGA2.2 AUF DIE EXPRESSION VON <i>Nt103</i> NACH SALICYLSÄURE-INDUKTION	75
5.7	AUSWIRKUNG DES VERKÜRZTEN PROTEINS 2.1-57S AUF DIE EXPRESSION VON <i>Nt103</i> NACH SALICYLSÄURE-INDUKTION	76
5.8	UNTERSUCHUNG DER EXPRESSION VON ZIELGENEN IN TRANSGENEN SUSPENSIONSKULTUREN VON <i>N. TABACUM</i>	77
5.8.1	Etablierung von Suspensionskulturen transgener Tabakpflanzen.....	77
5.8.2	Induktionsversuche mit Salicylsäure	77
5.8.2.1	Expressionsverlauf von <i>Nt103</i> nach Salicylsäure-Induktion.....	77
5.8.2.2	Expressionsverlauf von <i>parA</i> nach Salicylsäure-Induktion.....	78
5.8.3	Induktionsversuche mit Auxin.....	79
5.8.3.1	Expressionsverlauf von <i>Nt103</i> nach Auxin-Induktion.....	79
5.8.3.2	Expressionsverlauf von <i>parA</i> nach Auxin-Induktion.....	79
5.8.4	Analyse der <i>in-vitro</i> Bindung von SARP aus Suspensionskulturen.....	81
5.8.4.1	<i>In-vitro</i> -Bindungsaktivität an <i>as-1</i> -ähnliche Elemente in nativen Gesamtzellextrakten	81
5.8.4.2	Nachweis der Proteine TGA2.1 und TGA2.2 in Gesamtzellextrakten (nach JUPIN und CHUA, 1996) von SNN 2.1 ΔN29 #8-Suspensionskulturen	83
5.8.4.3	Einführung eines neuen Protokolls zur Gewinnung von nativen Gesamtzellextrakten (nach KEGLER, unveröffentlicht)	85
5.8.4.4	Einfluss von Natriumfluorid auf das Bindeverhalten an <i>as-1</i> in Suspensionskulturen	86
5.8.4.5	Einfluss von Quercetin auf das Bindeverhalten an <i>as-1</i> in Suspensionskulturen.....	87
6	DISKUSSION	90
6.1	IN BLÄTTERN KOMMT ES NACH SALICYLSÄURE ZUR TRANSIENTEN BINDUNG DER TRANSKRIPTIONSFAKTOREN TGA2.1 UND TGA2.2 AN DAS <i>AS-1</i> -ELEMENT	90
6.1.1	Experimenteller Ansatz	90
6.1.2	Die Menge der Fusionsproteine übersteigt im Kern nicht die Menge der endogenen TGA-Faktoren	91
6.1.3	Direkte Effekte der Fusionsproteine auf die Zielgenexpression	93
6.2	DIE BINDUNG DER FUSIONSPROTEINE ZWISCHEN VP16 UND TGA2.1 BZW. TGA2.2 AN DAS <i>AS-1</i> -ELEMENT IST SALICYLSÄURE-INDUZIERT UND TRANSIENT	95
6.2.1	ASF-1 ist im uninduzierten Zustand mit einem Bindungsinhibitor assoziiert	95
6.2.2	Die Bindungsaktivität von ASF-1 wird durch zwei getrennte Ereignisse reguliert	95

6.2.3	Die transiente Bindung von ASF-1 wird durch einen Salicylsäure-induzierten Bindungsinhibitor gewährleistet.....	97
6.3	DER PROMOTORKONTEXT DER ZIELGENE MODULIERT DEN EINFLUSS <i>AS-1</i> -ÄHNLICHER ELEMENTE AUF DIE TRANSKRIPTION	98
6.3.1	Im Promotor von <i>Nt103</i> übernehmen weitere <i>cis</i> -Elemente regulatorische Funktionen.....	98
6.3.2	Der CaMV 35S Promotor wird durch Cycloheximid-Behandlung hyperaktiviert.....	100
6.4	DIE ENGRAILED-SILENCERDOMÄNE ZEIGT IN FUSION MIT TGA2.1 BZW. TGA2.2 KEINEN REPRESSORISCHEN EFFEKT AUF DIE EXPRESSION VON <i>Nt103</i>	103
6.5	DIE SA-INDUZIERTE <i>AS-1</i> -AKTIVIERUNG IN BLÄTTERN UND SUSPENSIONSZELLEN ERFOLGT IN UNTERSCHIEDLICHER WEISE	103
6.6	AUSBlick	108
7	LITERATUR.....	109
8	ANHANG.....	118
8.1	ABKÜRZUNGEN	118
8.2	SEQUENZEN VERWENDETER NUCLEINSÄUREN.....	121
8.2.1	pSK-VP16.....	121
8.2.2	pENGRAILED	122
8.2.3	pKVPL.....	123
8.2.4	pKENGL.....	123
8.2.5	pK2.1L.....	124
8.2.6	pK2.2L.....	124
8.2.7	pLVPs	124
8.2.8	pLENGs	125
8.2.9	pL2.1s	125
8.2.10	pUC57 2.1-57s.....	125
8.2.11	pUC57 parA	126

1 Zusammenfassung

Salicylsäure (SA) ist für die pflanzliche Pathogenantwort eine Signalsubstanz von entscheidender Bedeutung. In vielen SA-induzierbaren Promotoren findet sich das *cis*-Element *activating sequence 1* (*as-1*). An dem Proteinkomplex ASF-1 / SARP, der an *as-1* und *as-1*-ähnliche Elemente bindet, sind die bZIP-Transkriptionsfaktoren TGA2.1 und TGA2.2 beteiligt. Eine SA-abhängige Veränderung der Bindungseigenschaften von TGA2.1 bzw. TGA2.2 ist ein möglicher Regulationsmechanismus der *as-1*-vermittelten Genexpression.

Ziel dieser Arbeit war die zeitlich aufgelöste Untersuchung der *in-vivo*-Bindungseigenschaften von ASF-1 / SARP in Abhängigkeit von SA. Dazu sollten Fusionsproteine zwischen der konstitutiven Aktivierungsdomäne des viralen Proteins 16 (VP16) aus *Herpes simplex* und den Transkriptionsfaktoren TGA2.1 bzw. TGA2.2 in transgenen Pflanzen überexprimiert werden. Da diese Aktivierungsdomäne einen möglichen SA-regulierten Transaktivierungsschritt ersetzt, können durch die Analyse der Expression von Zielgenen Rückschlüsse auf eine konstitutive oder SA-induzierte Bindung von ASF-1 / SARP gezogen werden. Ferner sollte durch Inhibitorstudien in Tabaksuspensionskulturen die phosphorylierungsabhängige Bindung von ASF-1 / SARP untersucht werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von TGA-Fusionsproteinen mit der VP16-Domäne eine SA-induzierte Steigerung der Expression der Zielgene *as-1-GUS* und *Nt103* zur Folge hat. Demzufolge lässt sich auf eine SA-induzierte Bindung von TGA2.1 und TGA2.2 an das *as-1*-Element schließen. In Gegenwart des Proteinsynthese-Inhibitors Cycloheximid (CHX), der *in-vitro* zur schnellen Verstärkung der Bindeaffinität von ASF-1 / SARP an *as-1* führt, vermittelten die Fusionsproteine nicht die Aktivierung der Zielgene, was impliziert, dass die alleinige CHX-Behandlung *in-vivo* nicht die schnelle Bindung von ASF-1 / SARP zur Folge hat. Dies steht im Widerspruch zu dem 1996 von JUPIN und CHUA aus *in-vitro*-Daten abgeleiteten Modell, nach dem die Behandlung mit SA oder CHX zur Dissoziation eines SARP/Inhibitor-Komplexes führt, was unmittelbar die Bindung an das *as-1*-Element nach sich zieht. Aufgrund der hier gewonnenen Daten wird ein zweiter, SA-spezifischer Aktivierungsschritt der Bindung postuliert, der *in-vitro* bislang nicht gezeigt werden konnte.

In Untersuchungen der SA-induzierten Signaltransduktion in Zellkulturen zeigten sich grundsätzliche Unterschiede zur Situation in Blättern. Die SA-induzierte Expression der Zielgene *Nt103* und *parA* war anders als im Blatt bei Überexpression von TGA2.1 Δ N29 nicht erhöht sondern erniedrigt. Auch die Bindung an das *as-1*-Element war nach SA-Behandlung in Extrakten aus Wildtyp-Zellkulturen nicht wie im Blatt verstärkt sondern verringert.

2 Einleitung

2.1 Die Rolle von Salicylsäure in der pflanzlichen Pathogenabwehr

Höhere Pflanzen sind einer ständigen Bedrohung durch Pathogene ausgesetzt. Sie haben deshalb Mechanismen entwickelt, sich gegen Angriffe von Pathogenen zur Wehr zu setzen. Dabei spielt die schnelle Erkennung des Pathogens durch die Pflanze eine entscheidende Rolle für die effektive Eindämmung des Pathogenwachstums (Resistenz). Der Erkennung nachgeschaltet werden verschiedene Signaltransduktionswege aktiviert, in denen die mobilen Signalstoffe Salicylsäure (SA), Jasmonsäure (JA) und Ethylen Schlüsselkomponenten darstellen (zur Übersicht: DONG, 1998). Da sich diese Arbeit mit der SA-induzierten Genexpression beschäftigt, werden im folgenden insbesondere diese Signaltransduktionsprozesse zusammengefasst.

In resistenten Pflanzen kommt es unmittelbar nach der Erkennung des Pathogens am Ort der Infektion zur Ausprägung der sogenannten Hypersensitiven Reaktion (HR, HAMMOND-KOSACK und JONES, 1996), die das örtlich begrenzte Absterben des Gewebes an der Infektionsstelle zur Folge hat.

Pflanzen, die eine pathogene Erstinfektion überleben, zeigen eine erhöhte Resistenz gegenüber einem breiten Spektrum von Pathogenen (KLESSIG und MALAMY, 1994; MALAMY *et al.*, 1992). Diese Resistenz zeigt sich nicht nur am Ort der Infektion, sondern umfasst die gesamte Pflanze, und wird Systemisch erworbene Resistenz (Systemic Acquired Resistance, SAR; ROSS, 1961) genannt. Sie wird von der Expression definierter PR-Proteine (Pathogenesis Related Proteins) begleitet. Nach Inokulation eines resistenten Tabakkultivars mit dem Tabak Mosaik Virus (TMV) kommt es sowohl in lokalen als auch in systemischen Tabakblättern zu einem Anstieg der SA-Menge um den Faktor 50 bzw. 10 (MALAMY *et al.*, 1990). Da sich durch SA die gleichen PR-Proteine induzieren lassen wie durch Pathogeninfektion (MALECK *et al.*, 2000; UKNES *et al.*, 1993), lag die Bedeutung von SA für die Ausbildung der SAR nahe. Tatsächlich konnte die Notwendigkeit der SA-Akkumulation für die Ausbildung der SAR durch zahlreiche verschiedene Analysen untermauert werden. Transgene Pflanzen (*N. tabacum* und *A. thaliana*), die durch die Überexpression einer bakteriellen Salicylat Hydroxylase (*nahG*) nicht mehr in der Lage sind, SA zu akkumulieren, bilden nach Pathogenbefall keine SAR mehr aus (DELANEY *et al.*, 1994; GAFFNEY *et al.*, 1993). Umgekehrt zeigen Mutanten von *A. thaliana*, die konstitutiv erhöhte SA-Mengen akkumulieren (*ssi1*, SHAH *et al.*, 1999; *lsd1*, 6, 7, DANGL *et al.*, 1996; PETERSON *et al.*, 2000),

eine gesteigerte Resistenz gegenüber bakteriellen und pilzlichen Pathogenen und eine konstitutive *PR*-Genexpression. Insbesondere die Analyse von *Arabidopsis*-Mutanten führte jedoch auch zu der Erkenntnis, dass die Wirkung von SA in der SAR durch JA und Ethylen auf positive und negative Weise beeinflusst wird.

Eine mögliche Schlüsselrolle in der SA-induzierten Signalkette könnte der Interaktion von SA mit Proteinen in der Zelle zukommen. Bislang konnte eine solche Interaktion für zwei verschiedene Proteine SABP (CHEN und KLESSIG, 1991) und SABP2 (DU und KLESSIG, 1997) nachgewiesen werden. Die Bindung von SA und funktionellen Analoga wie Benzothiadiazol (BTH; GÖRLACH *et al.*, 1996) bzw. 2,6-Dichloroisonicotinsäure (INA) korreliert mit dem Potential dieser Substanzen, die SAR auszulösen (CONRATH *et al.*, 1995; DURNER und KLESSIG, 1996; WENDEHENNE *et al.*, 1998).

Höchstwahrscheinlich kann SA durch die Interaktion mit einem oder mehreren Proteinen in der Zelle eine Signaltransduktionskette aktivieren, die zur Transkriptionsaktivierung bestimmter Gene führt. Die Modifikation von Proteinen durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung ist ein häufig anzutreffender Mechanismus in Signaltransduktionsketten. So konnte auch für die SA-induzierte *PR-1*-Genexpression eine Abhängigkeit von Dephosphorylierungsereignissen nachgewiesen werden (CONRATH *et al.*, 1997). Eine mindestens ebenso wichtige Rolle bei der SA-gesteuerten Signaltransduktion scheint Mitogen Aktivierten Protein- (MAP-) Kinasen zuzukommen. In den letzten Jahren wurden mehrere MAP-Kinasen beschrieben, deren Aktivität durch SA induziert wird. Prominentester Vertreter ist die SA-induzierte Protein Kinase (SIPK, ZHANG und KLESSIG, 1997; AtMPK6 in *A. thaliana*, MIZOGUCHI *et al.*, 1995; MIZOGUCHI *et al.*, 1996), die durch SA und deren funktionelle Analoga sowie durch Elicitorbehandlung (ZHANG *et al.*, 1998; ROMEIS *et al.*, 1999) und Verwundung (ZHANG und KLESSIG, 1998) bzw. Applikation exogener NO-Synthase (KUMAR und KLESSIG, 2000) aktiviert wird. Zusammen genommen können die Daten in der Form interpretiert werden, dass verschiedene Signaltransduktionswege gemeinsame Komponenten eines übergeordneten Proteinkomplexes benutzen (ELION, 1998). Auf diese Weise könnte es zu einer Integration bzw. Feinabstimmung (sog. cross-talk) der verschiedenen Signalwege untereinander kommen. Mit Hilfe der Mutante *mpk4* konnte in *A. thaliana* gezeigt werden, dass die gleiche Kinase SA- und Jasmonsäure- (JA) Signalwege in unterschiedlicher Weise beeinflussen kann (PETERSON *et al.*, 2000). MPK4 unterdrückt im uninduzierten Zustand die SAR und ist gleichzeitig notwendig für JA-induzierte Expression bestimmter Gene. Diese MAP-Kinase könnte somit für die Vernetzung verschiedener Signale

von entscheidender Bedeutung sein. Obwohl das Wissen über die Signaltransduktion von SA noch lückenhaft ist, fällt Phosphorylierungs- bzw. Dephosphorylierungsereignissen sicher eine zentrale Bedeutung bei deren Regulation zu, zumal über diese Mechanismen auch Transkriptionsfaktoren direkt modifiziert werden können (z. B. DRÖGE-LASER *et al.*, 1997).

2.2 *As-1* ist ein *cis*-Element in Promotoren pflanzlicher Abwehrgene, das Salicylsäure-Induzierbarkeit vermittelt

Durch SA-Applikation wird die Expression zahlreicher Gene induziert, die auch in der Pathogenabwehr involviert sind (MALECK *et al.*, 2000; SCHENK *et al.*, 2000). Man unterscheidet bei SA-induzierten Genen zwischen frühen Genen, für deren transiente Induktion nach SA keine Proteinneusynthese notwendig ist, und späten Genen, deren Expression erst nach etwa sieben bis zwölf Stunden einsetzt und strikt von Proteinneusynthese abhängt. Zu den frühen Genen zählen insbesondere Glutathion *S*-Transferasen (GSTs, BOOT *et al.*, 1993), Glucosyltransferase(n) (HORVATH und CHUA, 1996) und weitere, zum Teil noch nicht näher charakterisierte Gene (HORVATH *et al.*, 1998; SCHENK *et al.*, 2000), für die aber diskutiert wird, dass sie eine Bedeutung für die späte Antwort haben könnten. Auch einige Promotoren von pflanzlichen Pathogenen (*nos*-Promotor aus *A. tumefaciens*, LAM *et al.*, 1990; *ocs*-Promotor aus *A. tumefaciens*, BOUCHEZ *et al.*, 1989; FROMM *et al.*, 1989; CaMV 35S Promotor, QIN *et al.*, 1994) zeigen eine SA-Induzierbarkeit. In diesen Promotoren wurde zuerst die *activator sequence-1* (*as-1*, auch als *ocs*-Element bezeichnet) als *cis*-Element identifiziert, das die SA-Induzierbarkeit unabhängig von Proteinneusynthese (QIN *et al.*, 1994) vermittelt. Das *as-1*-Element des CaMV 35S Promotors besteht aus zwei nicht perfekten TGACGTCA-Palindromen, die durch eine 4 bp lange Sequenz getrennt sind. Der *Cauliflower Mosaic Virus* (CaMV) 35S Promotor ist in seiner vollen Länge konstitutiv in nahezu allen Pflanzenteilen aktiv (ODELL *et al.*, 1985). Nach Verkürzung des Promotors auf einen Bereich von -90 bp bis zum Transkriptionsstart (Domäne A, enthält das *as-1*-Element und die TATA-Box) kommt es zur Aktivierung nur noch in Wurzelspitzen, Kalluszellen und Protoplasten (BENFEY *et al.*, 1989; FROMM *et al.*, 1989), bzw. durch SA (QIN *et al.*, 1994) und Auxin (NIGGEWEG *et al.*, 2000a). In vielen der zuvor genannten SA-induzierbaren Gene wurden ebenfalls *as-1*-ähnliche Sequenzen gefunden (CHEN *et al.*, 1996; ELLIS *et al.*, 1993; ULMASOV *et al.*, 1994; VAN DER ZAAL *et al.*, 1996). Zu den aus *N. tabacum* isolierten Genen dieser Klasse zählen z. B. *Nt103* (VAN DER ZAAL *et al.*, 1987) und *parA* (*protoplast auxin-regulated*, TAKAHASHI *et al.*, 1989 = Nt114, VAN DER ZAAL *et al.*, 1987), die aus BY2-Zellsuspensionen bzw. aus Protoplasten isoliert wurden, und die

sowohl durch SA als auch durch Auxin, JA und H₂O₂ induzierbar sind (BOOT *et al.*, 1993; TAKAHASHI *et al.*, 1990; XIANG *et al.*, 1996; NIGGEWEG *et al.*, 2000a). Für beide Promotoren konnten durch Deletions- bzw. Mutationsanalysen *as-1*-ähnliche Sequenzen als notwendig und ausreichend für die Induzierbarkeit durch SA bzw. Auxin identifiziert werden (DROOG *et al.*, 1995; SAKAI *et al.*, 1998; TAKAHASHI *et al.*, 1990; TAKAHASHI *et al.*, 1995a). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Stärke von *as-1* bzw. *as-1*-ähnlicher Elemente abhängig von der Übereinstimmung mit der *as-1*-Konsensussequenz ist (QIN *et al.*, 1994; VAN DER ZAAL *et al.*, 1996).

Die Genprodukte der Gene *Nt103* und *parA* zeigen GST-Aktivität (DROOG *et al.*, 1993; TAKAHASHI *et al.*, 1995b). Da eine Reihe von GSTs durch SA-Behandlung induzierbar sind, liegt eine Bedeutung dieser Enzyme in der Pathogenantwort nahe (ZHANG und SINGH, 1994). Durch Überexpression einer Glutathion S-Transferase/Glutathion Peroxidase konnte z. B. der schädigende Effekt von ROS drastisch gesenkt werden (ROXAS *et al.*, 2000). Da die GST-Aktivität des *parA*-Genprodukts aber deutlich unter der des *Nt103*-Genprodukts liegt (DROOG *et al.*, 1993; TAKAHASHI *et al.*, 1995a), wurde für ParA bereits früh vermutet, es könnte weitere noch nicht näher charakterisierte Funktionen in der Zelle übernehmen. Subzelluläre Lokalisationsstudien deuten z. B. auf eine Funktion im Nucleus hin (TAKAHASHI *et al.*, 1995a).

Unter den späten SA-induzierten Genen in *N. tabacum* ist vor allem *PR-1a* (MALAMY *et al.*, 1990) zu nennen. Nach exogener SA-Applikation bzw. Pathogeninfektion kommt es in Abhängigkeit von Proteinneusynthese zur Induktion von *PR-1a* (QIN *et al.*, 1994). Durch Deletionsanalysen konnte auch im Promotor von *PR-1a* ein *as-1*-ähnliches Element für die SA-Induzierbarkeit verantwortlich gemacht werden (STROMPEN *et al.*, 1998). Die Abhängigkeit von Proteinneusynthese lässt jedoch vermuten, dass das *as-1*-ähnliche Element nicht allein die starke Induktion von *PR-1a* bewerkstelligen kann. Frühere Arbeiten haben außerdem gezeigt, dass ein Minimalpromotor bestehend aus dem *as-1*-Element und einer TATA-Box die SA-abhängige Transkription eines Reportergens weniger stark induzieren kann, als ein *as-1*-ähnliches Element im Promotorkontext z. B. von *PR-1a* (QIN *et al.*, 1994). Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass *as-1* in synergistischer Weise mit anderen *cis*-Elementen zusammenwirken kann.

Durch genetische Screens auf die unterdrückte Expression von *PR-1* in *A. thaliana* konnten mehrere Mutanten des Gens NPR1 identifiziert werden (CAO *et al.*, 1994). NPR1 codiert für ein Protein, das sich durch eine Ankyrin-Repeat-Domäne auszeichnet, die essentiell für seine Funktion in der SAR ist (CAO *et al.*, 1997). Im Hefe Two-Hybrid-System konnte nachgewiesen werden, dass NPR1 mit einer Reihe von TGA-Faktoren aus *A. thaliana* (DESPRES *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 1999; ZHOU *et al.*, 2000) und aus *N. tabacum* (NIGGEWEG *et al.*, 2000b) interagiert. Diese bZIP-Proteine wiederum binden über ihre basische Domäne an das *as-1*-ähnliche Element im *PR-1*-Promotor (LEBEL *et al.*, 1998). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von NPR1 die Bindung distinkter TGA-Faktoren an dieses *as-1*-ähnliche Element im Electro mobility shift assay (EMSA) erhöht, ohne selbst Bestandteil des Bindekomplexes zu sein (DESPRES *et al.*, 2000). Zusammengenommen mit der Beobachtung, dass es nach SA-Behandlung zur Anreicherung von NPR1 im Zellkern kommt und es bei Retention von NPR1 im Cytoplasma nicht zur *PR-1*-Induktion kommt (KINKEMA *et al.*, 2000), unterstützen diese Daten die Annahme, dass NPR1 die Bindung der TGA-Faktoren nach SA-Stimulus auch *in-vivo* reguliert. Es ist aber nicht geklärt, ob die alleinige Anreicherung von NPR1 hinreichend für die Bindungsregulation ist, oder ob weitere (posttranslationale) Modifikationen notwendig sind. Die Rolle von NPR1 in der frühen SA-induzierten Antwort ist darüber hinaus nicht geklärt.

2.3 ASF-1 und die Familie der TGA-Transkriptionsfaktoren

Im Jahr 1989 wurde erstmals ein Proteinkomplex aus Kernextrakten von *N. tabacum* beschrieben, der an das *as-1*-Element des 35S Promotors des *Cauliflower Mosaic Virus* bzw. das *ocs*-Element im Promotor des Octopinsynthase-Gens aus *A. tumefaciens* bindet und als ASF-1 (Activating sequence factor 1) bezeichnet wurde (FROMM *et al.*, 1989; KATAGIRI *et al.*, 1989). Eine entsprechende Bindeaktivität kann auch in Gesamtzellextrakten nachgewiesen werden und wird in diesem Fall SARP (Salicylic acid responsive protein) genannt (JUPIN und CHUA, 1996). Für beide Faktoren konnte eine SA-abhängige Verstärkung der Bindeaktivität im EMSA gezeigt werden (JUPIN und CHUA, 1996; STANGE *et al.*, 1997).

Als erstes *as-1*-bindendes Protein wurde der bZIP-Transkriptionsfaktor TGA1a isoliert (KATAGIRI *et al.*, 1989). TGA1a zeichnet sich durch eine hochkonservierte bZIP-Region aus, die in ihrem basischen Bereich durch die Ausbildung einer α -Helix die Bindung an DNA gewährleistet (VINSON *et al.*, 1989). Der Leucin-Zipper ermöglicht über eine coiled-coil-Struktur die Dimerisierung zweier TGA-Faktoren (LANDSCHULZ *et al.*, 1988).

Bei Überexpression eines mutierten Derivats von TGA1a, das bindungsunfähig aber weiterhin in der Lage ist, über seinen Leucin-Zipper Dimere mit anderen bZIP-Proteinen der TGA-Klasse zu bilden, konnte die Bindeaktivität von ASF-1 reduziert werden (MIAO und LAM, 1995; RIEPING *et al.*, 1994). TGA1a oder heterodimerisierende TGA-Faktoren sind demnach integraler Bestandteil von ASF-1 und binden nur in Form eines Dimers an ein Palindrom des *as-1*-Elements (KATAGIRI *et al.*, 1992). Das *as-1*-Element kann also insgesamt von zwei Dimeren aus TGA-Faktoren erkannt werden. Die Dimerisierung von TGA1a wird durch den C-terminalen Bereich unterstützt (KATAGIRI *et al.*, 1992), der zusätzlich über eine glutaminreiche Region verfügt. Entgegen der Hypothese von KATAGIRI *et al.* (1989), trägt nicht diese sondern eine saure Domäne im N-terminalen Bereich zur Transkriptionsaktivierung bei (NEUHAUS *et al.*, 1994; PASCUZZI *et al.*, 1998).

Es konnte nachgewiesen werden, dass es im nicht induzierten Zustand der Zelle im C-terminalen Bereich von TGA1a zur Interaktion mit einem 120 kDa großen Protein kommt (JOHNSON *et al.*, 2001). Durch Behandlung mit Auxin kommt es zur Dissoziation des Komplexes. Unter der Annahme, dass es sich bei dem 120 kDa-Protein um einen Inhibitor handelt, könnte auf diese Weise eine Bindungsregulation von TGA1a bewerkstelligt werden.

Mit Hilfe von EMSAs konnte in Kernextrakten von Tabakblättern TGA1a jedoch nicht in ASF-1 detektiert werden (LAM und LAM, 1995; NIGGEWEG *et al.*, 2000a). Dies könnte an der niedrigen Expression von TGA1a in Blattgewebe liegen (NIGGEWEG *et al.*, 2000b), denn die Injektion von rekombinantem TGA1a-Protein führt zur Transkription eines *as-1*-kontrollierten Reportergens (PASCUZZI *et al.*, 1998).

Neben TGA1a konnten weitere Transkriptionsfaktoren isoliert werden, die an das *as-1*-Element binden. In *A. thaliana* sind bislang sieben TGA-Faktoren beschrieben (TGA1 bis TGA6 und PERIANTHIA, CHUANG *et al.*, 1999; KAWATA *et al.*, 1992; MIAO *et al.*, 1994; SCHINDLER *et al.*, 1992; XIANG *et al.*, 1997; ZHANG *et al.*, 1993). Die aus *N. tabacum* bekannten TGA-Faktoren werden gemäß der Ähnlichkeit zu den TGA-Faktoren aus *A. thaliana* in die für diese Spezies vorgeschlagenen Klassen (XIANG *et al.*, 1997) eingeordnet: TGA1a und PG13 (FROMM *et al.*, 1991) zählen zur Klasse I, TGA2.1 (NIGGEWEG und GATZ, 1997) und TGA2.2 (NIGGEWEG *et al.*, 2000b) zur Klasse II, und TGA7 (SCHIERMEYER, unveröffentlicht) bildet aufgrund seines langen N-Terminus eine eigene Klasse. TGA7 zeigt aber insbesondere im C-terminalen Bereich große Ähnlichkeit zu den TGA-Faktoren der Klasse II.

Die Klasse II TGA-Faktoren TGA2.1 und TGA2.2 aus *N. tabacum* weisen im C-terminalen und im bZIP-Bereich mit 87 % eine sehr starke Homologie auf (NIGGEWEG, 1999). Beide Faktoren unterscheiden sich jedoch in ihrer N-terminalen Domäne. Dem 170 Aminosäuren langen N-Terminus von TGA2.1 konnte im Hefe Two-Hybrid-System eine Transaktivierungsfunktion zugewiesen werden (NIGGEWEG *et al.*, 2000b). Für TGA2.2 konnte in Hefe kein Aktivierungspotential nachgewiesen werden.

TGA2.2 bildet als *in-vitro*-Kotranslatat mit TGA2.1 bzw. TGA1a im EMSA bereitwillig bindende Heterodimere wie auch Homodimere aus, die sowohl eine als auch beide Halbseiten des *as-1*-Elements besetzen können (NIGGEWEG, 1999; NIGGEWEG *et al.*, 2000b). In analogen Versuchen konnte auch die Heterodimerisierung von TGA2.1 mit TGA1a nachgewiesen werden, wenn auch mit deutlich geringerer Bindeaffinität. TGA2.1-Homodimere sind nur in der Lage, in Form von zwei Dimeren an das *as-1*-Element zu binden. Für diesen Effekt konnte in EMSA-Versuchen mit Deletionsderivaten der N-Terminus von TGA2.1 verantwortlich gemacht werden (KRAWCZYK, 1999; NIGGEWEG *et al.*, 2000b).

Ferner konnte durch Northernblot-Analysen gezeigt werden, dass *TGA2.1* und *TGA2.2* sowohl in Blättern als auch in Wurzeln exprimiert werden (NIGGEWEG *et al.*, 2000b). Die relative Expressionsstärke unterscheidet sich für beide Faktoren nicht zwischen Wurzel und Blatt, die *TGA2.1*-mRNA ist in beiden Geweben jedoch etwa 4 – 5 mal häufiger anzutreffen als die *TGA2.2*-mRNA. In Blättern konnten beide Faktoren im Kern nachgewiesen werden. In Gesamtzellextrakten war nur der Nachweis von TGA2.1 möglich (NIGGEWEG, 1999).

Durch Supershift-Analysen mit spezifischen Antisera gegen TGA2.1, TGA2.2 und TGA1a konnte TGA2.2 als die Hauptkomponente von SARP bzw. ASF-1 (s. o.) in Blättern identifiziert werden (NIGGEWEG *et al.*, 2000a). Demnach ist in Kernen TGA2.2 etwa 6 – 7 mal stärker in ASF-1 vertreten wie TGA2.1. In Gesamtzellextrakten ist dieses Verhältnis nur etwa halb so stark.

Die *in-vivo*-Relevanz dieser Ergebnisse wird durch Studien an transgenen Pflanzen unterstrichen, die jeweils einen der beiden TGA-Faktoren überexprimieren. Beide Pflanzen zeigen eine verstärkte Expression des *as-1*-kontrollierten Zielgens *Nt103* nach SA- bzw. 2,4-D-Behandlung. Umgekehrt führt die Überexpression transdominanter Suppressorvarianten beider Faktoren in transgenen Pflanzen zur verringerten Expression des Zielgens (NIGGEWEG *et al.*, 2000a; KEGLER, unveröffentlicht). Nur die transdominante Variante von TGA2.2 zeigt einen deutlichen (negativen) Einfluss auf die *PR-1a*-Expression nach SA-Applikation. In TGA2.2-überexprimierenden Pflanzen konnte lediglich ein marginaler positiver Effekt auf *PR-1a* nachgewiesen werden.

Im Hefe Two-Hybrid-System konnte die Interaktion von TGA2.1 und TGA2.2 mit NPR1 aus *A. thaliana* (NIGGEWEG *et al.*, 2000b) und *N. tabacum* (THUROW, unveröffentlicht) nachgewiesen werden. Wie bereits erwähnt, könnte diese Interaktion möglicherweise für die ASF-1-Bindungsverstärkung verantwortlich sein, die nach SA-Applikation nachgewiesen werden konnte (JUPIN und CHUA, 1996). Für diese Bindungsregulation konnte gezeigt werden, dass Phosphorylierungsereignisse sich positiv auf die Bindung auswirken, während Dephosphorylierung die Bindung von ASF-1 bzw. SARP verhindert (JUPIN und CHUA, 1996; STANGE *et al.*, 1997).

Alternativ bzw. zusätzlich könnte ASF-1 im Komplex mit einem Inhibitor der Bindung SAI assoziiert vorliegen, der nach SA-Induktion dissoziiert, was die Bindung von ASF-1 an das *as-1*-Element ermöglicht (JUPIN und CHUA, 1996). Dafür sprechen Daten, wonach dissozzierende Agenzien die Bindung an das *as-1*-Element fördern. Als möglicher Kandidat für diesen Inhibitor kommt ein Protein in Frage, das in ähnlicher Weise wirkt, wie der für TGA1a postulierte Bindungsinhibitor (JOHNSON *et al.*, 2001). Da alle TGA-Faktoren trotz distinkter Unterschiede eine relativ hohe Homologie im Bereich des C-Terminus teilen, könnte es sich hierbei um einen generelleren Regulationsmechanismus der Bindung von TGA-Faktoren handeln. Verschiedene Inhibitormoleküle könnten für die reizspezifische Freigabe verschiedener aktivierender TGA-Faktoren verantwortlich sein.

Da in unserem Labor trotz intensiver Bemühungen die SA-induzierte Bindungsverstärkung nicht im EMSA gezeigt werden konnte, besteht außerdem die Möglichkeit eines alternativen Modells, wonach ASF-1 konstitutiv an das *as-1*-Element bindet, die SA-induzierte Aktivierung der Transkription jedoch erst durch Interaktion des gebundenen Komplexes mit einem Koaktivator erfolgt. Beide Modelle sind vergleichend in Abbildung 2-1 dargestellt.

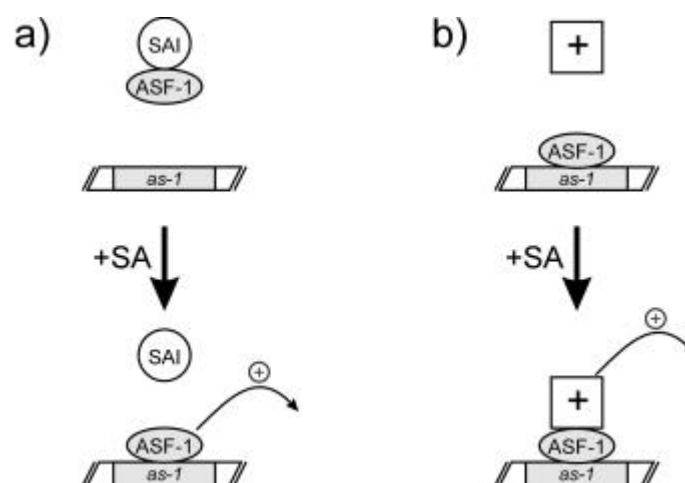


Abbildung 2-1: Alternative Modelle der SA-induzierten Transkriptionsaktivierung an *as-1*. a) Modell der SA-induzierten Dissoziation eines SAI/ASF-1-Komplexes und / oder der Bindungsverstärkung durch NPR1. b) Modell der konstitutiven Bindung an *as-1* und der Aktivierung durch einen Koaktivator [+].

2.4 Zielsetzung und experimenteller Ansatz der Arbeit

Die Komponenten der auf dem *as-1*-Element mündenden SA-Signaltransduktionskette stehen im Mittelpunkt unseres Forschungsinteresses. Durch die Identifikation der Hauptbestandteile von ASF-1 / SARP in *N. tabacum* stehen in der Arbeitsgruppe mit TGA2.1 und TGA2.2 zwei wichtige Endkomponenten der Signalkette zur Verfügung. Die Regulation der Transaktivierung durch ASF-1 stellt den letzten möglichen Kontrollpunkt der Signaltransduktionskette dar. Das Verständnis dieser Regulation ist deshalb wichtig für die Aufklärung der gesamten SA-gesteuerten Signaltransduktion.

Bislang wurde das Bindungsverhalten von ASF-1 bzw. SARP nach SA-Behandlung nur anhand von *in-vitro*-Bindungsstudien untersucht. Eine Analyse der *in-vivo*-Situation stand noch aus.

Um die *in-vivo*-Bindungseigenschaften von ASF-1 näher zu untersuchen, sollten Fusionsproteine bestehend aus TGA2.1 bzw. TGA2.2 und der konstitutiven Aktivierungsdomäne des viralen Proteins 16 (VP16) aus *Herpes simplex* in transgenen Tabakpflanzen überexprimiert werden. Zu Beginn der Arbeit war nicht eindeutig geklärt, ob es nach SA-Induktion *in-vivo* zur induzierten Bindung der TGA-Faktoren an das *as-1*-Element kommt, oder ob die TGA-Faktoren konstitutiv gebunden vorliegen und die Aktivierung der Transkription durch die Rekrutierung eines Koaktivators geschieht. Durch die Analyse der Transkription verschiedener potentieller Zielgene von TGA2.1 und TGA2.2 sollten die Bindungseigenschaften der beiden TGA-Faktoren in Abhängigkeit von SA aufgeklärt werden. Die VP16-Aktivierungsdomäne der Fusionsproteine sollte bei konstitutiver Bindung der TGA-Faktoren bereits im uninduzierten Zustand zur Aktivierung der Zielgene führen. Auf diese Weise sollte insbesondere das postulierte Modell von JUPIN und CHUA, 1996 überprüft werden.

An transgenen Tabaksuspensionskulturen sollten ergänzende Studien bezüglich der Rolle von TGA2.1 bei der SA-induzierten, frühen Genexpression durchgeführt werden, wobei besonders die Möglichkeit genutzt werden sollte, mit Phosphatase- bzw. Kinase-Inhibitoren den Einfluß von Phosphorylierung auf die Bindung von ASF-1 / SARP zu untersuchen.

3 Material

3.1 Organismen

3.1.1 Bakterienstämme

Bakterium	Eigenschaften	Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	recA1 relA1 thi-1 Δ lacU169 ϕ 80 (lacZ Δ M15) hsdR17(r _k -m _k +), Klonier- und Sequenzierstamm	HANAHAN, 1983
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI ^q Δ M15 Tn10 (tet ^r)], Klonier- und Sequenzierstamm	BULLOCK <i>et al.</i> , 1987
<i>Escherichia coli</i> XL2-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI ^q Δ M15 Tn10 (tet ^r) amy cam ^r], Klonier- und Sequenzierstamm	Stratagene
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58-C1-R pGV2660	Rif ^r , Cm ^r	DEBLAERE <i>et al.</i> , 1985

3.1.2 Pflanzen

Es wurden ausschließlich *Nicotiana tabacum*-Pflanzen vom Kultivar Samsun NN (SNN) verwendet. Folgende transgene Pflanzen wurden eingesetzt:

Pflanze	Eigenschaften	Referenz
Hö as-1-GUS	CaMV 35S:: <i>tetR</i> , <i>as-1-GUS</i> , Km ^r , Ppt ^r	GATZ, unveröffentlicht
SNN 2.1	CaMV 35S:: <i>TGA2.1</i> , Hyg ^r	KEGLER, unveröffentlicht
SNN 2.1 Δ N29	CaMV 35S:: <i>TGA2.1</i> Δ N29, Hyg ^r	KEGLER, unveröffentlicht
SNN 2.1-57s	CaMV 35S:: <i>TGA2.1-57</i> , Hyg ^r	5.2.2.5
SNN 2.1ENGs	CaMV 35S:: <i>TGA2.1-ENG</i> , Hyg ^r	5.2.2.4
SNN 2.1trD	CaMV 35S:: <i>TGA2.1trD</i> , Hyg ^r	KEGLER, unveröffentlicht
SNN 2.1VPs	CaMV 35S:: <i>TGA2.1-VP16</i> , Hyg ^r	5.2.2.3
SNN 2.2	CaMV 35S:: <i>TGA2.2</i> , Hyg ^r	NIGGEWEG, 1999: SNN TGA2.2 UE
SNN 2.2ENGs	CaMV 35S:: <i>TGA2.2-ENG</i> , Hyg ^r	5.2.3.2
SNN 2.2VPs	CaMV 35S:: <i>TGA2.2-VP16</i> , Hyg ^r	5.2.3.1
SNN as-1-GUS	<i>as-1-GUS</i> , Ppt ^r	GATZ, unveröffentlicht
SNN ENG2.1s	CaMV 35S:: <i>ENG-TGA2.1</i> , Hyg ^r	5.2.2.2
SNN VP2.1s	CaMV 35S:: <i>VP16-TGA2.1</i> , Hyg ^r	5.2.2.1
SNN VP2.2s	CaMV 35S:: <i>VP16-TGA2.2</i> , Hyg ^r	CZEKO, 2000

3.2 Nucleinsäuren

3.2.1 Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pBHTX-2.1-57s	enthält ein 1111 bp großes <i>KpnI</i> / <i>XbaI</i> -Insert aus pUC57 2.1-57s in pBINHyg-TX, Km ^r	4.3.7.15
pBHTX-2.1ENGs	enthält ein 2375 bp großes <i>KpnI</i> / <i>StuI</i> -Insert aus pUC57 2.1ENGs zwischen <i>KpnI</i> und <i>SmaI</i> in pBINHyg-TX, Km ^r	4.3.7.15
pBHTX-2.1VPs	enthält ein 1856 bp großes <i>KpnI</i> / <i>StuI</i> -Insert aus pUC57 2.1VPs zwischen <i>KpnI</i> und <i>SmaI</i> in pBINHyg-TX, Km ^r	4.3.7.15
pBHTX-2.2ENGs	enthält ein 1973 bp großes <i>KpnI</i> / <i>XbaI</i> -Insert aus pSK 2.2ENGs in pBINHyg-TX, Km ^r	4.3.7.15
pBHTX-2.2VPs	enthält ein 1454 bp großes <i>KpnI</i> / <i>XbaI</i> -Insert aus pSK 2.2VPs in pBINHyg-TX, Km ^r	4.3.7.15
pBHTX-ENG2.1s	enthält ein 2365 bp großes <i>KpnI</i> / <i>StuI</i> -Insert aus pUC57 ENG2.1s zwischen <i>KpnI</i> und <i>SmaI</i> in pBINHyg-TX, Km ^r	4.3.7.15
pBHTX-VP2.1s	enthält ein 1846 bp großes <i>KpnI</i> / <i>StuI</i> -Insert aus pUC57 VP2.1s zwischen <i>KpnI</i> und <i>SmaI</i> in pBINHyg-TX, Km ^r	4.3.7.15
pBINHyg-TX	Derivat des binären Pflanzentransformationsvektors pBINHyg, enthält den TX-Promotor und die Terminatorsequenz pAnos, Km ^r	RIEPING <i>et al.</i> , 1994
pENGRAILED	enthält ein 1706 bp großes Fragment bestehend aus (5' → 3') CaMV 35S Promotor – TMV-omega-leader – ENGRAILED-Silencerdomäne – polyA-Signal in pUC, Amp ^r	WERR, unveröffentlicht
pK2.1L	enthält ein 1407 bp großes <i>KpnI</i> / <i>BamHI</i> -Fragment bestehend aus (5' → 3') Kozak-Sequenz – TGA2.1-Peptidlinkersequenz in pUC57, Amp ^r	4.3.7.3
pK2.2L	enthält ein 1015 bp großes <i>KpnI</i> / <i>BamHI</i> -Fragment bestehend aus (5' → 3') Kozak-Sequenz – TGA2.2-Peptidlinkersequenz in pSK, Amp ^r	4.3.7.4
pKENGL	enthält ein 959 bp großes PCR-Fragment bestehend aus (5' → 3') Kozak-Sequenz – ENGRAILED-Silencerdomäne – Peptidlinkersequenz in pUC57, Amp ^r	4.3.7.2
pKVPL	enthält ein 405 bp großes PCR-Fragment bestehend aus (5' → 3') Kozak-Sequenz – VP16-Aktivierungsdomäne – Peptidlinkersequenz in pUC57, Amp ^r	4.3.7.1
pL2.1s	enthält ein 1422 bp großes <i>BamHI</i> -Fragment bestehend aus (5' → 3') Peptidlinkersequenz – TGA2.1 – Streptag® II-Sequenz in pUC57, Amp ^r	4.3.7.7
pLENGs	enthält ein 947 bp großes <i>BamHI</i> -Fragment bestehend aus (5' → 3') Peptidlinkersequenz – ENGRAILED-Silencerdomäne – Streptag® II-Sequenz in pUC57, Amp ^r	4.3.7.6

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pLVPs	enthält ein 433 bp großes <i>Bam</i> HI-Fragment bestehend aus (5' → 3') Peptidlinkersequenz – <i>VP16</i> -Aktivierungsdomäne – Streptag® II-Sequenz in pUC57, Amp ^r	4.3.7.5
pSK	lacZ α , Amp ^r , Klonier- und Sequenziervektor	Stratagene
pSK 2.2ENGs	enthält die 1944 bp lange Codierregion für ein Fusionsprotein bestehend aus TGA2.2 – ENGRAILED-Silencerdomäne – Streptag® II in pSK, Amp ^r	4.3.7.13
pSK 2.2VPs	enthält die 1425 bp lange Codierregion für ein Fusionsprotein bestehend aus TGA2.2 – <i>VP16</i> -Aktivierungsdomäne – Streptag® II in pSK, Amp ^r	4.3.7.12
pSK TGA2.1 in vitro	enthält <i>TGA2.1</i> -cDNA aus <i>N. tabacum</i> mit Kozaksequenz vor dem ATG (AACCATG) unter der Kontrolle des T7 RNA-Polymerase-Promotors und 3'UTR, Amp ^r	NIGGEWEG, 1999
pSK TGA2.2 in vitro	enthält <i>TGA2.2</i> -cDNA aus <i>N. tabacum</i> mit Kozaksequenz vor dem ATG (AACCATG) unter der Kontrolle des T7 RNA-Polymerase-Promotors, Amp ^r	NIGGEWEG, 1999
pSK-2811 PCR	enthält die vollständige, 980 bp lange cDNA von <i>TGA2.2</i> aus <i>N. tabacum</i> , Amp ^r	NIGGEWEG, 1999
pSKTGA2.1-57	enthält eine 5'-verkürzte cDNA-Sequenz von <i>TGA2.1</i> , die einer N-terminalen Deletion des Proteins um 113 AS entspricht, Amp ^r	KRAWCZYK, 1999
pSK-VP16	enthält ein 400 bp großes PCR-Produkt der <i>VP16</i> -Aktivierungsdomäne aus <i>Herpes simplex</i> , Amp ^r	NIGGEWEG, unveröffentlicht
pTGA2.1	enthält die vollständige cDNA-Sequenz von <i>TGA2.1</i> aus <i>N. tabacum</i> mit 3'-fusionierter Sequenz für den Streptag® II in pUC57, Amp ^r	KEGLER, unveröffentlicht
pTGA2.1 trD II	enthält die komplette cDNA-Sequenz für eine bindungsinhibierte Mutante von <i>TGA2.1</i> , die in ihrer basischen Domäne zwei Aminosäureaustausche (AA → PP) aufweist, Amp ^r	KEGLER, unveröffentlicht
pUC18	lacZ α , Amp ^r , Klonier- und Sequenziervektor	YANISCH-PERRON <i>et al.</i> , 1985
pUC18 as-1 BpI	enthält das <i>as-1</i> -Element des CaMV 35S Promotors als PCR-Fragment, verwendbar als <i>Bp</i> I-Fragment (<i>as-1-short</i>), Amp ^r	KEGLER, unveröffentlicht
pUC18- <i>as-1</i>	enthält das <i>as-1</i> -Element des CaMV35S Promotors in <i>Xba</i> I, Amp ^r	THUROW, unveröffentlicht
pUC18- <i>as-103</i>	enthält das <i>as-1</i> -Element des Promotors von <i>Nt103</i> in <i>Xba</i> I, Amp ^r	3.2.5.1
pUC18- <i>pas-a</i>	enthält das <i>as-1</i> -Element des Promotors von <i>parA</i> in <i>Xba</i> I, Amp ^r	3.2.5.2
pUC57	lacZ α , Amp ^r , Klonier- und Sequenziervektor	MARCHUK <i>et al.</i> , 1990

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pUC57 2.1-57s	enthält eine 5'-verkürzte cDNA-Sequenz von <i>TGA2.1</i> , die einer N-terminalen Deletion des Proteins um 113 AS entspricht, mit 3'-fusionierter Streptag® II-Sequenz in pUC57, Amp ^r	4.3.7.14
pUC57 2.1ENGs	enthält die 2343 bp lange Codierregion für ein Fusionsprotein bestehend aus TGA2.1 – ENGRAILED-Silencerdomäne – Streptag® II in pUC57, Amp ^r	4.3.7.11
pUC57 2.1VPs	enthält die 1818 bp lange Codierregion für ein Fusionsprotein bestehend aus TGA2.1 – VP16-Aktivierungsdomäne – Streptag® II in pUC57, Amp ^r	4.3.7.10
pUC57 ENG2.1s	enthält die 2337 bp lange Codierregion für ein Fusionsprotein bestehend aus ENGRAILED-Silencerdomäne – TGA2.1 – Streptag® II in pUC57, Amp ^r	4.3.7.9
pUC57 <i>parA</i>	enthält ein 696 bp großes cDNA-Fragment der kompletten Codierregion von <i>parA</i> in pUC57/T, Amp ^r	4.3.3
pUC57 VP2.1s	enthält die 1812 bp lange Codierregion für ein Fusionsprotein bestehend aus VP16-Aktivierungsdomäne – TGA2.1 – Streptag® II in pUC57, Amp ^r	4.3.7.8
pUC57/T	pUC57-Derivat, lacZ, Amp ^r , mit <i>Eco32I</i> linearisiert und ddT-Überhängen an den 3'-Enden versehen, Klonier- und Sequenziervektor	MARCHUK <i>et al.</i> , 1990

3.2.2 Hybridisierungs sonden

Sonde	Eigenschaften	Referenz
<i>ENG</i>	946 bp <i>Bam</i> HI-Fragment aus pLENGs (3.2.1) = cDNA der Silencerdomäne von <i>ENGRAILED</i> aus <i>Drosophila melanogaster</i>	POOLE <i>et al.</i> , 1985
<i>GUS</i>	2 kb <i>Sac</i> I-Fragment aus pGUS = cDNA-Sequenz der β -Glucuronidase (ohne Intron)	KÖSTER-TÖPFER <i>et al.</i> , 1989
<i>Nt103</i>	1 kb <i>Eco</i> RI-Fragment aus dem Vektor pCNT103 = vollständige cDNA des Gens <i>Nt103</i> aus <i>N. tabacum</i> . (pCNT103 wurde von E.J. VAN DER ZAAL zur Verfügung gestellt)	VAN DER ZAAL <i>et al.</i> , 1991
<i>parA</i>	715 bp Fragment <i>Xba</i> I / <i>Bam</i> HI-Fragment aus dem Vektor pUC57 <i>parA</i> (s. 3.2.1) = vollständige cDNA des <i>protoplast auxin regulated</i> -Gens aus <i>N. tabacum</i>	TAKAHASHI <i>et al.</i> , 1989
<i>PR-1a</i>	531 bp <i>Eco</i> RI / <i>Bam</i> HI-Fragment der cDNA des <i>pathogenesis-related protein 1a</i> von <i>N. tabacum</i> aus dem Vektor pPR-1a; (pPR-1a wurde von M. DRÖGE zur Verfügung gestellt)	CUTT <i>et al.</i> , 1988
<i>tetR</i>	0,7 kb <i>Xba</i> I-Fragment aus pTet1 = cDNA des Tn10-codierten Tetracyclin-Repressors	GATZ <i>et al.</i> , 1991
<i>TGA2.1</i>	1,3 kb <i>Kpn</i> I / <i>Bam</i> HI-Fragment aus dem Vektor pSK-TGA2.1 in vitro = vollständige cDNA des <i>TGA2.1</i> -Gens aus <i>N. tabacum</i> (pSK-TGA2.1 in vitro wurde von R. NIGGEWEG zur Verfügung gestellt)	NIGGEWEG und GATZ, 1997

Sonde	Eigenschaften	Referenz
TGA2.2	1,0 kb <i>KpnI</i> / <i>BamHI</i> -Fragment aus dem Vektor pSK-TGA2.2 in vitro = vollständige cDNA des TGA2.2-Gens aus <i>N. tabacum</i> (pSK-TGA2.2 in vitro wurde von R. NIGGEWEG zur Verfügung gestellt)	NIGGEWEG, 1999
VP16	427 bp <i>BamHI</i> -Fragment aus pLVPs (3.2.1) = cDNA der Aktivierungsdomäne des <i>viral protein 16</i> aus <i>Herpes simplex</i>	WEINMANN <i>et al.</i> , 1994

3.2.3 Primer

Die Synthese von Primern wurde bei den Firmen ROTH, Karlsruhe und NAPS, Göttingen in Auftrag gegeben. Die Bindepositionen der Primer sind im Anhang aufgeführt.

Die Schmelztemperatur der Primer wurde nach folgender Formel berechnet:

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = 69,3 + (41 \times (n_{\text{G/C}} / n_{\text{gesamt}}) - 650 / n_{\text{gesamt}}) \quad (n = \text{Anzahl der Nucleotide})$$

Primer	Sequenz 5' → 3'	T _m [°C]
2.1-link-lower	GGA TCC ACC TCC ACC TGA ACC ACC TCC TCC TAC TAA CTG CTC TCG TGG TCT GGC	81,6
2.2-link-lower-NEU	GGA TCC ACC ACC ACC TGA ACC TCC TCC TCC TTC CCG GGG TCG AGC AAG CCA GAG	83,8
ENG-M1-low	CCG CCT TTA CAA GAG TGG ATC TGC	64,4
ENG-M1-up	GCA GCA TGA GCG TGG GCG GC	67,6
ENG-M2-lower	GTA AAG GCG GAG GGC GTG GCA GTC T	69,5
ENG-M2-uppur	ACC CGC CCA CCA GCA GCA GTC G	69,6
engrailed-link-lower	GGA TCC ACC TCC ACC TGA ACC ACC TCC TCC TGA TCC CAG AGC AGA TTT CTC TGG	80,8
engrailed-SunI-lower	CGT ACG TGA TCC CAG AGC AGA TTT CTC TGG	69,5
Kozak-engrailed-upper	GGT ACC AAC CAT GGC CCT GGA GGA TCG CTG C	74,8
K-VP16-upper-N	GGT ACC ATG ACG AAA AAC AAT TAC GGG TCT ACC	68,2
link-2.1-upper-NEU	GGA TCC GGA GGT GGT GGT TCT ATG GCT AGT AAG ATT GGT ACA GCA GGC	78,0
link-eng.-upp	GGA TCC GGA GGA GGT GGT TCA ATG GCC CTG GAG GAT CGC TGC	80,2
link-VP16-upper	GGA TCC GGA GGA GGT GGT TCA ATT CAT ATG ACG AAA AAC AAT TAC GGG TCT ACC	76,2
M13 reverse 24-mer	GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG	61,0
M13 universal 22-mer	GCC AGG GTT TTC CCA GTC ACG A	64,0
parA-L	AGA TCT TAG GTA AGA AGT GTT TCT TGT TCA AGC AAG	66,1
parA-U	GAT ATC ATG GAG AGC AAC AAC GTG GTT CTG C	68,2
TGA2.1/PstI	CGT CTG CAG GGG AAG TAC ATT TCA AAC	65,0
TGA2.1mut-REV	CCG CGG AGG TTC ACG GTT CTG GGC	71,3
TGA2.2 For	GGG GTA CCA ACC ATG GCT GAT ATC AGT CCT A	69,5
VP16-link-lower	GGA TCC ACC TCC ACC TGA ACC ACC TCC TCC CCC ACC GTA CTC GTC AAT TCC GAG	82,3
VP16-M1-low	TCG TCT AGC GCG TCG GCA TGC	65,7
VP16-M1up	CGA GCT CCA CTT AGA CGG CG	63,5
VP16-SunI-lower	CGT ACG CCC ACC GTA CTC GTC AAT TCC	69,5

3.2.4 Oligonucleotide

Folgende Oligonucleotide wurden zur Generierung von DNA-Fragmenten für den EMSA als Auftragssynthese von der Firma NAPS, Göttingen bezogen:

Oligonucleotid	Sequenz 5' → 3'
as-103-lower (20401N)	CTA GAA TAC GTA AGC ACT TAG CTA TTC TAG AGT CGA CCT GCA
as-103-upper (20400N)	GGT CGA CTC TAG AAT AGC TAA GTG CTT ACG TAT T
pas-A-lower (20399N)	CTA GAA GAT GTC ATT GCT TGC GTA ATC TAG AGT CGA CCT GCA
pas-A-upper (20398N)	GGT CGA CTC TAG ATT ACG CAA GCA ATG ACA TCT T

3.2.5 DNA-Fragmente für EMSAs

3.2.5.1 Klonierung von pUC18 as-103

Äquimolare Mengen der unter 3.2.4 beschriebenen Oligonucleotide as-103-lower und as-103-upper wurden 1 min im Wasserbad gekocht und anschließend im heißen Wasserbad über Nacht auf RT heruntergekühlt (annealing). Die doppelsträngigen Oligonucleotide wurden in den *PstI* / *XbaI*-geschnittenen Vektor pUC18 einkloniert und sequenziert.

3.2.5.2 Klonierung von pUC18-pas-a

Äquimolare Mengen der unter 3.2.4 beschriebenen Oligonucleotide pas-a-lower und pas-a-upper wurden 1 min im Wasserbad gekocht und anschließend im heißen Wasserbad über Nacht auf RT heruntergekühlt (annealing). Die doppelsträngigen Oligonucleotide wurden in den *PstI* / *XbaI*-geschnittenen Vektor pUC18 einkloniert und sequenziert.

3.2.5.3 Gewinnung der im EMSA eingesetzten Fragmente

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für den EMSA folgende DNA-Fragmente radioaktiv markiert:

<i>as-1</i>	TGACGTAAgggaTGACGCAC ACTGCATTccctACTGCGTG	als <i>EcoRI</i> / <i>NdeI</i> -Fragment aus pUC18 as-1 (3.2.1)
<i>as-103</i>	ATAGCTAAgtgcTTACGTAT TATCGATTcacgAATGCATA	als <i>EcoRI</i> / <i>NdeI</i> -Fragment aus pUC18 as-103 (3.2.5.1)
<i>pas-a</i>	TTACGCAAgcaaTGACATCT AATGCGTTcgttACTGTAGA	als <i>EcoRI</i> / <i>NdeI</i> -Fragment aus pUC18 pas-a (3.2.5.2)

Die zuvor genannten Fragmente wurden für alle EMSAs mit nativen Extrakten nach JUPIN und CHUA, 1996 (4.5.1.4) verwendet.

Für EMSAs mit nativen Extrakten nach dem FixProt-Protokoll wurde das folgende *as-I*-Fragment verwendet, das sich dadurch auszeichnet, dass an seinen Enden mehr [$\alpha^{32}\text{P}$]dATP eingebaut werden kann:

<i>as-I-short</i>	TGACGTAAgggaTGACGCAC ACTGCATTccctACTGCGTG	als <i>BpiI</i> -Fragment aus dem Vektor pUC18 as-1 BpiI (3.2.1)
-------------------	--	---

3.2.6 DNA-Längenstandards

Die Größe von DNA-Fragmenten wurde im Agarosegel durch Vergleich mit DNA-Längenstandards bestimmt. Die Fragmentgrößen dieser Marker (in bp) sind im folgenden aufgeführt.

pUC19 *HpaII* (aus Eigenherstellung)

501 / 489 / 404 / 331 / 242 / 190 / 147 / 111 / 110 / 67

λ *PstI* (aus Eigenherstellung)

14057 / 11497 / 5077 / 4749 / 4507 / 2838 / 2459 / 2443 / 2140 / 1986 / 1700 / 1159 / 1093 / 805 / 514 / 468 / 448

1 kb-Leiter (GIBCO BRL)

12216 / 11198 / 10180 / 9162 / 8144 / 7126 / 6108 / 5090 / 4072 / 3054 / 2036 / 1636 / 1018 / 517 / 506 / 396 / 344 / 298 / 220 / 201 / 154 / 134 / 75

3.2.7 Radioaktiv markierte Nucleotide

Zur radioaktiven Markierung von DNA-Sondenmolekülen wurden folgende Chemikalien von der Firma Hartmann Analytik, Braunschweig bezogen:

[$\alpha^{32}\text{P}$]dATP

[$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP

Beide Verbindungen besaßen eine spezifische Aktivität von 800 Ci / mmol.

3.3 Proteine

3.3.1 Proteinstandards

Zur Abschätzung des Molekulargewichts von Proteinen in der SDS-PAGE wurden die Marker BENCHMARK™ Prestained Protein Ladder der Firma GIBCO BRL und SeeBlue™ Pre-Stained Standard der Firma NOVEX verwendet.

3.3.2 Antiseren

Antiserum	Eigenschaften	Referenz
α TGA1a	polyklonal aus Kaninchen, Rohserum	NIGGEWEG, 1999
α TGA2.1	polyklonal aus Kaninchen, Rohserum bzw. affinitätsgereinigt	NIGGEWEG, 1999
α TGA2.2	polyklonal aus Kaninchen, Rohserum bzw. affinitätsgereinigt	NIGGEWEG, 1999
α TGA7	polyklonal aus Kaninchen, Rohserum	SCHIERMEYER, unveröffentlicht
α Streptag® II	polyklonal aus Kaninchen, affinitätsgereinigt	IBA
anti rabbit Ig	Peroxidase-gekoppelt, polyklonal aus Esel	Amersham

3.4 Nährmedien und Zusätze

3.4.1 Medien zur Anzucht von Bakterien

dYT: 16 g/l Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl; pH ad 7,0 mit NaOH

LB: 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl; pH ad 7,0 mit NaOH

SOC-Medium: 20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, nach dem Autoklavieren steril dazu: 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose

YEB: 10 g/l Beefextrakt, 2 g/l Hefeextrakt, 5 g/l Pepton, 5 g/l Saccharose, 2 mM MgSO₄; pH ad 7,0 mit NaOH

Für LB- bzw. YEB-Festmedien zusätzlich 15 g/l Bacteriological Agar.

3.4.2 Medien zur Anzucht von Pflanzen und Suspensionskulturen von *N. tabacum*

2MS-Festmedium: 4,59 g/l Murashige und Skoog Medium, 20 g/l Saccharose, 6,4 g/l Select-Agar; pH 5,8 mit KOH einstellen

Shoot-induction-Festmedium: (SHI) 2MS-Festmedium autoklavieren; bei 50 °C steril dazu pipettieren: 1 mg/l 6-Benzylaminopurin (BAP), 200 mg/l α -Naphthalinessigsäure (NAA), 500 mg/l Cefotaxim und Selektionsantibiotika entsprechend der Angaben unter 3.4.3

3LS-Flüssigmedium: 4,4 g/l Linsmaier und Skoog Medium, 30 g/l Saccharose, pH 5,8 mit KOH einstellen. Nach dem Autoklavieren zugeben: 1 μ M 2,4-D aus einer Stammlösung von 1,1 mg/ml in 50 % EtOH

Kallus-Induktionsmedium: 2MS-Festmedium mit 0,1 μ g/l Kinetin und 0,5 μ g/l NAA

3.4.3 Zusätze

Antibiotikum	Endkonzentration	Stammlösung
<i>E. coli</i>		
Ampicillin (Amp)	100 mg/l	100 mg/ml H ₂ O
Kanamycin (Km)	50 mg/l	50 mg/ml H ₂ O
Tetracyclin (Tet)	5 mg/l	5 mg/ml 50 % EtOH
<i>A. tumefaciens</i>		
Rifampicin (Rif)	100 mg/l	50 mg/ml 100 % MeOH
Kanamycin (Km)	50 mg/l	50 mg/ml H ₂ O
Gentamycin (Gm)	25 mg/l	25 mg/ml H ₂ O
<i>N. tabacum</i>		
Kanamycin (Km)	50 mg/l	50 mg/ml H ₂ O
Cefotaxim	500 mg/l	250 mg/ml H ₂ O
Hygromycin B	40 mg/l	50 mg/ml Methanol
Phosphinotricin (Ppt)	6 mg/l	10 mg/ml H ₂ O

X-Gal und IPTG

X-Gal-Stammlösung: 20 mg/ml N,N-Dimethylformamid

IPTG-Stammlösung: 23,8 mg/ml H₂O

3.5 Lösungen und Puffer

1 x FixProt-Puffer	50 mM Hepes (pH 7,5 bei 25 °C), 20 mM KCl, 2,5 mM DTT oder 10 mM β-Mercaptoethanol, Proteinase-Inhibitoren (50 µg/ml Antipain, 2 µg/ml Aprotinin, 20 µg/ml Chymostatin, 5 µg/ml E-64, 5 mM EGTA, 0,5 µg/ml Leupeptin, 1 mg/ml Pefabloc SC, 1 µg/ml Pepstatin, 10 mM 1,10-Phenantroline)
2 x FixProt-Puffer	100 mM Hepes (pH 7,5), 40 mM KCl, 5 mM DTT oder 20 mM β-Mercaptoethanol, ggf. 100 mM NaF, 20 % (v/v) 10 x Proteinase-Inhibitoren-Mix
1 x PBS	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , 4 mM Na ₂ HPO ₄
1 x PBS-T	1 x PBS mit 0,05 % Tween-20
10 x DNA-Probenpuffer	67 % Saccharose, 50 mM EDTA, 0,42 % (w/v) Bromphenolblau, 0,42 % (w/v) Xylencyanol, 0,42 % (w/v) Orange G

10 x KGB	1 M Kaliumglutamat, 250 mM Tris-Acetat (pH 7,5), 100 mM Magnesiumacetat, 5 mM β -Mercaptoethanol, 500 μ g/ml BSA
10 x MOPS-Puffer	0,2 M MOPS, 10 mM EDTA, 50 mM Natriumacetat, pH 7,0 mit NaOH einstellen
10 x Proteinase-Inhibitoren-Mix	500 μ g/ml Antipain, 20 μ g/ml Aprotinin, 200 μ g/ml Chymostatin, 50 μ g/ml E-64, 50 mM EGTA, 5 μ g/ml Leupeptin, 10 mg/ml Pefabloc SC, 10 μ g/ml Pepstatin, 100 mM 1,10-Phenantroline
10 x TBE	0,9 M Tris, 0,9 M Borsäure, 2 mM EDTA; pH 8,0 (stellt sich selbst ein)
100 x TE-Puffer	1 M Tris, 0,1 M EDTA, pH 8,0 mit HCl einstellen
2 x Protein-Probenpuffer	0,2 M Tris, 15 % (v/v) Glycerin, 6% (w/v) SDS, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 10 % (v/v) β -Mercaptoethanol
20 x SSC	2 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat; pH 7,0 mit HCl einstellen
20 x TAE	0,8 M Tris, 2,3 % (v/v) Essigsäure, 20 mM EDTA (pH 7,5 – 7,8)
3 x RNA-Probenpuffer	ad 10 ml: 12 % (v/v) Glycerin, $\frac{1}{3}$ Vol. 10 x MOPS, 0,025 % (w/v) Bromphenolblau, 0,025 % (w/v) Xylencyanol, 4 mM EDTA, 42,9 % (v/v) deionisiertes Formamid, 3,7 % (v/v) Formaldehyd
4 x Ladepuffer	42 % (v/v) Bindepuffer, 58 % (v/v) Glycerin
5 x Bindepuffer	125 mM Hepes-KOH (pH 7,6), 50 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 50 % (v/v) Glycerin, 5 mM DTT, 2 mM PMSF
Anodenpuffer I	0,3 M Tris (pH 10,4), 10 % (v/v) Methanol
Anodenpuffer II	25 mM Tris (pH 10,4), 10 % (v/v) Methanol
Coomassie-Färbelösung	10 % (v/v) Essigsäure, 0,01 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250
Coomassie-Entfärbelösung	10 % (v/v) Essigsäure
Coomassie-Fixierlösung	25 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Essigsäure
Dialyse-Puffer	100 mM KCl, 20 mM Hepes (pH 7,5), 10 % (v/v) Glycerin, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 0,2 mM PMSF
Elutionspuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,025 % (w/v) SDS

Harnstoffextraktionspuffer	4 M Harnstoff, 16,6 % (v/v) Glycerin, 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 5 % (w/v) SDS, 0,5 % (w/v) Bromphenolblau
Hybridisierungslösung	50 % (v/v) deionisiertes Formamid, 10 % (w/v) Dextransulfat, 1 % (w/v) SDS, 1 M NaCl, 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6,8)
Kathodenpuffer	25 mM Tris, 40 mM Glycin (pH 9,4), 10 % (v/v) Methanol
EMSA-Markierungspuffer	50 % (v/v) Glycerin, 0,4 % (w/v) Bromphenolblau
NEB-Puffer	25 mM Hepes-KOH (pH 7,5), 40 mM KCl, 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,2 mM PMSF, 10 % (v/v) Glycerin
Neutralisierungslösung	1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl (pH 8,0)
NLB-Puffer	15 mM Hepes-KOH (pH 7,5), 110 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 50 mg/l Antipain, 0,5 mg/l Leupeptin, 0,2 mM Pefabloc, 0,2 mM PMSF
PCI-Mix	25 Vol. Phenol, 24 Vol. Chloroform, 1 Vol. Isoamylalkohol
Ponceau-Lösung	0,1 % (w/v) Ponceau S, 5 % (v/v) Essigsäure
Puffer 0,5 A	0,5 M Hexylenglykol, 0,25 M Saccharose, 20mM TAPES (pH 8,5 bei 25 °C), 10 mM $MgCl_2$, 0,15 mM Spermin, 0,5 mM Spermidin, 0,6 % (v/v) Nonidet P-40, frisch dazu 80 mM β -Mercaptoethanol
Puffer 1 A	1 M Hexylenglykol, 0,25 M Saccharose, 20mM TAPES (pH 8,5 bei 25 °C), 10 mM $MgCl_2$, 0,15 mM Spermin, 0,5 mM Spermidin, 0,6 % (v/v) Nonidet P-40, frisch dazu 80 mM β -Mercaptoethanol
RNase freies H ₂ O	H ₂ O über Nacht mit 0,1 % DEPC inkubiert und anschließend autoklaviert
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris, 190 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS
Sephadex G-50	10 g in TE pH 8,0 quellen lassen, zweimal mit TE pH 8,0 waschen und autoklavieren

3.6 Chemikalien, Verbrauchsmittel und Geräte

3.6.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller / Lieferant
α -Naphthalinessigsäure (NAA)	Sigma
2,4 Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D)	Sigma
2-Methyl-2,4-petandiol	Aldrich
6-Benzylaminopurin (BAP)	Sigma
Agar Bacteriological	Life Technologies
Agarose SeaKem LE	Biozym
Ampicillin	AGS
Antipain	Serva
Aprotinin	Biomol
BION®	Novartis
Cefotaxim	Duchefa
Chloroform	Merck
Chlortetracyclin	Sigma
Chymostatin	Sigma
Coomassie R-250	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
dNTPs	MBI; Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	AppliChem
Ficoll 400	Sigma
Gelatine	Hilmer Brauer
Gentamycin	Duchefa
Glycogen	Fluka
Heringssperma-DNA (HSP)	Boehringer Mannheim
Hydroxyethyl-Cellulose medium vis. (HEC)	Fluka
Hygromycin	Duchefa
Isopropylthiogalactosid (IPTG)	BioTech Trade
Kaliumacetat	Merck
Kanamycin	Sigma
Linsmaier und Skoog Medium	Duchefa
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	AppliChem
Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	AppliChem
Murashige und Skoog Medium	Duchefa
N,N-Dimethylformamid	J.T. Baker Chemicals B. V.
NaOH	Merck
Nonidet P-40	Fluka
Orange G	Sigma
Penassay Broth	Difco
Pepstatin	Biomol
Phenol	AppliChem
Phenylmethansulfonylchlorid (PMSF)	Fluka
Polydeoxyinosine-deoxycytidylic acid (poly dIdC)	Sigma

Chemikalie	Hersteller / Lieferant
Polyvinylpyrrolidon (PVP)-40	Sigma
Quercetin	Sigma
Rifampicin	Duchefa
Rinderextrakt (LAB LEMCO)	Duchefa
Salicylsäure (SA)	Merck
Salzsäure (HCl)	Merck
Select Agar	Life Technologies
Select Yeast extract (Hefeextrakt)	GIBCO BRL
Tetracyclin	Duchefa
Trypton	Oxoid
X-Gal	BioTech Trade

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Roth bezogen.

3.6.2 Verbrauchsmittel

Produkt	Hersteller
3MM-Fließpapier	Whatman
IP-Screen	Fuji
Kunststoff-Einwegmaterial	Biozym; Eppendorf; Greiner; Roth
Micro Spin TM G25 Column	Amersham
Miracloth	Calbiochem
Nylon-Membran Nytran®	Schleicher und Schuell
Parafilm M	American National Can TM
Polyacrylamid (PAA)-Mix: 30 % PAA + Bisacrylamid (37,5 : 1)	Roth
Polyacrylamid (PAA)-Mix: 40 % PAA + Bisacrylamid (19 : 1)	Roth
PVDF-Membran Immobilon TM -P	Millipore
Röntgen Entwickler LX24	Kodak
Röntgen Fixierer AL4	Kodak
Röntgenfilme Cronex 4, Cronex 10T	DuPont
Röntgenfilme X-omat AR	Kodak
Sephadex G50	Pharmacia

3.6.3 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	3870 ELV	Tuttnauer
Biofuge	pico	Heraeus
Bioimager (Phosphoimager)	BAS-1000	Fuji
Elektroporationsapparatur	Gene pulser® II Pulse Controller Plus	BioRad
Geldokumentationsstation		MWG Biotech
Gelelektrophoresekammer		Werkstatt der Universität
Geltrockner	Phero-Temp	Biotec-Fischer

Gerät	Modell	Hersteller
Heizblock		Boekel Scientific
Heizrührer	RCT basic	IKA Labortechnik
Hybridisierungsöfen		Bachhofer
Hybridisierungswasserbad	Belly Dancer	Stovall
Inkubationsschränke		WTC binder; memmert
Kühlzentrifuge	Sorvall RC 5B Plus	DuPont
Netzgeräte	E 323	Benedikt Heinemann
Netzgeräte	EC 105	EC Apparatus Corporation
PCR-Gerät, MiniCycler™	PTC-150	MJ Research, USA
pH-Meter	HI 9321	Hanna Instruments
Photometer	Unikon 720 LC	Kontron
RNA-/DNA-Calculator	GeneQuant II	Pharmacia
Scanner	ScanJet 4c	Hewlett Packard
Sequenziergerät	ABI PRISM 310	Perkin-Elmer
Speed vac Konzentrator	SK 100 H	Sarvant
Spektralphotometer	Novaspek Biochrom	LKB
Spektralphotometer für Microtiterplatten	MRX	Dynex
Szintillationsmeßgerät		raytest Isotopenmeßgeräte GmbH
Tischzentrifuge, gekühlt	5403	Eppendorf
Ultraschallgerät	Soniprep 150	Scientific Instruments
Ultrazentrifuge Rotoren:	Centrikon T-1065 TFT 30.58 TFT 65.13	Kontron
UV-Transilluminator / FluoLink	FLX-20 M	Vilber Lourmat
Vakuublottapparatur	VACUGENE 2016	Pharmacia
Vertical-Gelelektrophorese- Apparatur	V 15-17	GIBCO BRL
Vertical-Gelelektrophorese- Apparatur	Joey™ #JGC-4	AGS
Vortex	L46	Labinco BV
Wasseraufbereitungsanlage	Option 4, Maxima	ELGA

3.7 Kits und Enzyme

3.7.1 Kits

Kit	Hersteller
BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin-Elmer
ECL-Kit, ECL+-Kit	Amersham Life Science
GeneClean® II – Kit	Bio 101, Inc.
Megaprime™ DNA Labelling Systems	Amersham Life Science
Oligotex™-Kit	Qiagen
Qiagen Plasmid-Preparations-Kits (Mini, Midi, Maxi)	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
RNeasy Plant Mini Kit	Qiagen
T-Cloning Kit	MBI Fermentas
1 st strand cDNA Kit	Boehringer

3.7.2 Enzyme

Enzym	Hersteller
Ampli Taq ® DNA-Polymerase, FS	ABI PRISM™
Klenow DNA-Polymerase exo ⁻	MBI Fermentas
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, GIBCO BRL
RNase A (DNase-frei)	Sigma; Qiagen
T4 DNA-Ligase	MBI Fermentas

4 Methoden

4.1 Anzucht und Manipulation von Bakterien

4.1.1 Anzucht von *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte bei 37 °C über Nacht und in Gegenwart geeigneter Antibiotika entweder auf LB-Platten im Brutschrank oder in Flüssigmedium (LB oder dYT) im Schüttler bei 250 rpm.

4.1.2 Transformation von *E. coli*

Da *E. coli* von Natur aus nicht in der Lage ist, nackte DNA aus seiner Umgebung aufzunehmen, müssen die Zellen kompetent gemacht werden, um sie mit Plasmid-DNA transformieren zu können. Dies kann z. B. durch eine Behandlung mit $RbCl_2$ geschehen. Die Herstellung chemisch- bzw. $RbCl_2$ -kompetenter Zellen erfolgte nach INOUE *et al.*, 1990 bzw. nach HANAHAN, 1983. Die Transformation kompetenter Zellen erfolgte nach HANAHAN, 1983. Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut und anschließend mit 1 ng (Plasmid-DNA) bis 100 ng (Ligationsansatz) für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer Hitzebehandlung für 90 sec bei 42 °C wurden die Zellen weitere 5 min auf Eis gehalten und nach Zugabe von 700 μ l SOC-Medium 30 min bei 37 °C geschüttelt. Zur Selektion der transformierten Bakterien wurden unterschiedliche Mengen der Bakterienkultur auf LB-Festmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Ggf. wurden die Platten zuvor zum Zwecke einer Blau-Weiß-Selektion mit IPTG und X-Gal (s. 3.4.1) beschichtet.

4.1.3 Anzucht von *A. tumefaciens*

Die Anzucht von *A. tumefaciens* erfolgte bei 28 °C über zwei Tage in Gegenwart geeigneter Antibiotika auf YEB-Festmedium im Brutschrank oder in YEB-Flüssigmedium bei 250 rpm im Schüttler.

4.1.4 Transformation von *A. tumefaciens* durch Elektroporation

A. tumefaciens besitzt wie *E. coli* keine natürliche Kompetenz zur Aufnahme von DNA. Die Herstellung kompetenter Zellen erfolgte nach DOWER *et al.*, 1988.

Da die Elektroporation durch Salzurückstände in der DNA-Lösung beeinträchtigt wird, wurde Plasmid-DNA für diesen Zweck immer in H_2O (up) gelöst.

Zur Elektroporation wurden 40 μ l kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut, mit 50-100 ng Plasmid-DNA vermischt und 30-60 sec auf Eis inkubiert. Diese Suspension wurde in eine spezielle, eisgekühlte Elektroporations-Küvette ($d = 0,2$ cm) überführt und mittels einer Elektroporationsapparatur einem elektrischen Puls ausgesetzt (Parameter: 25 μ F, 200 Ω und 2,5 kV). Die vom Gerät angezeigte Zeitkonstante sollte dabei nicht wesentlich von 4,6 ms abweichen.

Anschließend wurden die Zellen sofort in 1 ml eiskaltes SOC-Medium aufgenommen und anschließend 2 h bei 28 °C im Roller inkubiert. Zur Selektion der transformierten Zellen wurden unterschiedliche Mengen der Bakterienkultur auf YEB-Festmedium mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und zwei Tage bei 28 °C inkubiert.

4.2 Anzucht und Manipulation von Pflanzen

4.2.1 Anzucht von *N. tabacum*

Tabakpflanzen wurden in steriler Sprosskultur (Gewebekultur) auf 2MS-Festmedium gehalten. Die Anzucht erfolgte in Klimakammern bzw. Klimaschränken bei 24 °C am Tag und 22 °C in der Nacht in einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 16 h : 8 h. Die Subkultivierung der Pflanzen erfolgte alle 6 – 8 Wochen. Hierzu wurde die Sprossspitze der zu vermehrenden Pflanze abgetrennt und zum Bewurzeln auf 2MS-Festmedium überführt.

Zur Produktion von Samen und größeren Gewebemengen wurden die Pflanzen aus der Sterilkultur in Erde umgesetzt und in Klimakammern bei 22 °C am Tag und 19 °C in der Nacht bei 85 % Luftfeuchte in einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 16 h : 8 h kultiviert.

4.2.2 Transformation von *N. tabacum* (modifiziert nach HORSCH *et al.*, 1985)

Zur stabilen Transformation von Tabak kann man sich den natürlichen Infektionsmechanismus von *A. tumefaciens* zunutze machen. Agrobakterien dringen in frische Pflanzenwunden ein und induzieren dort durch das tumor-inducing (Ti)-Plasmid die Bildung von Wurzelhalstumoren. Bei diesem Vorgang wird ein Teil des Ti-Plasmids, die T-DNA, mit Hilfe der vom Ti-Plasmid in der *vir*-Region codierten Virulenz-Proteine stabil ins Pflanzengenom integriert. Ersetzt man die Tumor-auslösenden Gene der T-DNA durch Fremdgene, so kann das Agrobakterium die Tumorbildung nicht mehr induzieren, sondern dient ausschließlich als Genfahre und ermöglicht so die Integration von Fremdgenen ins Pflanzengenom. Derart modifizierte Ti-Plasmide lassen sich zur Transformation von Tabak als binäre Plasmide nutzen. Das binäre System besteht aus einem Helferplasmid und dem binären Vektorplasmid, die beide gleichzeitig im Agrobakterium vorliegen. Bei dem Helferplasmid handelt es sich um ein Ti-Plasmid mit der *vir*-Region, aber ohne T-DNA. Das binäre Vektorplasmid enthält die T-DNA mit allen zu übertragenden Genen und bakterielle Replikationsstartpunkte zur Vermehrung in *E. coli* und *A. tumefaciens*. Resistenzgene auf Vektor- und Helferplasmid ermöglichen die Selektion auf die Plasmide während der Anzucht der Agrobakterien.

Die Transformation wurde nach der "leaf-disc"-Methode durchgeführt. 10 ml einer über-Nacht-Kultur von einer transformierten *A. tumefaciens*-Einzelkolonie wurden bei 4000 g pelletiert und in 20 ml YEB-Flüssigmedium resuspendiert. Blätter von steril angezogenen Tabakpflanzen der zu transformierenden Linie wurden in 1-2 cm² große Stücke zerteilt und für 2-3 min in die Agrobakterien-Suspension getaucht. Die Blattstücke wurden anschließend mit der Blattunterseite auf 2MS-Festmedium gelegt und für zwei Tage abgedunkelt im Klimaschrank bei 24 °C mit den Agrobakterien cokultiviert. Die Cokulturphase ermöglicht das Eindringen der Agrobakterien in das Gewebe und die stabile Integration der Fremd-DNA ins Pflanzengenom. Anschließend wurden die Blattstücke auf selektives SHI-Medium umgelegt und im Klimaschrank mit einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 16 h : 8 h kultiviert. Die Hormone im Medium induzieren die Bildung von Kallusgewebe, aus dem sich Sprosse regenerieren können. Die Antibiotika dienen zum einem dem Abtöten der Agrobakterien (Cefotaxim) und zum anderen der Selektion transgener Pflanzenzellen (Hygromycin).

Das Umlegen der Blattstücke auf frisches SHI-Medium wurde im Abstand von höchstens zwei Wochen oder bei Bedarf früher wiederholt, bis sich Sprosse ausgebildet hatten. Diese wurden zur Bewurzelung auf 2MS-Medium mit Cefotaxim und Hygromycin umgesetzt.

4.2.3 Induktion von Tabakpflanzen mit Salicylsäure bzw. Cycloheximid

Um die Salicylsäure (SA)-induzierte Genexpression in Blattgewebe aus Tabak zu untersuchen, wurden Pflanzen wie unter 4.2.1 beschrieben bis zu einem Alter von 6 – 8 Wochen in Erde angezogen. Für Versuche wurden Pflanzen benutzt, die keine äußerlich sichtbaren Zeichen von Seneszenz zeigten, und die noch keine Blütenknospen angesetzt hatten.

Für die Induktion mit SA wurden bevorzugt aus den oberen Blättern der Pflanzen mit einem Korbbohrer (d = 2,6 cm) pro Zeitpunkt 4 – 6 Blattscheiben ausgestochen und bis zur weiteren Behandlung in einer Petrischale mit angefeuchtetem Zellstoff aufbewahrt.

Zur „einfachen“ Induktion mit SA ohne Vorbehandlung mit anderen Chemikalien wurden die Blattscheiben auf 1 mM SA in 50 ml 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 5,8) gelegt.

Um die Proteinneusynthese während eines Induktionsversuchs zu unterdrücken, wurden die Blattscheiben mit Cycloheximid (CHX) vorbehandelt. Dazu wurden die Blattscheiben unter einem Metallsieb (vollständig untergetaucht) in einer Lösung aus 100 mg/l CHX in 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 5,8) in einem Exsikkator für 90 sec evakuiert und anschließend die Lösung durch scharfes Belüften in die Interzellularen infiltriert. Die Blattscheiben wurden in der gleichen Lösung für eine Stunde in Petrischalen inkubiert, um die optimale Wirkung des CHX zu gewährleisten. Anschließend erfolgte die SA-Induktion wie zuvor beschrieben, jedoch in Gegenwart von 100 mg/l CHX.

Die SA-Induktion von Blattgewebe zur Isolierung von Kernproteinen erfolgte mit ca. 8 g Blättern (ohne Mittelrippe) pro Zeitpunkt. Die Blätter wurden in ca. 25 cm² große Stücke zerteilt und in einem 1000 ml Becherglas analog der zuvor beschriebenen Prozedur mit Kaliumphosphatpuffer (pH 5,8) mit bzw. ohne 100 mg/l CHX infiltriert, eine Stunde inkubiert und anschließend in Photoschalen auf Kaliumphosphatpuffer mit 1 mM SA, mit bzw. ohne 100 mg/l CHX induziert.

SA und CHX wurden aus einer 1000fachen Stammlösung in DMSO entnommen, die für jeden Versuch frisch hergestellt wurde. In allen Fällen wurden entnommene Proben in flüssigem Stickstoff (N₂ liq.) eingefroren und bis zur Aufarbeitung bei –80 °C aufbewahrt.

4.2.4 Induktion von Tabakpflanzen mit BION®

BION® (Benzothiadiazol, BTH) (GÖRLACH *et al.*, 1996; LAWTON *et al.*, 1996) ist ein funktionelles SA-Analogon, das jedoch bei gleicher Konzentration eine stärkere Wirkung auf SA-induzierte Gene zeigt. Die Chemikalie stand als Formulatur mit 50 % (w/w) wirksamer Substanz zur Verfügung. Aus der Formulatur wurde eine wässrige Suspension mit 100 µM BION® hergestellt und die oberirdischen Organe der zu behandelnden Pflanzen in zweiwöchigem Abstand eingesprüht.

4.2.5 Etablierung und Kultivierung von Suspensionskulturen aus *N. tabacum*

Suspensionskulturen aus *N. tabacum* bestehen aus sog. Mikrocalli, deren wenige Zellen direkten Kontakt zum umgebenden Medium haben. Dieser direkte Kontakt zum Medium und die Möglichkeit, durch die relativ hohe Zellteilungsrate in kurzer Zeit viel Biomasse zu produzieren, machen Suspensionskulturen zu einem interessanten Objekt für Versuche mit Induktoren und Inhibitoren.

Um Suspensionskulturen aus *N. tabacum* zu etablieren, wurden Stängel von steril in Gewebekultur gezogenen Pflanzen in ca. 1 mm dicke Scheiben geschnitten und auf Kallus-Induktionsmedium im Dunkeln bei 25 °C ca. drei Wochen kultiviert. Das sich bildende Kallusgewebe wurde in 3LS-Flüssigmedium mit 1 µM 2,4-D überführt, mit einer Pinzette

zerkleinert und in einem Gesamtvolumen von 30 ml 3LS (+ 2,4-D) im 100 ml Erlenmeyerkolben im Dunkeln bei 25 °C bei 80 rpm geschüttelt. In wöchentlichem Abstand wurden die Zellen zunächst im Verhältnis 1 : 6 subkultiviert. Hatte sich nach einiger Zeit eine homogene Suspension gebildet, wurden die Zellen im Verhältnis 1 : 10 unter den zuvor beschriebenen Bedingungen subkultiviert.

4.2.6 Behandlung von Tabaksuspensionskulturen mit Induktoren und Inhibitoren

Die Kultivierung der Zellsuspensionen erfolgte in Gegenwart von 2,4-D, welches in der Lage ist, *as-1*-ähnliche Elemente zu induzieren. Deshalb wurden die Zellen vor der Zugabe von *as-1*-induzierenden Substanzen in hormonfreiem Medium gewaschen. Dies geschah, indem die Zellen pelletiert und das Medium gegen hormonfreies Medium ausgetauscht wurde. Nach dreimaliger Wiederholung dieser Waschprozedur wurden die Zellen in hormonfreiem 3LS-Flüssigmedium bis zur Induktion drei weitere Tage geschüttelt.

Die Induktion erfolgte durch Zugabe der Induktoren in die hormonfreie Zellsuspension.

Konzentrationen:	SA	100 µM
	2,4-D	50 µM
	Quercetin	50 µM

Alle Substanzen wurden frisch hergestellten 1000fachen Stammlösungen entnommen.

4.3 Isolierung, Reinigung, Quantifizierung, Darstellung und Manipulation von Nucleinsäuren

4.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Je nach Verwendungszweck wurden verschiedene Arten der Plasmidisolierung angewendet.

4.3.1.1 Alkalische Lyse (modifiziert nach ISH-HORROWICZ und BURKE, 1981)

Die alkalische Lyse ermöglicht die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* und aus *A. tumefaciens*.

1,5 ml einer stationären *E. coli*-Kultur wurden durch Zentrifugation (30 sec, 13.000 rpm, Biofuge) im Eppendorfgefäß pelletiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet in 100 µl HB1 resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl HB2 und anschließendes mehrmaliges Invertieren erfolgte der Aufschluss der Zellen, wobei die Suspension klar und viskos wurde. Durch Zugabe von 170 µl HB3 und sofortiges gründliches Invertieren wurde die Lösung neutralisiert, so dass die DNA renaturierte. Anschließend wurden die Proben 10 min auf Eis inkubiert, um die chromosomale DNA und einen großen Teil der Proteine zu fällen. Durch anschließende Zentrifugation (10 min, 13.000 rpm, Biofuge) wurden die Proteine präzipitiert, wobei die Plasmid-DNA im Überstand verblieb. Der Überstand wurde zur Entfernung der restlichen Proteine einer Phenol/Chloroform-Extraktion mit 500 µl PCI-Mix unterzogen. Nach einer Zentrifugation (3 min, 13.000 rpm, Biofuge) wurde die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA mit 1 ml 98 % EtOH gefällt und mittels Zentrifugation (10 min, 13.000 rpm, Biofuge) pelletiert. Das Pellet wurde anschließend mit 500 µl 70 % EtOH gewaschen und nach kurzem Trocknen bei 65 °C in 50 µl H₂O gelöst.

Zur Isolierung der binären low-copy Vektoren aus *A. tumefaciens* wurden 5 ml einer stationären Kultur verwendet. Der Aufschluss und die Phenol/Chloroform-Extraktion erfolgte mit dem 2fachen Volumen der für *E. coli* angegebenen Lösungen. Nach dem Fällen der Plasmid DNA wurde das Pellet in 20 µl H₂O resuspendiert.

4.3.1.2 Schnell-Lyse für anschließende PCR

Zur schnellen Identifizierung rekombinanter Klone wurden Einzelkolonien ($d = 1 - 2$ mm) einer Transformation von *E. coli* im Eppendorfgefäß in 50 µl H₂O resuspendiert, 5 min im Wasserbad aufgeköcht und anschließend zentrifugiert (1 min, 13.000 rpm, Biofuge). 10 µl des klaren Überstandes dienen als Template für eine PCR mit geeigneten Primern zur Identifizierung rekombinanter Klone.

4.3.1.3 Plasmidpräparation für die Sequenzierung

Für die Sequenzierung mittels Cycle Sequencing wurde hochreine Plasmid-DNA mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits der Firma Qiagen isoliert. Hierbei werden zunächst die Zellen ähnlich der unter 4.3.1.1 beschriebenen Alkalischen Lyse aufgeschlossen. Anschließend wird mit Hilfe eines Zentrifugationsschritts die Plasmid-DNA an eine Ionenaustauscher-Säule gebunden, durch Zugabe verschiedener Puffer in weiteren Zentrifugationsschritten gereinigt und schließlich eluiert.

Die Durchführung erfolgte gemäß den Herstellerangaben (QIAGEN Plasmid Purification Handbook, 1997).

4.3.1.4 Präparation größerer Plasmidmengen

Zur Isolierung größerer Plasmidmengen wurde der Midi- bzw. Maxi-Kit der Firma Qiagen eingesetzt. Die Durchführung erfolgte gemäß den Herstellerangaben (QIAGEN Plasmid Purification Handbuch, 1997).

4.3.2 Isolierung von RNA aus *N. tabacum*

4.3.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Zur Präparation von RNA aus Blattgewebe und aus Suspensionskulturen wurde der RNeasy Plant Mini-Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben (QIAGEN RNeasy Mini Handbook, 1999) mit folgenden Parametern bzw. Modifikationen:

- Bei einer größeren Anzahl aufzuarbeitender Proben wurde die Präparation nach Schritt 2 unterbrochen und die Proben bei -80 °C aufbewahrt.
- Um ein stabileres Pellet zu erzielen, wurde die Zentrifugation in Schritt 3 auf 5 min ausgedehnt.
- Mit ≥ 8000 x g angegebene Zentrifugationsschritte wurden bei 11.000 rpm in der Biofuge durchgeführt.
- Alle Zentrifugationsschritte dauerten mindestens 1 min.
- Vor der Elution wurde das verwendete H₂O auf 65 °C erhitzt und heiß auf die Säule pipettiert.
- Die Elution erfolgte mit 50 – 60 µl H₂O. Der Durchfluss der ersten Elution wurde zwecks Konzentrationserhöhung ein zweites Mal auf die Säule gegeben und eluiert. Die zweite Elution erfolgte durch Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit, um die maximale Volumenausbeute an Eluat zu erhalten.

4.3.2.2 Isolierung von polyA⁺-RNA

Die Isolierung von polyA⁺-RNA erfolgte ausgehend von Gesamt-RNA mit Hilfe des QIAGEN OligotexTM-Kits gemäß den Herstellerangaben (QIAGEN OligotexTM Handbook, 1998).

4.3.3 Isolierung von cDNA-Sondenmolekülen aus *N. tabacum*

Um die Expression von Genen untersuchen zu können, sind Sondenmoleküle notwendig, die z. B. mittels PCR aus cDNA isoliert werden können. Die unter 3.2.2 beschriebene Sonde für *parA* (TAKAHASHI *et al.*, 1989) wurde auf diese Weise isoliert.

Die Erzeugung von cDNA erfolgte mit Hilfe des Boehringer 1st strand cDNA Kits. Als Ausgangsmaterial dienten 100 ng polyA⁺-RNA aus SNN wt Blattgewebe, das 7 h mit 2,4-D behandelt worden war. In einem 20 µl-Ansatz wurde mittels AMV reverser Transkriptase entsprechend den Herstellerangaben mit Hilfe eines Thermocyclers die cDNA synthetisiert. 1 µl der cDNA diente als Template für eine PCR mit jeweils 25 pmol der Primer *parA-U* und *parA-L*, die ein 696 bp großes Amplifikat lieferte. Dieses wurde in pUC57/T inkloniert, sequenziert und als komplette *parA*-Codierregion identifiziert. Der entstandene Vektor ist das unter 3.2.1 beschriebene Plasmid pUC57 *parA*.

4.3.4 Ethanolfällung von DNA (SAMBROOK *et al.*, 1989)

Die Ethanolfällung wurde eingesetzt, um DNA von Salzverunreinigungen zu befreien und sie zu konzentrieren.

Die Löslichkeit von DNA hängt von dem Salzgehalt und der Temperatur der Lösung ab. Durch die Erhöhung der Konzentration monovalenter Kationen und gleichzeitiger Erniedrigung der Temperatur kann die DNA in Anwesenheit von Ethanol präzipitieren.

Zur Fällung der Plasmid-DNA oder von PCR-Produkten wurde der Ansatz mit $\frac{1}{10}$ x Vol. 2,5 M Natriumacetat pH 5,2 und 2 x Vol. 100 % EtOH versetzt. Die Präzipitation erfolgte durch Inkubation für 30 min bei RT. Nach Zentrifugation (20 min, 13.000 rpm, Biofuge) wurde das Pellet mit 70 % EtOH gewaschen, an der Luft oder bei 65 °C getrocknet und schließlich in einem adäquaten Volumen H₂O aufgenommen.

4.3.5 Quantifizierung von Nucleinsäuren (SAMBROOK *et al.*, 1989)

Die Bestimmung der Konzentration von DNA und RNA erfolgte photometrisch mit dem GeneQuant II. Die Absorption bei 260 nm stellt ein direktes Maß für die Menge der gelösten Nucleinsäuren da. So entspricht $E_{260} = 1$ bei einer Schichtdicke der Lösung in der Meßküvette von 1 cm 40 µg/ml RNA bzw. 50 µg/ml dsDNA. Um eine ausreichende Genauigkeit zu gewährleisten, sollten die gemessenen Extinktionswerte im Bereich von 0,1-1,0 liegen. Zusätzlich wurden die Extinktionen bei 280 nm und für RNA-Lösungen auch bei 320 nm bestimmt. Diese Werte geben Aufschluss über die Reinheit der DNA bzw. RNA. Über die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm werden Kontaminationen von Phenol und Proteinen erfasst. Salzurückstände wurden durch positive Extinktionswerte bei 320 nm angezeigt. Der Quotient E_{260}/E_{280} stellt ein Maß für die Reinheit dar; optimale Werte liegen für RNA bei 1,9 - 2,0 und für DNA bei 1,8.

Im Normalfall waren nur Nucleinsäurekonzentrationen von mehr als 0,1 µg/µl mit hinreichender Genauigkeit photometrisch messbar. Die Konzentration geringerer DNA-Mengen konnte durch Gelelektrophorese und Ethidiumbromid (EtBr)-Färbung bestimmt werden. Die Konzentration des in die DNA interkalierten EtBr ist direkt proportional zur

Konzentration der DNA. Die auf dem UV-Schirm vom EtBr emittierte Fluoreszenzstrahlung stellt somit ein Maß für die DNA-Menge dar. Die Konzentration der DNA-Lösung wurde durch den Vergleich mit einem DNA-Standard bekannter Konzentration abgeschätzt.

4.3.6 Methoden zur Klonierung von Nucleinsäuren

4.3.6.1 Restriktionsspaltung von DNA (SAMBROOK *et al.*, 1989)

Restriktionsendonucleasen erkennen spezifische Basenpaarsequenzen und spalten daraufhin die Phosphodiester-Bindungen der doppelsträngiger DNA. Je nach Enzym entstehen glatte DNA-Enden ("blunt ends") oder 5'- bzw. 3'-überhängende Enden ("sticky ends").

Zur Restriktionsspaltung von DNA wurden die Enzyme gemäß den Herstellerangaben bei optimalen Puffer- und Temperaturbedingungen eingesetzt. Die jeweils eingesetzte Enzymmenge errechnete sich wie folgt:

$$U/\mu\text{g DNA} = (\text{bps } [\lambda] \times \text{Schnittstellen [DNA]}) / (\text{bps [DNA]} \times \text{Schnittstellen } [\lambda])$$

$$\text{bps } [\lambda] = 48.500$$

Die Volumina der Ansätze wurden so gewählt, dass die Konzentration an Glycerin nicht höher als 5 % war. Da die meisten Enzyme in einem Puffer mit 50 % Glycerin gelagert werden, entsprach der maximale Anteil an Enzym $1/10$ des Endvolumens.

4.3.6.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wird vorgenommen, um ein bestimmtes DNA-Fragment aus einem Gemisch von Fragmenten (z. B. Restriktion oder PCR) zu isolieren. Verschiedene Verfahren machen sich die selektive Bindung der DNA an eine Silica-Matrix zunutze.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf das QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen und das GeneClean II Kit der Firma Bio 101 zurückgegriffen. Die Isolierung erfolgte jeweils nach den Herstellerangaben.

4.3.6.3 Ligation von Restriktionsfragmenten

Zur Ligation zweier doppelsträngiger DNA-Enden mittels T4-DNA-Ligase müssen folgende Kriterien erfüllt sein:

- Die Enden müssen kompatibel sein.
- Mindestens ein Ende muss phosphoryliert vorliegen.
- Die Reaktion benötigt neben geeigneten Pufferbedingungen zwingend ATP.

Die Ligationsreaktion wurde routinemäßig für 2 h bei RT oder bei 16 °C über Nacht in Ligationpuffer der Firma MBI durchgeführt. Bei Ligationen in einen geöffneten Vektor wurde im allgemeinen ein Vektor : Insert - Verhältnis von 1 : 10 eingehalten.

4.3.6.4 Ligation von PCR-Produkten in pUC57/T

Während einer PCR-Reaktion fügt die *Taq* DNA-Polymerase bevorzugt ein zusätzliches dATP an das 3'-Ende des neu synthetisierten Stranges an. Um PCR-Fragmente effizienter in

einen Vektor ligieren zu können, besitzt der Vektor pUC57/T 3'-überhängende dTs, so dass die Enden von Vektor und Fragment eine komplementäre Basenpaarung ausbilden können. Das Verhältnis der Enden von Vektor zu PCR-Fragment sollte 1 : 3 betragen. Die Ligation erfolgte gemäß den Herstellerangaben mit Hilfe des T-Cloning-Kits (MBI FERMENTAS T-Cloning Kit Handbook).

4.3.7 Klonierung eines Kassettensystems für die Fusion zwischen TGA-Faktoren und Aktivierungs- bzw. Silencerdomänen

Das hier beschriebene Kassettensystem bietet die Möglichkeit, Fusionsderivate zwischen folgenden Modulen herzustellen: *TGA2.1*, *TGA2.2*, *ENGRAILED*-Silencerdomäne bzw. *VP16*-Aktivierungsdomäne. Dabei gibt es Akzeptorplasmide (**pKnnL**), die eine sog. Kozak-Sequenz (AACC) vor dem Translationsstart (KOZAK, 1989), das Gen für den N-terminalen Anteil des Fusionsproteins und einen Teil einer Peptidlinkersequenz $(G_4S)_2$ zur Verfügung stellen. Über die Schnittstelle *Bam*HI kann der C-terminale Fusionspartner eingefügt werden, welcher aus Donorplasmiden (**pLms**) herausgespalten wird. Dieses C-terminale Fragment umfasst den übrigen Teil der Peptidlinkersequenz (G_4S) , die Codierregion des zweiten Fusionspartners und vor dem Stop-Codon die Sequenz für den Streptag® II, einen acht Aminosäuren langen Affinitätstag, der von einem polyklonalen Antiserum erkannt wird oder z. B. eine Affinitätsaufreinigung mittels einer Biotin-gekoppelten Säule ermöglicht. Alle über *Bam*HI entstehenden Fusionen sind automatisch im Leseraster.

4.3.7.1 Klonierung des Vektors pKVPL

Der Vektor enthält die Sequenz für die *VP16*-Aktivierungsdomäne mit vorangestellter Kozak-Sequenz und anschließender Peptidlinkersequenz.

Auf dem Plasmid pSK-VP16 wurde mit Hilfe der Primer K-VP16-upper-N und VP16-link-lower mittels PCR ein 405 bp großes Fragment erzeugt, mit *Acc*65I und *Bam*HI geschnitten und in den ebenso geschnittenen pUC57 kloniert.

4.3.7.2 Klonierung des Vektors pKENGL

Der Vektor enthält die *ENGRAILED*-Silencerdomäne mit vorangestellter Kozak-Sequenz und anschließender Peptidlinkersequenz.

Mittels PCR wurde auf dem Template pENGRAILED mit den Primern Kozak-engrailed-upper und engrailed-link-lower ein 959 bp großes Fragment erzeugt und in den Vektor pUC57/T inkloniert.

4.3.7.3 Klonierung des Vektors pK2.1L

Der Vektor enthält die *TGA2.1*-Codierregion mit vorangestellter Kozak-Sequenz und nachfolgender Linker-Sequenz.

Mit den Primern *TGA2.1*/PstI und 2.1-link-lower wurde durch PCR auf einem *Kpn*I / *Sall*I-Fragment aus *TGA2.1* ein 764 bp großes Amplifikat gewonnen, das den 3'-Anteil von *TGA2.1* und die Sequenz für den Peptidlinker enthält. Über die Schnittstellen *Kpn*I und *Ppu*10I wurde aus dem Vektor pSK *TGA2.1* in vitro der 5'-Bereich von *TGA2.1* in diesen Vektor inseriert.

4.3.7.4 Klonierung des Vektors pK2.2L

Dieser Vektor trägt die Codierregion des *TGA2.2*, 5' mit der Kozak-Sequenz und 3' mit der Linker-Sequenz versehen.

Mit den Primern *TGA2.2 For* und *2.2-link-lower-NEU* wurde mit Hilfe von PCR auf dem *EcoRI*-gespaltenen Plasmid pSK-2811 PCR ein 1040 bp großes Amplifikat erzeugt und in den *EcoRV*-geschnittenen Vektor pUC57 inkloniert. Ein 30 bp großes *SmaI* / *BamHI*-Fragment aus diesem Vektor, welches die Linkersequenz trug, wurde in den ebenso geschnittenen Vektor pSK *TGA2.2* in vitro inseriert, so dass das Plasmid pK2.2L entstand.

4.3.7.5 Klonierung des Vektors pLVPs

Über PCR wurde mit Hilfe der Primer *link-VP16-upper* und *VP16-SunI-lower* auf dem Template pSK-VP16 ein 402 bp großes Fragment erzeugt und in den mit *EcoRV* geschnittenen Vektor pUC57 inseriert. Über die Schnittstellen *EcoRI* und *SunI* wurde in dem Vektor pUC57 2.1strepII die 2.1-Codierregion gegen ein 433 bp großes Fragment aus dem entstandenen Plasmid ausgetauscht, so dass der Vektor die Sequenz für die *VP16*-Aktivierungsdomäne mit vorangestellter Peptidlinker- und nachfolgender Streptag® II Sequenz enthält.

4.3.7.6 Klonierung des Vektors pLENGs

Mit den Primern *link-eng.-upp* und *engrailed-SunI-lower* wurde mittels PCR auf dem Template pENGRAILED ein 921 bp großes Fragment erzeugt und in den Vektor pUC57/T inkloniert. In dem Vektor pUC57 2.1strepII wurde die *TGA2.1*-Codierregion gegen ein *EcoRI* / *SunI*-Fragment aus dem entstandenen Plasmid ausgetauscht. Resultat war ein Vektor, der die Sequenz für die *ENGRAILED*-Silencerdomäne mit 5'-fusionierter Linkersequenz und 3'-fusionierter Sequenz für den Streptag® II trägt.

4.3.7.7 Klonierung des Vektors pL2.1s

Dieser Vektor enthält die Codierregion des Transkriptionsfaktors *TGA2.1*. Am 5'-Ende trägt sie die Sequenz für den beschriebenen Peptidlinker, am 3'-Ende die Sequenz für den Streptag® II.

Auf einem *KpnI* / *SalI*-Fragment aus dem Vektor pTGA2.1mut-strep entstand durch PCR mit den Primern *link-2.1-upper-NEU* und *TGA2.1mut-REV* ein 564 bp großes Fragment, welches in den *EcoRV* geschnittenen Vektor pUC57 inseriert wurde. Über die Schnittstellen *BglII* und *SalI* wurde das 3'-Ende der Codierregion gegen ein 1107 bp großes Fragment aus dem Vektor pUC57 2.1strepII ausgetauscht, welches 5' die korrekte Sequenz für die basische Region und 3' die Sequenz für den Streptag® II trägt.

4.3.7.8 Klonierung des Vektors pUC57 VP2.1s

Über die Schnittstelle *BamHI* wurde in den Vektor pKVPL ein 1421 bp großes Fragment aus dem Vektor pL2.1s inseriert.

4.3.7.9 Klonierung des Vektors pUC57 ENG2.1s

Über die Schnittstelle *Bam*HI wurde in den Vektor pKENGL ein 1421 bp großes Fragment aus dem Vektor pL2.1s inseriert.

4.3.7.10 Klonierung des Vektors pUC57 2.1VPs

Über die Schnittstelle *Bam*HI wurde in den Vektor pK2.1L ein 428 bp großes Fragment aus dem Vektor pLVPs inseriert.

4.3.7.11 Klonierung des Vektors pUC57 2.1ENGs

Über die Schnittstelle *Bam*HI wurde in den Vektor pK2.1L ein 947 bp großes Fragment aus dem Vektor pLENGs inseriert.

4.3.7.12 Klonierung des Vektors pSK 2.2VPs

Über die Schnittstelle *Bam*HI wurde in den Vektor pK2.2L ein 428 bp großes Fragment aus dem Vektor pLVPs inseriert.

4.3.7.13 Klonierung des Vektors pSK 2.2ENGs

Über die Schnittstelle *Bam*HI wurde in den Vektor pK2.2L ein 947 bp großes Fragment aus dem Vektor pLENGs inseriert.

4.3.7.14 Klonierung des Vektors pUC57 2.1-57s

Über die Schnittstellen *Acc*65I und *Eco*130I wurde in dem Vektor pL2.1s der 5'-Bereich der *TGA2.1*-Codierregion gegen ein 758 bp großes Fragment aus dem Vektor pSKTGA2.1-57 ausgetauscht.

4.3.7.15 Umklonieren der zuvor beschriebenen Derivate in den Vektor pBINHyg-TX

Alle zuvor beschriebenen *TGA2.1*-Fusionsderivate wurden als *Asp*718 / *Stu*I-Fragmente in den *Asp*718 / *Sma*I geschnittenen Vektor pBINHyg-TX inseriert. *TGA2.1-57s* wurde, wie auch alle zuvor beschriebenen *TGA2.2*-Derivate, über die Schnittstellen *Asp*718 und *Xba*I in den Vektor pBINHyg-TX inkloniert.

4.3.8 PCR (Polymerase Chain Reaction) (modifiziert nach MULLIS und FALOONA, 1987)

Bei der PCR-Reaktion wird mit Hilfe einer DNA-Polymerase und zweier gegenläufiger Primer ein dazwischen liegender DNA-Abschnitt selektiv amplifiziert. Durch Denaturierung und anschließende Renaturierung wird den Primern die Bindung an ihre komplementären Sequenzen auf dem Matrizenstrang ermöglicht. Ausgehend von diesen Primern katalysiert eine hitzestabile DNA-Polymerase (im Rahmen dieser Arbeit meist die *Taq*-DNA-Polymerase) die Synthese des vollständigen komplementären Strangs, der in folgenden Zyklen ebenfalls als Matrize für die Bindung der spezifischen Primer dient. Durch Wiederholung des beschriebenen Zyklus kommt es zur exponentiellen Vervielfältigung des DNA-Abschnitts zwischen den Primern.

PCR-Reaktionen wurden standardmäßig unter folgenden Bedingungen in einem Endvolumen von 50 µl durchgeführt: 20 – 200 pg Matrizen-DNA, 25 pmol jeden Primers, 200 µM dNTPs, 2,5 U *Taq*-Polymerase, 1 x *Taq*-Puffer mit 1,5 mM MgCl₂. Nach einer initialen Denaturierung für 3 min bei 93 °C erfolgte die Denaturierung in jedem Zyklus für 1 min bei 94 °C, das Annealing der Primer für 1 min bei der geringeren der für die beiden Primer errechneten T_m (3.2.3) und die Elongation für 1 min/kb bei 72 °C. Der Zyklus wurde 30 x wiederholt. Falls die PCR-Produkte anschließend inkubiert werden sollten, wurde das Reaktionsgemisch abschließend 5 min bei 72 °C inkubiert.

4.3.8.1 PCR zur Charakterisierung von rekombinanten Klonen

10 µl des Überstands der unter 4.3.1.2 beschriebenen Schnell-Lyse wurden als Template für eine PCR mit jeweils 25 pmol geeigneter Primer in einem Endvolumen von 50 µl verwendet.

Um falsch positive Signale in der PCR zu vermeiden, wurde nach Möglichkeit nur einer der beiden Primer im neu inserierten Fragment gewählt. Die Bindestelle für den zweiten Primer lag wenn möglich im Rezipientenvektor.

4.3.9 Sequenzierung „Cycle Sequencing“

Die DNA-Sequenzierung wurde nach der Dideoxy-Methode mit fluoreszenzmarkierten Terminatoren durchgeführt. Die Detektion der fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe des ABI PRISM 310 der Firma Perkin Elmer. Die Sequenzierreaktion erfolgte mit Hilfe des BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction-Kits.

400 ng der zu sequenzierenden Plasmid-DNA wurden mit 4 µl Terminator Ready Reaction-Mix (BigDye) und 3,2 pmol Primer (M13 universal, M13 reverse oder genspezifische Primer) gemischt und der Ansatz mit H₂O auf 20 µl aufgefüllt. Bei der PCR-Reaktion wurden im Thermocycler folgende Temperaturschritte durchlaufen: 25 x (95 °C, 5 sec; 50 - 60 °C [abhängig von der Schmelztemperatur des Primers], 5 sec; 60 °C, 4 min); 60 °C, 10 min; 4 °C, ∞. Um nicht eingebaute Terminatoren zu entfernen, wurde der Ansatz nachfolgend einer EtOH-Fällung unterzogen. Die Eigenfluoreszenz der Terminatoren würde die Detektion der fluoreszenzmarkierten PCR-Produkte. Der Ansatz wurde mit 19 µl H₂O und 61 µl 100 % EtOH versetzt und 15 min bei RT inkubiert. Nach einer Zentrifugation (15 min, 13.000 rpm, Biofuge) wurde der Überstand vollständig entfernt, das DNA-Pellet mit 100 µl 70 % EtOH gewaschen, anschließend 1 min bei 90 °C getrocknet und in 20 µl Template Suppression Reagent (TSR) gründlich resuspendiert. Nach dem Denaturieren bei 95 °C für 2 min wurde die Probe 5 - 10 min auf Eis gehalten und für die Sequenzanalyse in spezielle Sequenziergefäße überführt.

4.3.10 Agarose-Gelelektrophorese

4.3.10.1 Auftrennung von DNA im Agarosegel

Die Agarosegelelektrophorese wurde eingesetzt, um DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufzutrennen. Zur Herstellung von horizontalen Agarosegelen wurde eine Lösung aus 0,7 – 2 % Agarose in 1 x TAE aufgekocht und in Kammern der Größe 7 x 10 cm auf RT heruntergekühlt. Alternativ wurde eine Lösung aus 0,7 % Hydroxyethylcellulose (HEC) und 1 % Agarose in 1 x TAE verwendet. Die Verwendung von HEC-Agarosegelen (PERLMAN *et al.*, 1987) hat eine deutlich höhere Auflösung der Banden zur Folge. Vor der Auftragung wurden die Proben mit $\frac{1}{10}$ Volumen 10 x Probenpuffer versetzt und in die Taschen des nun in 1 x TAE befindlichen Gels pipettiert. Durch Anlegen einer Spannung von 100 – 120 V wurden die DNA-Fragmente im elektrischen Feld aufgetrennt. Nach adäquater Laufzeit wurde das Gel für 10 min in einer EtBr-Lösung (1 mg/l EtBr in 1 x TAE) gefärbt und anschließend für 5 min in Wasser entfärbt. Das in die DNA-Fragmente interkalierte EtBr wurde auf dem UV-Transilluminator bei 302 nm sichtbar gemacht und das Bandenmuster mit einer CCD-Kamera in digitaler Form festgehalten. Zur vergleichenden Größenbestimmung dienten die unter 3.2.6 beschriebenen DNA-Längenstandards, die neben den Proben aufgetragen wurden.

4.3.10.2 Auftrennung von RNA im denaturierenden Agarosegel (FOURNEY *et al.*, 1988)

RNA-Moleküle bilden stabile Sekundärstrukturen aus, die zu einem veränderten Verhalten in der Gelelektrophorese führen können. Aus diesem Grund werden RNA-Moleküle in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt. 1,4 g Agarose wurden in 100 ml H₂O aufgekocht, leicht abgekühlt und mit 14 ml 10 x MOPS und 21 ml 37 % Formaldehyd versetzt. Nach gründlichem Mischen ließ man die Lösung im Gießstand zu 10 x 15 cm großen Gelen mit einer Dicke von etwa 5 mm erstarren. Jeweils 10 µg einer Gesamt-RNA-Probe wurden mit H₂O auf ein Endvolumen von 40 µl verdünnt und mit 20 µl 3 x RNA-Probenpuffer versetzt. Das Gemisch wurde 10 min bei 65 °C denaturiert und anschließend mindestens 5 min auf Eis gehalten. Das Gel wurde in einem Tank mit 1 x MOPS angeschichtet und beladen. Nach Laden der Proben wurden die Taschen mit 1 x MOPS aufgefüllt und eine Spannung von 100 – 120 V angelegt, wodurch die RNA-Moleküle elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Nach 2 – 3 h wurde die Auftrennung der RNA auf dem UV-Transilluminator (302 nm) mit der CCD-Kamera dokumentiert.

4.4 Northernblot-Analyse

4.4.1 Herstellung radioaktiv markierter Sondenmoleküle

Für die Herstellung radioaktiv markierter Sondenmoleküle wurden DNA-Fragmente ab einer Größe von etwa 400 bp verwendet, welche durch Restriktionsspaltung oder PCR und anschließende Elution aus dem Agarosegel gewonnen wurden. Die Markierungsreaktion erfolgte nach der random-prime-Methode (FEINBERG und VOGELSTEIN, 1983), wobei randomisierte Hexanucleotide nach Bindung an die Sonden-DNA als Ursprung einer Neusynthese des komplementären Strangs dienen. Diese Reaktion wird von einem Klenow-Fragment katalysiert, dem die Exonucleaseaktivität fehlt.

25 - 50 ng des Sondenmoleküls wurden mit 1,4 µl eines random-prime-Mix durch Zugabe von H₂O auf ein Volumen von 10 µl gebracht, 5 min bei 100 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend 5 min auf RT äquilibriert. Nach Erreichen der RT wurden 5 µl Nucleotid-Mix [jeweils 500 µM dCTP, dGTP und dTTP], 5 µl 10 x Klenow-Puffer [MBI Fermentas] und 24 µl H₂O zugegeben. Die Zugabe von 5 µl [α ³²P]dATP und 1 µl Klenow-Fragment exo⁻ [1 U/µl] erfolgte im Isotopenlabor. Nach Zugabe des Enzyms wurde der Ansatz durch Ansnippen gemischt, kurz zentrifugiert und 3 h bei 37 °C inkubiert. Dieser Ansatz wurde bei geringeren Mengen an benötigter radioaktiver Sonden-DNA proportional bis zu einem Endvolumen von 30 µl reduziert, ohne dass die spezifische Radioaktivität der markierten Sondenmoleküle beeinträchtigt wurde.

Die Aufreinigung der Sondenmoleküle erfolgte mit Hilfe von in TE (pH 7,5) äquilibriertem Sephadex G-50, welches in einer Pasteurpipette als Säulenmaterial verwendet wurde. Die radioaktive Probe wurde auf die Säule geladen und die Elution erfolgte in 200 µl Schritten mit TE (pH 7,5), wobei die Position der radioaktiven Probe mit dem Zählrohr verfolgt wurde. Maximal drei 200 µl - Fraktionen der austretenden, radioaktiven Moleküle wurden aufgefangen und im Scintillationsmessgerät ausgemessen, bevor sie vereinigt wurden. Bis zum Gebrauch wurde die aufgereinigte Sonde bei -20 °C aufbewahrt.

4.4.2 Transfer von RNA auf Nylonmembranen

Die wie unter 4.3.10.2 beschriebenen aufgetrennten und dokumentierten RNA wurde durch Kapillarblot auf Nylonmembranen transferiert, um eine Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sondenmolekülen zu ermöglichen.

Zu diesem Zweck wurde das Gel zunächst zweimal 15 min leicht in H₂O geschüttelt, um die Konzentration an Formaldehyd im Gel zu reduzieren. Der Aufbau des Blots erfolgte luftblasenfrei von unten nach oben wie folgt in einer mit 10 x SSC gefüllten Schale: 3 Lagen Fliesspapier 3MM (15 x 30 cm, in 10 x SSC getränkt), Gel (Oberseite nach unten), Maske aus Parafilm (Ränder und Taschen des Gels abdeckend), Nytran®-Membran (15 x 10 cm, zuvor kurz in H₂O aktiviert), 3 Lagen Fliesspapier 3MM (15 x 10 cm, in 10 x SSC getränkt), ca. 10 cm Zellstoff, Beschwerung (z. B. Chemikalienkatalog). Nach mindestens einer Nacht konnte die Apparatur wieder abgebaut werden. Der Filter mit der transferierten RNA wurde kurz unter fließendem H₂O abgespült, um anhaftende Gelreste zu entfernen, und anschließend mindestens 1 h bei 80 °C inkubiert. Durch diesen Schritt erfolgte die kovalente Bindung der RNA an die Filteroberfläche. Der trockene Filter wurde erneut mit Hilfe des UV-Transilluminators dokumentiert und bis zur Weiterverwendung zwischen zwei Lagen Fließpapier trocken aufbewahrt.

4.4.3 Hybridisierung von Northernblots

Die Erkennung eines Transkripts auf der Filteroberfläche durch ein radioaktiv markiertes Sondenmolekül erfolgt durch die Erkennung der komplementären Basensequenz während des Hybridisierungsvorgangs. Durch anschließende, sequentiell stringenter Waschschritte wird die Hybridisierung hochspezifischer Basenpaarungen bevorzugt, während unspezifisch gebundene Sondenmoleküle abgewaschen werden.

Der Filter wurde in eine gründlich gereinigte Hybridisierungsröhre eingeführt und mit 10 ml Dextransulfatlösung mindestens 30 min bei 43 °C vorhybridisiert. Wurden mehrere Filter pro Röhre hybridisiert, so betrug das Volumen der Dextransulfatlösung 15 ml. Die aufgereinigte, radioaktive Sonde und eine Heringssperma-DNA-Lösung (HSP) wurden 10 min bei 100 °C im Wasserbad inkubiert. Das heiße HSP wurde in einer Endkonzentration von 100 µg/ml in die Röhre pipettiert. Schließlich wurde ein geeignetes Volumen der radioaktiven Sonde in die

Röhre gegeben, ohne die Filteroberfläche zunächst direkt zu berühren. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 43 °C.

Das Waschen der Filter wurde bei 65 °C in Schritten von mindestens 15 min Länge in der Röhre und bei abnehmender Radioaktivität im Schüttelwasserbad durchgeführt. Dazu wurde sukzessiv jeweils zweimal mit adäquaten Volumina folgender Lösungen gewaschen: 2 x SSC, 0,1 % SDS, 1 x SSC, 0,1 % SDS, 0,5 x SSC, 0,1 % SDS, und wenn nötig 0,1 x SSC, 0,1 % SDS. Die Filter wurden im feuchten Zustand in Haushaltsfolie eingeschweißt und durch Auflegen auf einen zuvor gelöschten Phosphoimager-Screen exponiert. Die Exposition erfolgte im Regelfall über Nacht, bei sehr schwachen Signalen auch mehrere Tage. Nach Auslesen der Daten vom Screen im Phosphoimager wurden die Daten mit Hilfe des Programms PCBAS 2.09 der Firma raytest Isotopenmeßgeräte GmbH ausgewertet.

4.4.4 Mehrfachhybridisierung von Filtern

Nach Abwaschen hybridisierter radioaktiver Sondenmoleküle ist es möglich, einen Filter zur Hybridisierung mit weiteren Sonden zu verwenden. Das Abwaschen einer radioaktiven Sonde erfolgte durch zweimalige Inkubation des Filters mit 500 ml kochender 0,1%iger SDS-Lösung im Schüttelwasserbad bei 75 °C für jeweils 30 min. Der Filter konnte anschließend direkt einer neuen Vorhybridisierung zugeführt werden.

4.5 Isolierung, Reinigung, Quantifizierung und Darstellung von Proteinen

4.5.1 Isolierung von Proteinen aus *N. tabacum*

4.5.1.1 Denaturierende Gesamtzellextrakte

Blattgewebe wurde unter N₂ (liq.) aufgemörsert, 50 – 200 mg des Pulvers im gefrorenen Zustand in ein Eppendorfgefäß eingewogen, mit der dreifachen Menge (mg = µl) Harnstoffextraktionspuffer (65 °C) gründlich vermischt und bei 65 °C für 10 min geschüttelt. Nach 5 min Inkubation wurden die Eppendorfgefäße mehrmals invertiert. Anschließend wurde der Rohextrakt 15 min bei 15.000 rpm und RT (Eppendorf 5403) zentrifugiert, um Zelltrümmer und hochmolekulare DNA abzutrennen. ²/₃ Volumen des Überstandes wurden in ein neues Eppendorfgefäß überführt, ohne das Pellet zu verletzen. Die Proteinextrakte wurden bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C gelagert. Vor Auftragung in der SDS-PAGE wurden die Extrakte lediglich 5 min bei 65 °C inkubiert. Die Auftragung erfolgte ohne Zusatz weiterer Lösungen.

4.5.1.2 Denaturierende Kernproteinextrakte (modifiziert nach PRAT *et al.*, 1989, NIGGEWEG, 1999)

Alle Schritte der Prozedur fanden soweit nicht anders angegeben bei 4 °C statt. 6 – 10 g Blattgewebe wurden unter Kühlung mit N₂ (liq.) im Mixer zu einem homogenen Pulver zerkleinert und in 40 ml Puffer 1A resuspendiert. Durch anschließende Filtration durch zwei Lagen Miracloth wurden größere Zelltrümmer von der Organellensuspension abgetrennt. Eine nachfolgende Zentrifugation (SS34, 1.100 rpm, 2 min 40 sec) trennte verbleibende Zelltrümmer und Stärke ab. Der Überstand wurde in frische 50 ml Röhrchen überführt und

abermals zentrifugiert (SS34, 2.000 rpm, 3 min), um die Zellkerne zu pelletieren. Der verbleibende Überstand wurde verworfen und das Kernpellet mit einem Haarpinsel in 8 ml Puffer 0,5A resuspendiert. Die Kernpelletierung wurde insgesamt viermal durchgeführt, um die Kerne von den leichteren Chloroplasten zu trennen. Das letzte Kernpellet wurde anstatt in 0,5A in 350 – 450 µl Harnstoffextraktionspuffer aufgenommen, gründlich durch Verrühren und vortexen gemischt und für 10 min bei 60 °C im Wasserbad inkubiert. Durch anschließende Ultraschallbehandlung wurde die hochmolekulare DNA fragmentiert und somit die Lösung weniger viskos. Durch eine abschließende Zentrifugation (Eppendorf 5403, 15.000 rpm, RT, 10 min) wurden Membranbestandteile der Zellkerne pelletiert. Der verbleibende Überstand wurde in neue Eppendorfgefäße überführt. Im folgenden wurden die Extrakte wie die unter 4.5.1.1 beschriebenen denaturierenden Gesamtzellextrakte behandelt.

4.5.1.3 Normalisierung der Proteinmengen mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung

Die Konzentration der unter 4.5.1.1 und 4.5.1.2 gewonnenen denaturierenden Proteinextrakte kann nicht mit Hilfe von photometrischen Verfahren ermittelt werden. Aus diesem Grund erfolgte die Normalisierung durch Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE und anschließende Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blue.

5 – 10 µl der Extrakte wurden in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde 10 min in Fixierlösung geschüttelt, anschließend in Coomassie-Färbelösung überführt und über Nacht bei RT leicht geschüttelt. Die Entfärbung erfolgte am nächsten Tag durch zweimal dreistündige Inkubation in Coomassie-Entfärbelösung bei RT unter leichtem Schütteln. Das Gel wurde mit einem handelsüblichen Durchlichtscanner aufgenommen und die gefärbten Proteine densitometrisch mit Hilfe des Programms PCBAS 2.09 ausgewertet. Aufgrund dieser Auswertung wurden die relativen Proteinkonzentrationen berechnet.

4.5.1.4 Native Gesamtzellextrakte (JUPIN und CHUA, 1996)

2 g abgenutzte Suspensionszellen wurden unter N₂ (liq.) im Mörser zerkleinert und in 4 ml NLB-Puffer aufgenommen. Nach dem Auftauen wurde zu der Suspension unter langsamem Rühren tropfenweise 4 M Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 10 % gegeben. Nach vollständiger Zugabe des Ammoniumsulfat wurde die Lösung 30 min bei 4 °C langsam gerührt. Die ausgefällten, hochmolekularen Substanzen und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für 90 min bei 150.000 g und 4 °C in der Ultrazentrifuge pelletiert und verworfen. Die im Überstand enthaltenen Proteine wurden mittels Ammoniumsulfat ausgefällt. Hierzu wurde zu der Probe unter langsamem Rühren 0,3 g/ml Ammoniumsulfat gegeben, und die Lösung 30 min bei 4 °C gerührt. Die Proteine wurden durch 20minütige Zentrifugation bei 10.800 g und 4 °C in der Sorvall-Kühlzentrifuge pelletiert. Im Anschluss wurde das Proteinpellet in 1,8 ml NEB-Puffer mit 50 mg/l Antipain, 0,5 mg/l Leupeptin und 0,2 mM Pefabloc resuspendiert. Zur Entfernung des Ammoniumsulfats wurde der Extrakt zweimal 8-10 h gegen 500 ml NEB-Puffer dialysiert.

Die Konzentrationsbestimmung des Proteinextraktes erfolgte nach der Methode von Bradford (s. 4.5.3). Zur Lagerung wurden Aliquots des Extraktes in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

4.5.1.5 Native FixProt-Gesamtzellextrakte (modifiziert nach KEGLER, unveröffentlicht)

Blattgewebe bzw. abgenutzte Suspensionszellen wurden unter N₂ (liq.) aufgemörsert und 100 – 300 mg des Pulvers in einem gekühlten Eppendorfgesäß mit 2 Vol. 1,5 x FixProt-Extraktionspuffer (4 °C) versetzt. Um die Proteinkonzentration von Extrakten aus Zellsuspensionen zu erhöhen, wurde für Extrakte dieser Art 1 Vol. 2 x FixProt-Extraktionspuffer verwendet. Die Vermischung erfolgte mit Hilfe einer Pipettenspitze bzw. durch Vortexen strikt bei 4 °C im Kühlraum, bis die Probe homogen aufgetaut war. Nicht lösliche Bestandteile der Probe wurden durch anschließende Zentrifugation (Eppendorf 5403, 15000 rpm, 2 °C, 10 min) pelletiert und der Überstand in gekühlte Eppendorfgesäße überführt. Der Extrakt wurde nach Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (4.5.3) in gekühlte Eppendorfgesäße aliquotiert, in N₂ (liq.) schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C gelagert. Die Aliquotierung war notwendig, da wiederholtes Auftauen die Qualität der Extrakte unreproduzierbar veränderte.

4.5.2 Fällung von Proteinen (nach WESSEL und FLÜGGE, 1984)

Zur Konzentrierung von Proteinextrakten wurden die Proteine mit Methanol/Chloroform gefällt. 100 µl der Proteinlösung wurden mit 400 µl Methanol, 100 µl Chloroform und 300 µl H₂O vermischt. Zur Phasentrennung wurde die Probe 2 min bei 10.700 rpm in der Biofuge zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgezogen. Die in der Interphase befindlichen Proteine wurden durch Zugabe von 300 µl Methanol ausgefällt. Nach dem Mischen wurden die Proteine durch Zentrifugation (3 min, 13.000 rpm, Biofuge) pelletiert. Das Pellet wurde 15 min bei RT getrocknet und in 30 µl 1 x Protein-Probenpuffer resuspendiert. Die Probe konnte nach Denaturierung für 5 min bei 100 °C für die SDS-PAGE verwendet werden.

4.5.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten (nach BRADFORD, 1976)

Ein geeignetes Volumen des Proteinextrakts wurde in einer Microtiterplatte vorgelegt und mit 200 µl Bradfordreagenz (1 : 5 mit H₂O verdünnt) durch Pipettieren gemischt. Nach einer Reaktionszeit von 5 min wurde die Adsorption im Dynex Plate-Reader bei 595 nm bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe einer mit BSA erstellten Eichgerade ermittelt.

4.5.4 Affinitätsaufreinigung von Antiseren (modifiziert nach OLMSTED, 1981)

Die hier beschriebene Methode zur Affinitätsaufreinigung von polyklonalen Antiseren stellt eine Modifikation des Immunoblots dar. 1 mg aus einer Affinitätschromatographie gewonnenen Fusionsproteins wurde in einem präparativen 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Durch Anfärben der Membran mit Ponceau-Lösung wurde das Fusionsprotein sichtbar gemacht und ausgeschnitten. Die Membran wurde in ca. 2 mm breite Streifen zerschnitten und die Membranstücke über Nacht bei 4 °C in PBS-T (0,05 % Tween-20) mit 5 % Magermilch inkubiert. Nach 5minütigem Waschen in PBS-T bei RT wurde die Membran für 3h in 10 ml des entsprechenden 1 : 5 mit PBS-T verdünnten polyklonalen Antiserums unter Schütteln bei RT inkubiert. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch 6 x Waschen mit PBS-T für jeweils 10 min entfernt.

Die Elution der Antikörper von der Membran erfolgte in vier Elutionsschritten. In jedem Schritt wurden 2 ml 0,1 M Glycin (pH 2,5) auf die Membran pipettiert und 30 sec stark geschüttelt. Die eluierten Antikörper wurden in 1 ml einer vorgelegten Neutralisierungslösung (0,3 M Tris-HCl pH 8,0, 1x PBS, 4 °C) dekantiert und sofort gemischt. Die vier Eluate wurden mit Hilfe von Centricon-50 Ultrazentrifugenröhrchen mit 2 x 2 ml PBS (0,02 % Natriumazid) umgepuffert und abschließend auf 200 µl eingengt. Zur Stabilisierung der Antikörper wurde BSA in einer Endkonzentration von 10 µg/ml zugesetzt. Die affinitätsgereinigten Antiseren wurden aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Einmal aufgetaute Aliquots wurden bis zum Aufbrauchen bei 4 °C aufbewahrt. Die immunochemischen Eigenschaften der Eluate wurde durch Immunoblot-Analysen (4.6) ermittelt, wobei Konzentrationsreihen der Antiseren verwendet wurden.

4.5.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970)

Die Auftrennung von Proteine unter denaturierenden Bedingungen erfolgte in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen (10 % oder 12,5 % PAA) unter 1 x PAGE-Puffer. Trenngele enthielten 10 – 12,5 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (19 : 1), 0,4 M Tris-HCl (pH 8,8), 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % TEMED und 0,1 % Ammoniumpersulfat (APS). Sammelgele enthielten 4 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (37,5 : 1), 125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,1 % (w/v) SDS, 0,2 % TEMED und 0,1 % APS. Vor Auftragung wurden die Proben in Hamstoffpuffer 5 min bei 65 °C bzw. in Protein-Probenpuffer 5 min bei 100 °C denaturiert und vor dem Laden auf RT bzw. Eis abgekühlt. Vor dem Laden wurden durch Spülen mit einer Kanüle mögliche PAA-Reste aus den Taschen der Gele entfernt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte je nach Gelgröße bei 80 bzw. 100 V im Sammelgel und 100 bzw. 130 V im Trenngel.

4.6 Immunoblot-Analyse

4.6.1 Proteintransfer auf Polyvinylidenflourid (PVDF)-Membranen (modifiziert nach KYHSE-ANDERSEN, 1984)

SDS-PAA-Gele wurden nach der Proteinauftrennung 2 x 15 min in Kathodenpuffer (25 mM Tris-HCl, 40 mM Glycin, 10 % Methanol; pH 9,4) äquilibriert. Die Aktivierung der PVDF-Membran erfolgte in 100 % Methanol. Die Membran wurde anschließend in Anodenpuffer II (25 mM Tris-HCl, 10 % Methanol; pH 10,4) äquilibriert. Der Aufbau der Transferapparatur erfolgte von unten nach oben luftblasenfrei in folgender Weise: Graphitplatte, 2 Lagen Fließpapier 3MM (der Größe des Gels entsprechend) in Anodenpuffer I (0,3 M Tris-HCl, 10 % Methanol; pH 10,4) äquilibriert, 1 Lage Fließpapier 3MM (der Größe des Gels entsprechend) in Anodenpuffer II äquilibriert, aktivierte und äquilibrierte PVDF-Membran, äquilibriertes Gel, 3 Lagen Fließpapier 3MM (der Größe des Gels entsprechend) in Kathodenpuffer äquilibriert, Graphitplatte. Durch Anlegen eines Stroms von 1 mA/cm²/h für 1 Stunde wurde der Transfer der Proteine auf die Membran gewährleistet. Nach dem Transfer wurde die PVDF-Membran kurz in 100 % Methanol inkubiert und anschließend an der Luft getrocknet. Zur weiteren Verwendung der Membran musste zunächst eine erneute Aktivierung durch Inkubation in Methanol durchgeführt werden.

4.6.2 Detektion mit spezifischen Antiseren (Immunoblot-Analyse)

4.6.2.1 Detektion mit affinitätsgereinigtem Antiserum gegen TGA2.2

Alle Schritte erfolgten bei RT. Nach Aktivierung mit Methanol wurde die Membran 5 min unter leichtem Schütteln in 1 x PBS-T (0,05 % Tween-20) äquilibriert. Durch einstündige Inkubation in 1 x PBS-T mit 5 % (w/v) Magermilchpulver wurde die Membranoberfläche abgesättigt. Es folgten zwei Waschschrte für 5 min in 1 x PBS-T mit 0,25 % (w/v) Magermilch. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Antiserum gegen TGA2.2 (2. Elution 1 : 5000 in PBS-T, 0,25 % (w/v) Magermilch) für 2,5 h. Durch darauffolgende Waschschrte 2 x 5 min in 1 x PBS-T, 0,25 % (w/v) Magermilch und 2 x 5 min in 1 x PBS-T wurden unspezifisch gebundene Erstantikörper entfernt. Die anschließende Inkubation mit dem zweiten Antikörper (Donkey anti rabbit Ig, Peroxidase-gekoppelt) erfolgte in einer 1 : 30.000 - Verdünnung für 1,5 h in 1 x PBS-T. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch abschließendes viermaliges Waschen für 5 min in 1 x PBS-T entfernt. zur Detektion gebundener Antikörper wurde der Enhanced Chemiluminescence Plus™ Kit der Firma Amersham entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Die Detektion erfolgte durch Belichtung von Cronex Medical x-ray Filmen 10T der Firma Sterling Diagnostic Imaging, Inc Newark, DE 19714 USA.

4.6.2.2 Detektion mit affinitätsgereinigtem Antiserum gegen TGA2.1 bzw. polyklonalem Antiserum gegen Streptag® II

Die Detektion erfolgte analog der zuvor beschriebenen Prozedur mit folgenden Änderungen: Anstatt 5 % Magermilchpulver wurden 2 % BSA und anstatt 0,25 % Magermilch wurden 0,5 % BSA in 1 x PBS-T (0,05 % Tween-20) verwendet. Die verwendeten Erst-Antiseren waren α TGA2.1: 2. Elution 1 : 6.000 verdünnt bzw. α Streptag® II: 1 : 6.000 verdünnt.

4.7 EMSA

Der Electromobility Shift Assay (EMSA) dient der sensitiven und quantitativen Detektion von Protein-DNA-Wechselwirkungen *in-vitro*. Dabei wird die Migrationsgeschwindigkeit radioaktiv markierter DNA-Fragmente im nativen PAA-Gel durch die Anlagerung von DNA-bindenden Proteinen herabgesetzt, was wiederum durch autoradiografische Verfahren sichtbar gemacht werden kann. Der Supershift stellt ein Modifikation des EMSAs dar, bei der ein im Bindeansatz zugegebener Antikörper Proteine spezifisch erkennt, und so zu einer zusätzlichen Retardation des Komplexes führt, sofern sich das erkannte Protein im DNA-bindenden Komplex befindet.

4.7.1 Herstellung radioaktiv markierter DNA-Fragmente für den EMSA

Zur Markierung mit $[\alpha^{32}\text{P}]\text{dATP}$ wurden die unter 3.2.5 beschriebenen DNA-Fragmente verwendet. Wie unter 3.2.5.3 geschildert, wurden die Fragmente durch Spaltung aus den entsprechenden Vektoren gewonnen.

Für die radioaktive Markierung der DNA-Fragmente wurde die Eigenschaft der Klenow-Polymerase ausgenutzt, 3'-OH-Überhänge bis zum 5'-Phosphat-Ende aufzufüllen. 1,7 pmol gespaltener Vektor wurden in einem 20 μl Ansatz unter folgenden Bedingungen für 2-3 h bei 37 °C inkubiert: 0,5 x KGB-Puffer, 25 μM dTTP, 4,0 μl $[\alpha^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ (40 μCi) und 4 U

Klenow-Polymerase exo^- . Durch Zugabe von EDTA (pH 8,0) auf eine Endkonzentration von 20 μ M wurde die Reaktion abgestoppt. Die Abtrennung nicht eingebauter Nucleotide erfolgte mit Hilfe einer Micro SpinTMG25 Column der Firma Amersham entsprechend den Herstellerangaben. Die weitere Aufarbeitung des Gelshiftfragments geschah durch Auftragung des gesamten Spaltungsansatzes auf ein 5%iges natives PAA-Gel. Das radioaktiv markierte Fragment konnte durch Exposition eines Röntgenfilms genau lokalisiert werden und wurde ausgeschnitten. Die Sonde wurde aus dem PAA-Gelstück durch Zugabe von 400 μ l TE-Puffer über Nacht eluiert. Die Strahlung der Sonde im Überstand wurde im Szintillationsmeßgerät quantifiziert. Ein Mikroliter der präparierten Sondenlösung enthielt 1,3 bis 1,6 fmol markiertes Fragment.

4.7.2 Gelshift

Eine geeignete Menge Protein wurde bei 4 °C in einem Endvolumen von 30 μ l in 1 x Bindepuffer mit 1,5 - 3,0 μ g poly dI/dC gemischt. Bei Verwendung von FixProt-Extrakten wurden außerdem 3 μ l 10 x Proteinase-Inhibitoren-Mix zugesetzt. Bei Bedarf erfolgte zusätzlich die Zugabe von NaF (Endkonzentration 12,5 mM) bzw. Quercetin (Endkonzentration 12,5 μ M). Nach Zugabe von 4 μ l radioaktiv markierten DNA-Fragments wurde der Bindeansatz auf RT gestellt und 10 min inkubiert. Anschließend wurden 10 μ l 4 x Ladepuffer zugesetzt und der Ansatz aufs Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 4 °C in einem nativen PAA-Gel (5 % Acrylamid / Bisacrylamid (19 : 1), 10 % Glycerin, 0,04 % TEMED und 0,06 % APS in 1 x TBE), das vor der Beladung einem Vorlauf (1 h, 150 V, 4 °C in 1 x TBE) unterzogen wurde. Zur Auftrennung wurde über Nacht eine Spannung von 65 V angelegt. Das Gel wurde nach der Auftrennung auf zwei Lagen Fließpapier 3MM transferiert und im Geltrockner bei 80 °C für 2h getrocknet. Die Detektion radioaktiver Banden erfolgte durch Exposition eines Phosphoimager-Screens für mindestens 4 h und anschließendes Einlesen der Daten im Phosphoimager.

4.7.3 Supershift

Für die Supershift-Analyse wurde in den Bindeansatz zusätzlich 1 μ l der entsprechenden Rohantiseren pipettiert.

4.7.4 Quantitative Auswertung von EMSAs

Die Quantifizierung der Bandenintensitäten erfolgte nach Einlesen der Daten im Phosphoimager mit Hilfe des Programms PCBAS 2.09. Die Intensität einer Bande wurde in Prozent an der insgesamt geshifteten Menge radioaktiven Fragments errechnet. Dabei ist zu beachten, dass eine Bande, die die Doppelbesetzung repräsentiert (Bande 3) doppelt so viel gebundene TGA-Faktoren darstellt, wie eine Bande gleicher Intensität, die durch die Einfachbesetzung entstanden ist (Banden 1 und 2).

5 Ergebnisse

5.1 Herstellung verschiedener Fusions- und Deletionsderivate von *TGA2.1* und *TGA2.2*

Ein im Rahmen dieser Arbeit hergestelltes Kassettensystem ermöglicht die in-frame-Fusion der *VP16*-Aktivierungsdomäne bzw. der *ENGRAILED*-Silencerdomäne an das 5'- oder das 3'-Ende der Transkriptionsfaktoren *TGA2.1* bzw. *TGA2.2*. Alle entstandenen Fusionsderivate tragen zwischen den Fusionspartnern die Sequenz für einen Peptidlinker mit der Aminosäuresequenz (G₄S)₃, der durch einen vergrößerten Abstand eine sterische Behinderung der Fusionspartner minimieren soll. Außerdem wurde ein N-terminal um 113 Aminosäuren verkürztes Deletionsderivat von *TGA2.1* (*TGA2.1-57*; KRAWCZYK, 1999) für die Überexpression in transgenen Tabakpflanzen hergestellt, um die Auswirkungen einer N-terminalen Deletion auf die Funktion von *TGA2.1 in-vivo* untersuchen zu können. C-terminal befindet sich zudem bei allen in dieser Arbeit konstruierten Derivaten eine acht Aminosäuren lange Sequenz, die von einem polyklonalen Antiserum gegen Streptag® II erkannt wird.

Alle neu eingefügten Sequenzabschnitte wurden mittels Sequenzierung überprüft. Die verschiedenen Derivate wurden in high-copy Vektoren (pUC57 oder pSK) kloniert und anschließend in den binären Vektor pBINHyg-TX inseriert. Die verschiedenen Derivate der TGA-Faktoren stehen somit unter der Kontrolle eines Tetracyclin-induzierbaren CaMV 35S Promotorderivats (GATZ *et al.*, 1992), das in Abwesenheit des Tet-Repressors in transgenen Pflanzen die gleiche Aktivität zeigt wie der CaMV 35S Promotor. In Abbildung 5-1 sind schematisch die verschiedenen Fusions- und Deletionsderivate gezeigt, deren Wirkung im Rahmen dieser Arbeit in transgenem Tabak untersucht wurden. Die Klonierung der einzelnen Kassettenvektoren und der binären Vektoren ist in Kapitel 4.3.7 beschrieben.

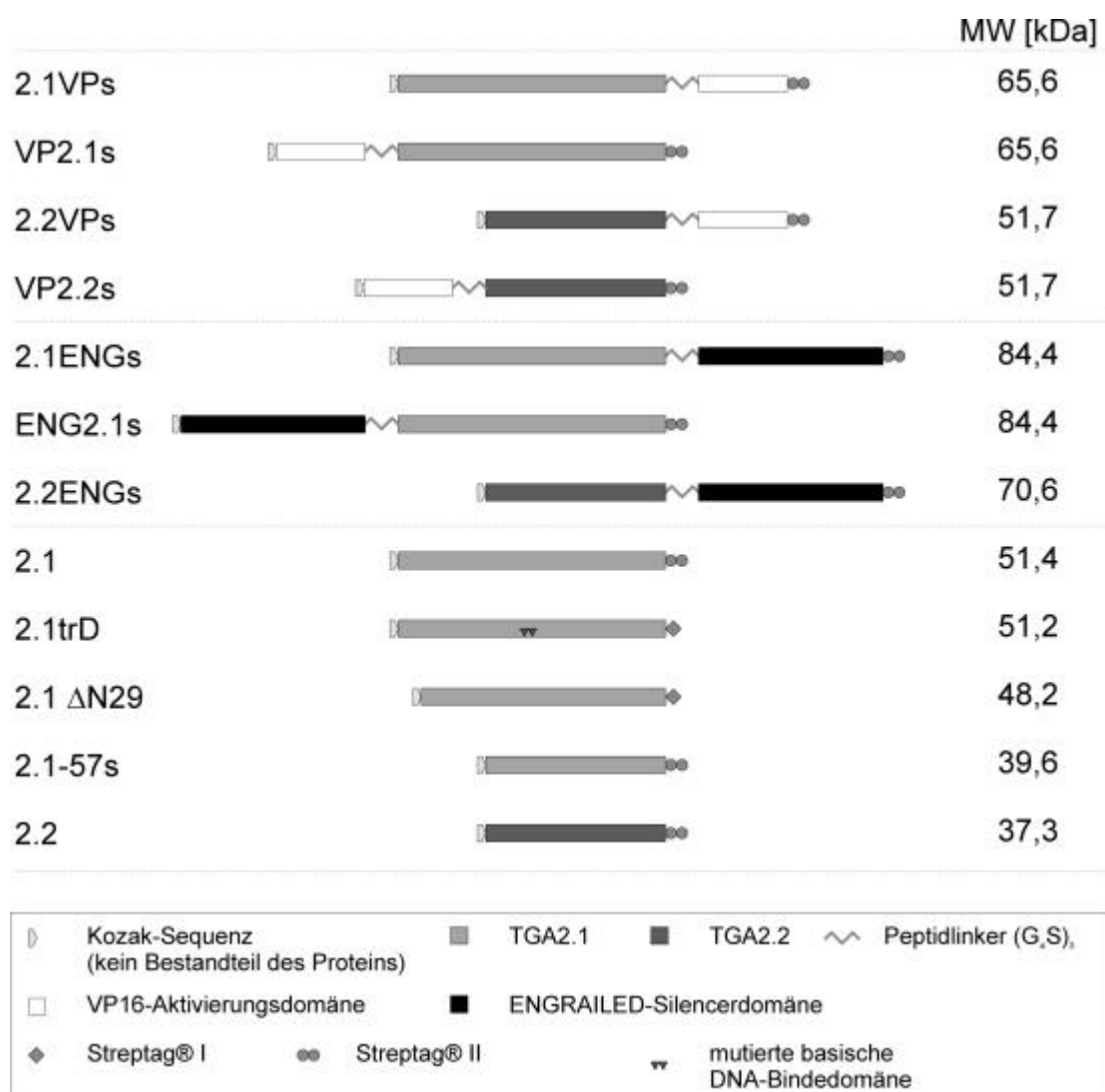


Abbildung 5-1: Schematische Darstellung der Fusions- bzw. Deletionsderivate, deren Wirkung im Rahmen dieser Arbeit in transgenen Pflanzen untersucht wurde.

5.2 Herstellung und Charakterisierung transgener Tabakpflanzen

5.2.1 Herstellung transgener Tabakpflanzen

Die unter 4.3.7.15 entstandenen binären Vektoren wurden in kompetente *Agrobacterium tumefaciens* Zellen vom Stamm GV2660 transformiert. Mit diesen wurden transgene Tabakpflanzen, die das *as-1-GUS-Reporter*konstrukt trugen, mittels Agrobakterienvermitteltem Gentransfer transformiert. Hierbei handelte es sich um Pflanzen der Linie SNN *as-1-GUS* #12. Bei der Bezeichnung der transgenen Linien wird im folgenden auf die Nennung des *as-1-GUS*-Reporters verzichtet.

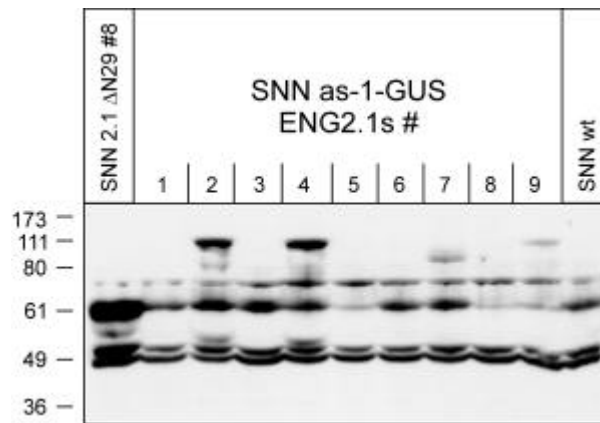


Abbildung 5-3: Immunoblot-Analyse zur Identifikation hochexprimierender SNN ENG2.1s-Linien. Aufgetragen wurden jeweils gleiche Volumina von denaturierenden Gesamtzellextrakten der Linien SNN 2.1 Δ N29 #8 (Spur 1), SNN ENG2.1s #1 - #9 (Spuren 2 – 10) und SNN wt (Spur 11). Die Detektion erfolgte mit affinitätsgereinigtem TGA2.1-Antiserum. Der Marker gibt das ungefähre Molekulargewicht in kDa an.

5.2.2.3 SNN 2.1VPs

Es wurden neun unabhängige Pflanzenlinien untersucht. Wie aus Abbildung 5-4 hervorgeht, konnten mittels Immunoblot-Analyse mit dem TGA2.1 Antiserum die Linien SNN 2.1VPs #3 und #6 als die beiden höchstexprimierenden Transformanden identifiziert werden. An ihnen wurden weitere Untersuchungen durchgeführt.

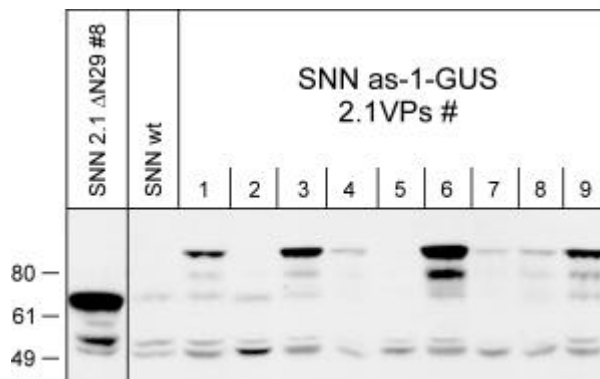


Abbildung 5-4: Immunoblot-Analyse zur Identifikation hochexprimierender SNN 2.1VPs-Linien. Aufgetragen wurden jeweils gleiche Mengen von denaturierenden Gesamtzellextrakten der Linien SNN 2.1 Δ N29 #8 (Spur 1), SNN wt (Spur 2) und SNN 2.1VPs #1 - #9 (Spuren 3 – 11). Die Detektion erfolgte mit affinitätsgereinigtem TGA2.1-Antiserum. Der Marker gibt das ungefähre Molekulargewicht in kDa an.

5.2.2.4 SNN 2.1ENGs

Von dieser Transformation wurden 18 unabhängige Linien untersucht. Als weiterzuverwendende, hochexprimierende Pflanzen wurden die Linien SNN 2.1ENGs #4 und #17 ausgewählt (Abbildung 5-5).

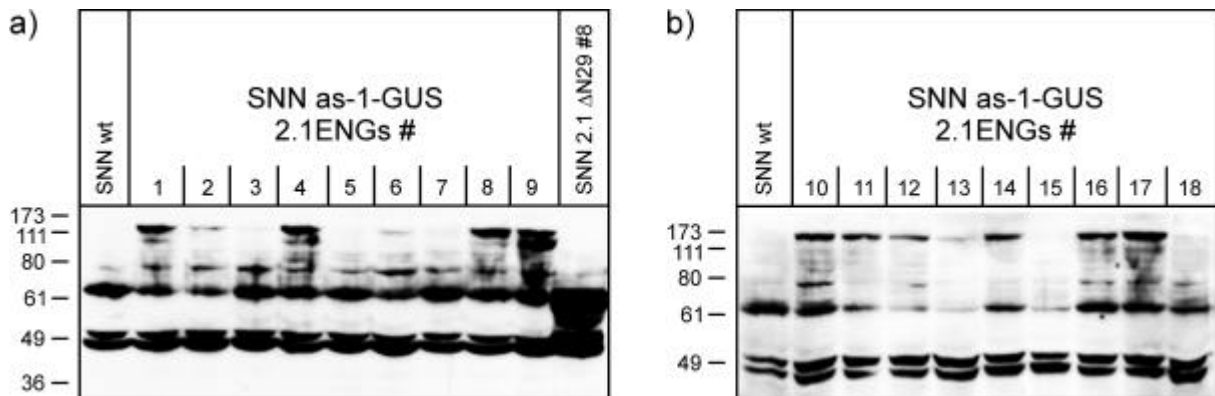


Abbildung 5-5: Immunoblot-Analyse zur Identifikation hochexprimierender SNN 2.1ENGs-Linien. Aufgetragen wurden jeweils gleiche Mengen von denaturierenden Gesamtzellextrakten der Linien a) SNN wt (Spur 1), SNN 2.1ENGs #1 - #9 (Spuren 2 – 10) und SNN 2.1 Δ N29 #8 (Spur 11) bzw. b) SNN wt (Spur 1) und SNN 2.1ENGs #10 - #18 (Spuren 2 – 10). Für beide Immunoblots erfolgte die Detektion mit affinitätsgereinigtem TGA2.1-Antiserum. Der Marker gibt das ungefähre Molekulargewicht in kDa an.

5.2.2.5 SNN 2.1-57s

Es wurden neun unabhängige Linien getestet, von denen die Linien SNN 2.1-57s #1, #4, #6 und #8 eine sehr starke Expression des transgenen Proteins zeigen (Abbildung 5-6). Für Folgeuntersuchungen (Kapitel 5.7) wurde die Linie # 8 verwendet.

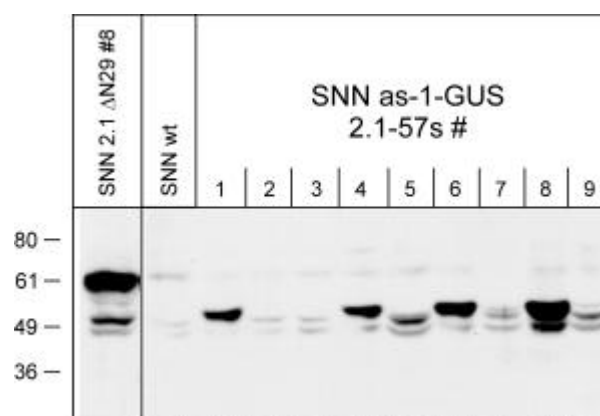


Abbildung 5-6: Immunoblot-Analyse zur Identifikation hochexprimierender SNN 2.1-57s-Linien. Aufgetragen wurden jeweils gleiche Mengen von denaturierenden Gesamtzellextrakten der Linien SNN 2.1 Δ N29 #8 (Spur 1), SNN wt (Spur 2) und SNN 2.1-57s #1 - #9 (Spuren 3 – 11). Die Detektion erfolgte mit affinitätsgereinigtem TGA2.1-Antiserum. Der Marker gibt das ungefähre Molekulargewicht in kDa an.

5.2.3 Charakterisierung auf RNA-Ebene

Da eine eindeutige Feststellung der Expressionsstärke der transgenen Proteine 2.2VPs, VP2.2s bzw. 2.2ENGs mittels Immunoblot aufgrund starker Kreuzreaktionen des Antiserums nicht praktikabel war, erfolgte in diesen Fällen die Auswahl hochexprimierender transgener SNN 2.2VPs-, VP2.2s- bzw. 2.2ENGs-Linien mit Hilfe von Northernblot-Analysen.

5.2.3.1 SNN 2.2VPs

Es wurde die Blatt-Gesamt-RNA von 13 Pflanzen aus Gewebekultur gewonnen, in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt (10 µg/Spur) und auf eine Nytranmembran transferiert. Die Hybridisierung erfolgte mit einer radioaktiv markierten *VP16*-Sonde. Die Linien SNN 2.2VPs #1 und #2 wurden aufgrund ihrer Expressionsstärke (s. Abbildung 5-7) für weitere Versuche ausgewählt.

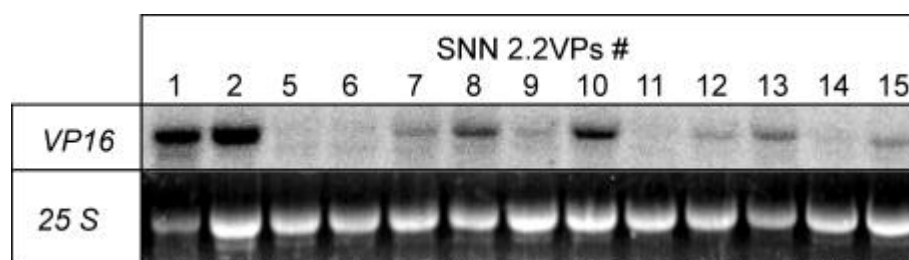


Abbildung 5-7: Northernblot-Analyse zur Identifikation hochexprimierender SNN 2.2VPs-Linien. Es wurden jeweils 10 µg Gesamt-RNA der Linien SNN 2.2VPs #1, #2 und #5 - #15 aufgetragen. Der Filter wurde mit einer radioaktiv markierten *VP16*-Sonde hybridisiert.

5.2.3.2 SNN VP2.2s

Pflanzen vom Typ SNN VP2.2s wurden unter meiner Anleitung von ALEXANDRA CZEKO hergestellt und auf RNA-Ebene auf die Expression des Transgens getestet (s. CZEKO, 2000). Aufgrund dieser Charakterisierung wurden für Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit die Linien SNN VP2.2s #3 und #8 verwendet.

5.2.3.3 SNN 2.2ENGs

Es wurde von 13 Gewebekulturpflanzen Blatt-Gesamt-RNA präpariert. Jeweils 10 µg RNA wurden im denaturierenden Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nytranmembran geblottet und diese einer Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten *ENG*-Sonde unterzogen. Die beiden Linien mit der stärksten Transgenexpression, SNN 2.2ENGs #3 und #7 (s. Abbildung 5-8), wurden für weitere Experimente ausgewählt.



Abbildung 5-8: Northernblot-Analyse zur Identifikation hochexprimierender SNN 2.2ENGs-Linien. Es wurden jeweils 10 µg Gesamt-RNA der Linien SNN 2.2ENGs #1 - #4 und #6 - #14 aufgetragen. Der Filter wurde mit einer radioaktiv markierten *ENG*-Sonde hybridisiert.

5.3 Vergleich der relativen Proteinmengen transgener und endogener TGA-Faktoren der Klasse II

5.3.1 Vergleich der Proteinmengen in Gesamtzellextrakten

Um die Größenordnung der Proteinüberexpression in den verschiedenen verwendeten transgenen Linien miteinander vergleichen zu können, wurden denaturierende Gesamtzellextrakte der Linien SNN wt, SNN 2.1 Δ N29 #8, SNN 2.1 #22, SNN VP2.1s #2 und #4, SNN 2.1VPs #3 und #6, SNN 2.2 #8, SNN 2.2VPs #1 und #2, SNN VP2.2s #3 und #8 hergestellt, in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Die Immunoblot-Analyse erfolgte unter Verwendung eines polyklonalen Antiserums gegen Streptag® II bzw. eines affinitätsgereinigten Antiserums gegen den N-Terminus von TGA2.1. Eine Detektion von TGA2.2 in Gesamtzellextrakten war aufgrund von sehr starken Kreuzreaktionen des TGA2.2-Antiserums nicht möglich.

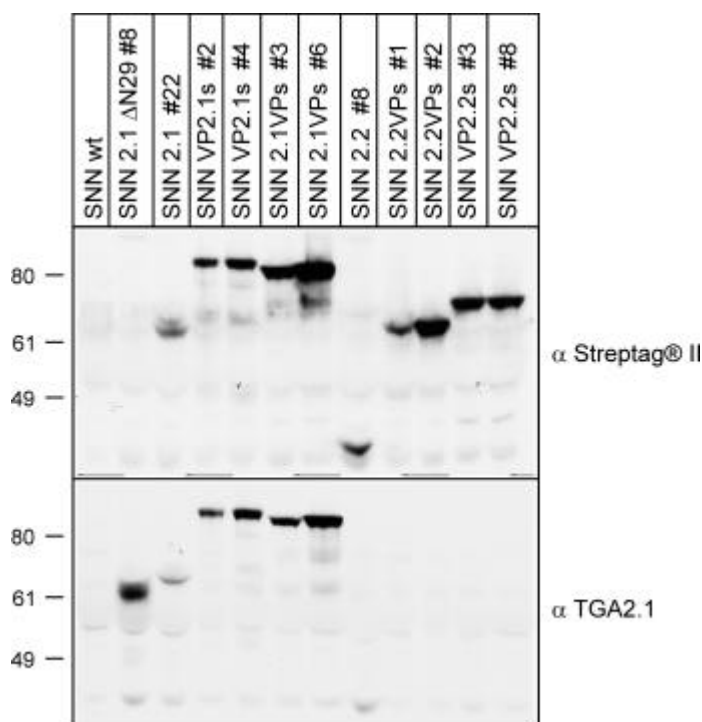


Abbildung 5-9: Vergleich der TGA-Proteinmengen in Gesamtzellextrakten mittels Immunoblot-Analyse. Beide Filter wurden identisch beladen: (von links nach rechts) SNN wt, SNN 2.1 Δ N29 #8, SNN 2.1 #22, SNN VP2.1s #2 und #4, SNN 2.1VPs #3 und #6, SNN 2.2 #8, SNN 2.2VPs #1 und #2, SNN VP2.2s #3 und #8. Die Detektion erfolgte mit polyklonalem Antiserum gegen Streptag® II bzw. mit affinitätsgereinigtem Antiserum gegen TGA2.1. Der Marker gibt das ungefähre Molekulargewicht in kDa an. TGA2.1 Δ N29 besitzt den Streptag® I. Alle anderen transgenen Proteine besitzen den Streptag® II (s. auch Abbildung 5-1).

Die Immunoblot-Analyse in Abbildung 5-9 zeigt für Gesamtzellextrakte eine etwa gleichmäßig starke Überexpression der verschiedenen transgenen VP16-Fusionsproteine in nahezu allen untersuchten Linien. Ausnahmen sind die Linie SNN 2.2VPs #1, die weniger transgenes Protein enthält, und die Linie SNN 2.1VPs #6, die mehr transgenes Protein enthält als die übrigen Linien. In den Linien SNN 2.1 #22 und SNN 2.2 #8 lässt sich etwa die gleiche Menge an transgenem Protein detektieren wie in der Linie SNN 2.2VPs #1. In der Linie SNN 2.1 Δ N29 #8 ist die Menge an transgenem Protein anhand der Detektion mit dem TGA2.1-Antiserum etwa in der Größenordnung der meisten Fusionsproteine einzustufen.

Bei Betrachtung des Laufverhaltens der verschiedenen Fusionsproteine fällt auf, dass Fusionsproteine mit N-terminaler VP16-Domäne langsamer laufen als die jeweils umgekehrte Fusion, obwohl beide Fusionsproteine das gleiche Molekulargewicht besitzen. Dieses Phänomen tritt in gleicher Weise für TGA2.1- und TGA2.2-Fusionsderivate auf, so dass offenbar die VP16-Domäne dafür verantwortlich ist. Es kann sich hierbei nicht um eine C-terminale Deletion handeln, da alle Proteine vom Antiserum gegen den Streptag® II erkannt werden. Auch die Klonierung einer zu kurzen VP16-Aktivierungsdomäne ist aufgrund von Sequenzbestimmungen äußerst unwahrscheinlich. Die Orientierung der Fusion mit der VP16-Domäne verändert offenbar das Laufverhalten der Fusionsproteine in der SDS-PAGE unterschiedlich stark. Unabhängige Experimente lieferten die gleichen Resultate bezüglich des Laufverhaltens und der Expressionsstärke.

5.3.2 Vergleich der Proteinmengen in Kernextrakten

Für eine Beeinflussung der Zielgenexpression ist die Kernlokalisierung der Fusionsproteine in ausreichend großer Menge eine notwendige Voraussetzung. Um die kernlokalisierten transgenen und endogenen Mengen von TGA2.1- und TGA2.2-Derivaten in den neu hergestellten transgenen Linien miteinander zu vergleichen, wurden aufgrund der in Abbildung 5-9 gezeigten Daten die Linien SNN VP2.1s #4 und SNN 2.2VPs #2 sowie SNN wt für die Herstellung von Kernextrakten verwendet. Obwohl SNN 2.1VPs #6 die stärkste Überexpression eines Fusionsproteins zwischen TGA2.1 und der VP16-Aktivierungsdomäne zeigte, wurde diese Linie nicht verwendet, da sie sowohl in Gewebe- als auch in Erdkultur ein abnormales Wachstum zeigte, das bei keiner der anderen Linien zu beobachten war.

Um gleichzeitig den Einfluß von SA auf die Kernlokalisierung der Klasse II TGA-Faktoren zu untersuchen, wurden uninduzierte und SA-induzierte Blätter verglichen. Blätter der zuvor genannten Linien wurden mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 5,8) vakuuminfiltriert und

nach einstündiger Vorinkubation mit 1 mM SA behandelt. Aus uninduzierten und für drei Stunden SA-behandelten Blättern wurden Kernproteine (modifiziert nach PRAT *et al.*, 1989; NIGGEWEG, 1999) isoliert und gleiche Proteinmengen in der SDS-PAGE aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine dreier identisch beladener Gele wurden auf PVDF-Membranen gebロットet und im Immunoblot untersucht. Die Detektion erfolgte mit affinitätsgereinigten Antiseren gegen TGA2.1 und TGA2.2 bzw. dem polyklonalen Antiserum gegen Streptag® II.

Um ein Gesamtbild der Population an TGA-Faktoren der Klasse II und deren Derivaten im Zellkern der verwendeten transgenen Pflanzen zu gewinnen, wurden die Ergebnisse der zuvor beschriebenen Immunoblots in Abbildung 5-10 mit den Daten zweier Immunoblots von KLINGEBIEL verglichen, die unter meiner Anleitung entstanden sind und 2001 in ihrer Staatsexamensarbeit veröffentlicht werden. Das Ergebnis der halbquantitativen Auswertung ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 5-1: a) Zusammenfassung der halbquantitativen Auswertung der kernlokalisierten TGA2.1- und TGA2.2-Derivate in den Linien SNN wt, SNN VP2.1s #4 und SNN 2.2VPs #2 aus Abbildung 5-10. Angaben in Prozent der kernlokalisierten TGA2.2-Menge in SNN wt (fett und kursiv). b) Abschätzung der Mengenverteilung von TGA2.2-Homo- und Heterodimeren im Zellkern. Aufgrund des hohen Überschusses an TGA2.2 wird angenommen, dass die Majorität aller TGA-Dimere TGA2.2 enthält. Aus diesem Grund werden keine Angaben zu Homodimeren von TGA2.1-Derivaten gemacht, die zusätzlich deutlich schwächer binden.

a)	TGA2.1	TGA2.2	VP2.1s	2.2VPs
SNN wt	7,5	<i>100</i>	-	-
SNN VP2.1s #4	7,5	200	75	-
SNN 2.2VPs #2	7,5	200	-	100

b)	TGA2.1/TGA2.2	TGA2.2/TGA2.2	VP2.1s/TGA2.2	2.2VPs/TGA2.2
SNN wt	7,5	92,5	-	-
SNN VP2.1s #4	7,5	117,5	75	-
SNN 2.2VPs #2	7,5	92,5	-	100

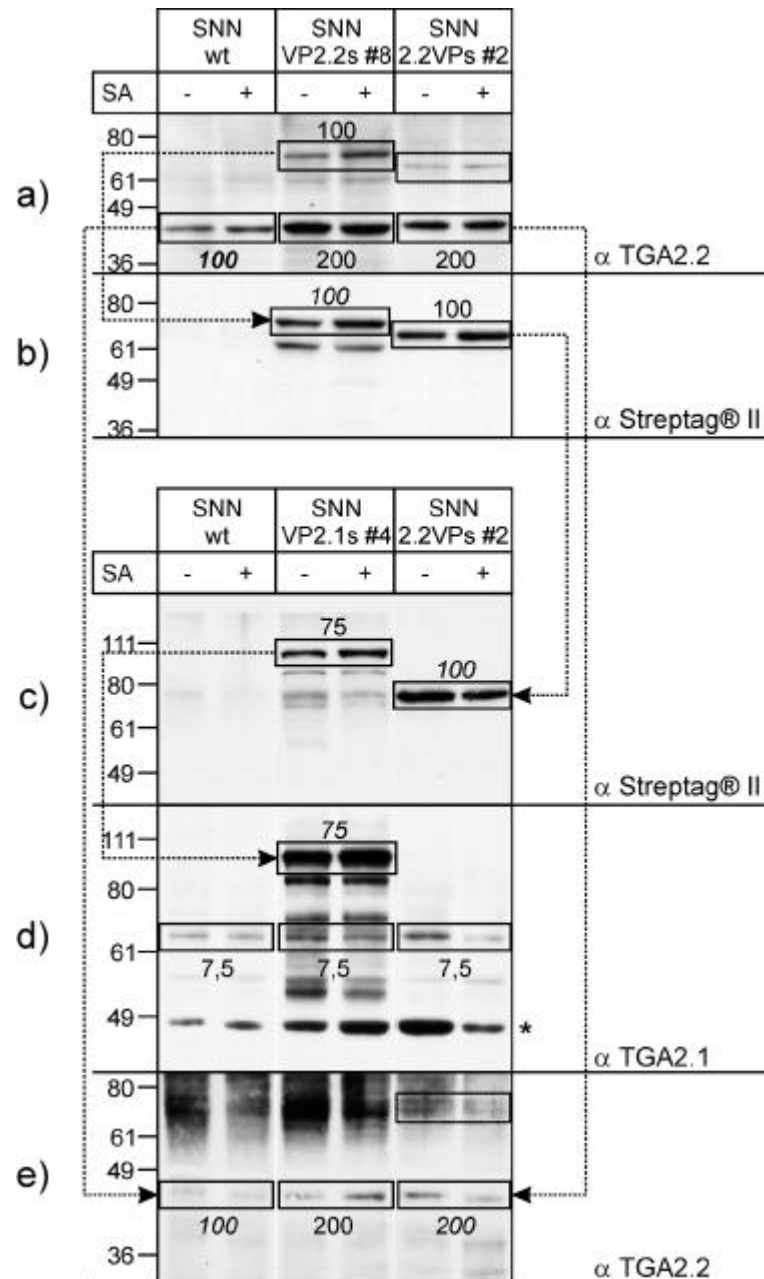


Abbildung 5-10: Vergleich der kernlokalisierten Proteinmengen von TGA2.1- und TGA2.2-Derivaten in transgenen Linien und SNN wt. Pro Gel wurden gleiche Proteinmengen aus Kernextrakten von uninduzierten (-) und für drei Stunden SA-behandelten (+) Blättern der Linien SNN wt, SNN VP2.2s #8, SNN 2.2VPs #2 und SNN VP2.1s #4 aufgetragen, in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen geblottet. Die Detektion erfolgte mit den rechts angegebenen Antisera. Links sind die ungefähren Molekulargewichte in kDa angegeben. Die PAA-Konzentration betrug in a), b) und e) 12,5 % und in c) und d) 10 %. Die Immunoblots unter a) und b) wurden unter meiner Anleitung von KLINGEBIEL hergestellt und werden 2001 in ihrer Staatsexamensarbeit veröffentlicht. Werte in Prozent bezogen auf die TGA2.2-Menge in Kernen von SNN wt (**100 %**). Kursive Werte dienen als Basis der Mengenabschätzung innerhalb jedes Gels, Pfeile kennzeichnen die Herkunft von Basiswerten.

Bezüglich der in Abbildung 5-10 dargestellten Ergebnisse sind folgende Anmerkungen zu machen:

In a) ist das mit dem TGA2.2-Antiserum detektierte Protein 2.2VPs gegenüber der in b) mit dem Streptag® II-Antiserum nachgewiesenen Menge dieses Proteins unterrepräsentiert. Aufgrund der Eindeutigkeit des Signals wurde der mit dem Streptag® II-Antiserum ermittelte Wert für die Berechnung herangezogen. Die Richtigkeit der Ergebnisse aus b) wird durch die in gezeigten Daten zur Proteinmenge in Gesamtzellextrakten unterstützt, nach denen in SNN 2.2VPs #2 sogar mehr transgenes Protein zu finden ist als in SNN VP2.2s #8.

Die Unterschiede in der detektierten VP2.1s-Proteinmenge in d) werden auf Ungleichbeladung zurückgeführt, wie an der mit * gekennzeichneten unspezifischen Kreuzreaktion abzulesen ist.

Obwohl eine Quantifizierung von endogenem TGA2.2 in e) problematisch ist, kann man durch den Vergleich mit a) schließen, dass auch in SNN VP2.1s #4 die Menge an endogenem TGA2.2 im Kern erhöht ist.

Aus den Abschätzungen in Tabelle 5-1 und Abbildung 5-10 geht hervor, dass die Fusionsproteine aller untersuchten transgenen Pflanzen deutlich im Kern nachzuweisen sind. Es ist an dieser Stelle ausdrücklich darauf hinzuweisen, dass es sich lediglich um eine Abschätzung der Größenordnung der Proteinmengen handelt. Diesbezüglich sind folgende Punkte hervorzuheben:

- In SNN VP2.1s #4 ist das transgene Protein etwa 10 mal stärker exprimiert als der endogene TGA2.1. In SNN 2.2VPs #2 kommt die Transgenexpression nur etwa der Expression des endogenen TGA2.2 im Wildtyp gleich.
- Zusätzlich ist zu beobachten, dass es in beiden transgenen Linien zu einer konstitutiven Erhöhung der kernlokalisierten Menge an endogenem TGA2.2 um etwa 100 % kommt. Da sich in der Pflanze Heterodimere zwischen TGA2.1 und TGA2.2 bilden, muss unter dieser Voraussetzung die jeweilige Menge an transgenem Protein in Bezug zur Summe aller Klasse II TGA-Faktoren gesetzt werden. Demnach beträgt der Anteil der transgenen Proteine an der Gesamtheit der Klasse II TGA-Faktoren in den transgenen Linien zwischen 33 und 36 %.
- Wie aus Tabelle 5-1b) abzulesen ist, wird die Menge an TGA2.1/TGA2.2-Heterodimeren mit etwa 7,5 % der Gesamtheit an Dimeren im Wildtyp in beiden transgenen Linien nicht beeinflusst. Auch die Menge an TGA2.2-Homodimeren ist in den transgenen Linien mit einer Abweichung von $\pm 12,5$ % unverändert zum Wildtyp. Demnach liegen die Mengen an TGA2.2/VP2.1s bzw. TGA2.2/2.2VPs-Heterodimeren

mit 75 – 100 % der Gesamtmenge an Dimeren im Wildtyp in derselben Größenordnung.

- Ferner lässt sich anhand der Daten in Tabelle 5-1 ablesen, dass in SNN wt die relative kernlokalisierte Menge an TGA2.2 etwa 13 mal höher ist als die Menge an TGA2.1. In vorherigen Studien konnte im EMSA in ASF-1 aus Kernextrakten von SNN wt-Blättern ebenfalls deutlich mehr TGA2.2 als TGA2.1 nachgewiesen werden (NIGGEWEG, 1999).

5.4 Auswirkung von Fusionsproteinen aus VP16-Aktivierungsdomäne und TGA2.1 bzw. TGA2.2 auf die Expression von Zielgenen nach Salicylsäure-Induktion

Salicylsäure (SA) ist ein starker Induktor von Genen, deren Promotoren *as-1*-ähnliche Elemente enthalten. Zu diesen Promotoren zählen in Tabak u. a. das Gen *Nt103*, das für eine Gluthathion S-Transferase codiert und das Gen *PR1a*, das für das pathogenesis related protein 1a codiert. Neben diesen beiden Genen liegt in den im Rahmen dieser Arbeit hergestellten transgenen Pflanzen das *as-1-GUS-Reporter*konstrukt vor, das die Sequenz des CaMV 35S Promotors vom Transkriptionsstart bis zur Position -90 (*as-1*-Element) fusioniert an das Gen für die β -Glucuronidase beinhaltet. Durch die Untersuchung der Transkription dieser Zielgene in den zuvor charakterisierten, transgenen Pflanzen lassen sich Aussagen über die *in-vivo* DNA-Bindung der TGA-Faktoren machen.

5.4.1 Untersuchungen zur Expression von Zielgenen drei Stunden nach Salicylsäure-Induktion

Zur Untersuchung der frühen SA-induzierten Transkription möglicher Zielgene von TGA2.1 und TGA2.2 wurden Blattscheiben der Linien SNN *as-1-GUS* #12 (SNN wt), SNN 2.1 Δ N29 #8, SNN 2.1 #22, SNN VP2.1s #2 und #4, SNN 2.1VPs #3 und #6, SNN 2.2 #8, SNN 2.2VPs #1 und #2 und SNN VP2.2s #3 und #8 auf 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 5,8) mit 1 mM SA gelegt. Proben wurden im uninduzierten Zustand und drei Stunden nach Induktion entnommen und die Gesamt-RNA im Northern-Blot untersucht. Zunächst wurden die entstandenen Filter mit radioaktiv markierten Sonden gegen *GUS* und *Nt103* hybridisiert. Die Ergebnisse dieser Hybridisierungen sowie die quantitative Auswertung der Transkriptmengen ist in Abbildung 5-11 dargestellt.

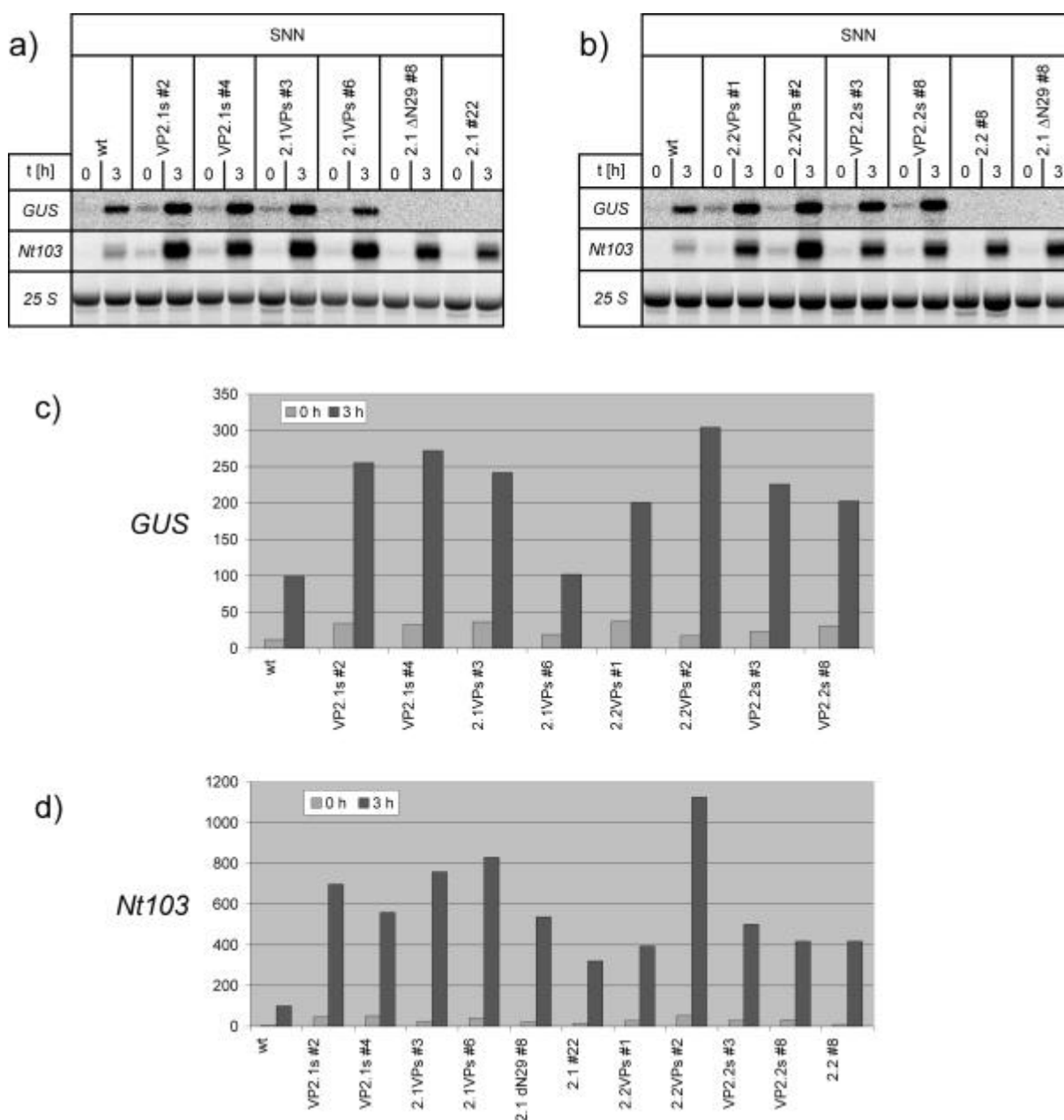


Abbildung 5-11: Expression der Zielgene *GUS* und *Nt103* in transgenen Tabakpflanzen 0 und 3 h nach SA-Induktion. Blattscheiben der angegebenen Linien wurden mit 1 mM SA in 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 5,8) für drei Stunden inkubiert. 10 µg Gesamt-RNA pro Spur wurden im denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und auf Nytranmembran gebロットet. Die Filter wurden nacheinander mit radioaktiv markierten Sonden gegen *GUS* und *Nt103* hybridisiert und mittels Phosphoimager ausgewertet (a) und b)). c) Quantitative Auswertung der *GUS*-Transkriptmengen. d) Quantitative Auswertung der *Nt103*-Transkriptmengen. Quantitative Angaben für c) und d) in Prozent des jeweiligen wt-Signals 3 h nach SA.

Die Linien SNN 2.1 ΔN29 #8, SNN 2.1 #22 und SNN 2.2 #8 enthalten kein *as-1-GUS-Reporter*konstrukt und zeigen deshalb für die *GUS*-Sonde kein Signal.

Die Expression der Zielgene bleibt abhängig von SA: sowohl im uninduzierten als auch im induzierten Zustand kommt es in Anwesenheit der transgenen Proteine zur Erhöhung der Transkription. Im uninduzierten Zustand liegt diese aber nie in der Größenordnung des

induzierten Zustands. In einem weiteren Experiment dieser Art konnten qualitativ und quantitativ ähnliche Ergebnisse erzielt werden.

Im Vergleich der Northernblot-Analysen in Abbildung 5-11 mit den Immunoblot-Analysen in Kapitel 5.3.2 konnte eine Korrelation zwischen der Summe der kernlokalisierten TGA-Faktoren und dem Maß der Transkriptionssteigerung des *as-1-GUS-Reporter*konstrukts bzw. des *Nt103*-Promotors im uninduzierten wie im induzierten Zustand festgestellt werden.

Überträgt man die Daten für die kernlokalisierten Proteine auf die Linien, die nur auf Gesamtzellebene charakterisiert worden sind (Abbildung 5-9), so zeigt sich eine ähnliche Korrelation zwischen TGA-Menge und Transkriptionssteigerung der Zielgene.

5.5 Einfluss von Cycloheximid auf die Expression von Zielgenen

In Kapitel 5.4.1 konnte gezeigt werden, dass die Fusionsproteine aus TGA2.1 bzw. 2.2 und der VP16-Aktivierungsdomäne im uninduzierten Zustand nicht in der Lage sind, die Transkription effektiv zu steigern. Dieses Ergebnis könnte auf einen Inhibitor hindeuten, der im uninduzierten Zustand mit den TGA-Faktoren assoziiert ist und somit die Bindung an *as-1* verhindert. Nach SA-Induktion könnte dieser Komplex zerfallen und die Bindung der TGA-Faktoren an das *as-1*-Element zulassen. Ein solches Modell wurde bereits aufgrund von *in-vitro* Daten von JUPIN und CHUA, 1996 vorgeschlagen. Sie konnten nach SA-Behandlung von Blättern im EMSA eine verstärkte Bindung von Proteinen an *as-1* zeigen. Zudem konnten die Autoren die *as-1*-Bindungsaktivität durch einstündige Behandlung der Pflanzen mit Cycloheximid (CHX) um ein Vielfaches steigern. Mit den generierten transgenen Pflanzen lässt sich dieses Modell *in-vivo* überprüfen. Sollte eine Inkubation mit CHX auch *in-vivo* zum Zerfall eines TGA/Inhibitor-Komplexes führen, so hat die Bindung der Fusionsproteine aus TGA-Faktor und konstitutiver Aktivierungsdomäne die Transaktivierung der Zielgene auch ohne die Anwesenheit von SA zur Folge.

Es wurden mit ausgewählten Linien Induktionsversuche durchgeführt, in denen Blattscheiben entweder mit SA, CHX, oder mit beiden Chemikalien zugleich behandelt wurden. Über einen Zeitraum von 24 Stunden wurden Proben genommen, um die Transkription verschiedener Gene im Northernblot verfolgen zu können. Hierzu wurden die Blattscheiben zunächst mit Kaliumphosphatpuffer mit oder ohne CHX vakuumfiltriert und eine Stunde vorinkubiert. Danach erfolgte ggf. die Induktion mit SA. Proben zur Gewinnung von Gesamtproteinextrakten und Gesamt-RNA wurden entnommen im unbehandelten (-1) Zustand, nach Vorinkubation mit bzw. ohne CHX (0) und für die verschiedenen Behandlungen nach 2, 3, 5, 7, 12 und 24 Stunden.

5.5.1 Untersuchung endogener TGA2.1-Proteinmengen bzw. transgener Proteinmengen in Gesamtzellextrakten

Für die korrekte Interpretation der Ergebnisse aus den nachfolgenden Northernblot-Experimenten (5.5.3ff.) war es wichtig, zunächst die Expression und die Integrität der verschiedenen TGA-Derivate in den transgenen Linien über den gesamten Versuchsverlauf auf Proteinebene zu dokumentieren. Der Nachweis endogener bzw. transgener TGA2.1-Derivate erfolgte zunächst in Gesamtzellextrakten der Linien SNN VP2.1s #4 und SNN 2.2VPs #2 im Immunoblot. Transgene Proteine wurden zusätzlich über den Streptag® II detektiert.

Gleiche Proteinmengen aus Gesamtzellextrakten nach SA- und/oder CHX-Behandlung wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen geblottet. Die Detektion erfolgte mit dem affinitätsgereinigten Antiserum gegen TGA2.1 (Abbildung 5-12 oben bzw. Abbildung 5-13 oben) bzw. dem polyklonalen Antiserum gegen Streptag® II (Abbildung 5-12 unten bzw. Abbildung 5-13 unten).

Für die beiden untersuchten Linien SNN VP2.1s #4 und SNN 2.2VPs #2 konnte im Rahmen von ladungs- und detektionsbedingten Abweichungen weder für endogenes TGA2.1-Protein noch für das jeweilige transgene Protein eine Expressionsveränderung über den Versuchsverlauf festgestellt werden. Insbesondere die Behandlung mit CHX hat keinen sichtbaren Einfluss auf die Menge und den Zustand an nachweisbarem Protein.

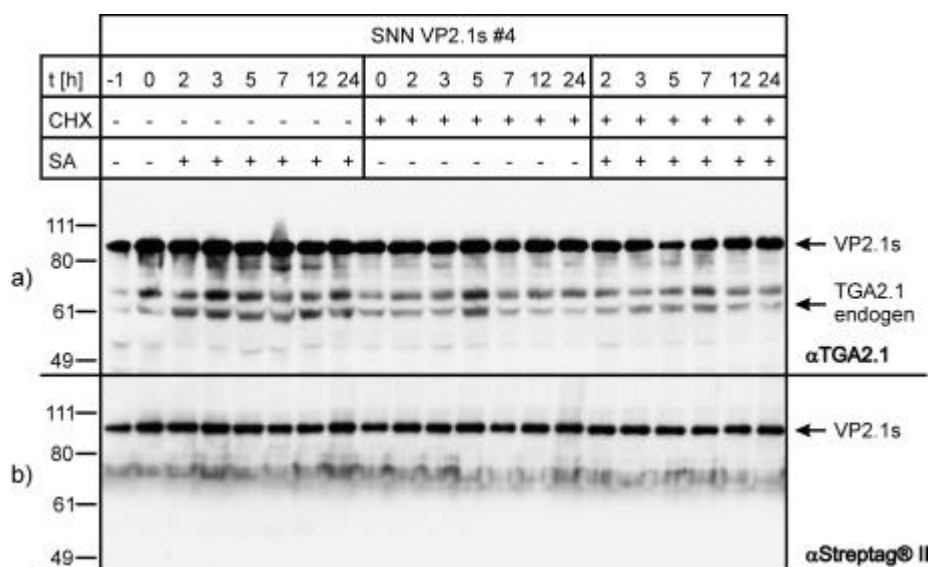


Abbildung 5-12: Verlauf der Expression von endogenem TGA2.1 und transgenem VP2.1s auf Proteinebene in SNN VP2.1s #4. Aus dem unter 5.5 beschriebenen Probenmaterial von SNN VP2.1s #4 wurden Gesamtzellextrakte hergestellt. Normalisierte Gesamtproteinmengen wurden in zwei identischen SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und auf PVDF-Membranen geblottet. Die immunologische Detektion erfolgte mit affinitätsgereinigtem Antiserum gegen TGA2.1 (oben) bzw. mit einem polyklonalen Antiserum gegen Streptag® II (unten). Der Marker gibt das ungefähre Molekulargewicht in kDa an. Pfeile bezeichnen endogenes TGA2.1-Protein bzw. transgenes VP2.1s-Protein.

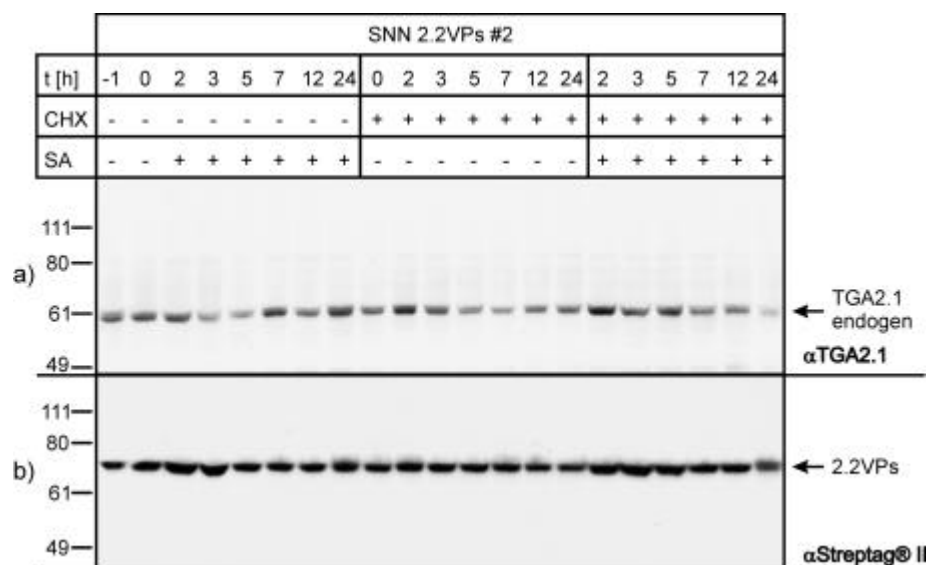


Abbildung 5-13: Verlauf der Expression von endogenem TGA2.1 und transgenem 2.2VPs auf Proteinebene in SNN 2.2VPs #2. Aus dem unter 5.5 beschriebenen Probenmaterial von SNN 2.2VPs #2 wurden Gesamtzellextrakte hergestellt. Alle weiteren Parameter wie in Abbildung 5-12 beschrieben. Pfeile bezeichnen endogenes TGA2.1-Protein bzw. transgenes 2.2VPs-Protein.

5.5.2 Untersuchung endogener TGA-Proteinmengen bzw. transgener Proteinmengen in Kernextrakten

Aufgrund der Qualität des Antiserums lässt sich TGA2.2 nur in Kernextrakten nachweisen. Um neben dem Einfluß einer SA-Behandlung auch die Wirkung von CHX auf die TGA2.2-Menge im Kern abzuschätzen, wurden Blätter der unter 5.3.2 beschriebenen Pflanzen außerdem in gleicher Weise in Gegenwart von 100 mg/l CHX infiltriert, eine Stunde vorinkubiert und anschließend für drei Stunden mit 1 mM SA und 100 mg/l CHX behandelt. Es wurden ebenfalls Kernextrakte hergestellt, normalisierte Proteinmengen aller neun Extrakte mittels SDS-PAGE in der Weise aufgetrennt und auf PVDF-Membranen geblottet, so dass drei identische Filter entstanden. Diese wurden im Immunoblot entweder mit einem affinitätsgereinigten Antiserum gegen TGA2.1 bzw. TGA2.2 oder mit dem polyklonalen Antiserum gegen Streptag® II behandelt und die entsprechenden Proteinspezies mittels Chemilumineszenz detektiert (Abbildung 5-14).

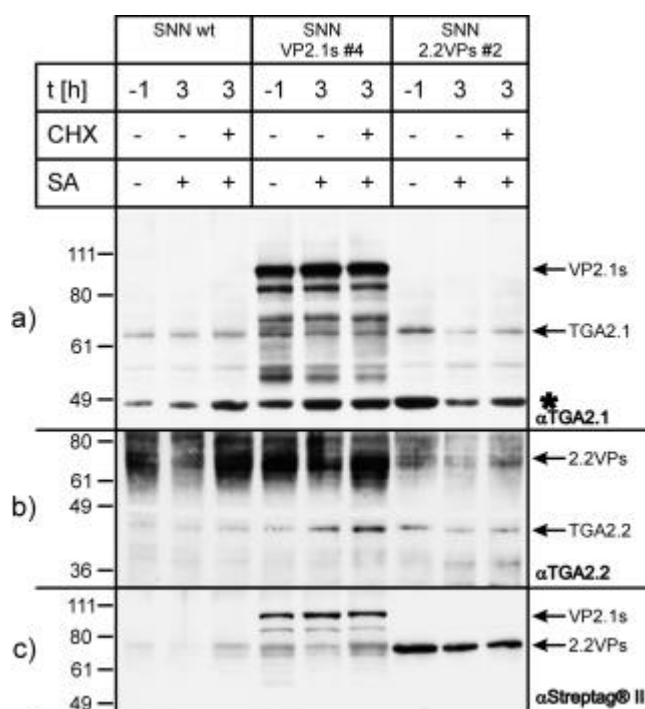


Abbildung 5-14: Nachweis von TGA2.1, TGA2.2 und transgenen Fusionsproteinen in Kernextrakten. Normalisierte Proteinmengen aus Kernextrakten von SA- bzw. CHX-behandelten Blättern der Linien SNN wt, SNN VP2.1s #4 und SNN 2.2VPs #2 wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen geblottet. Proteine wurden im Immunoblot mittels verschiedener Antiseren detektiert: a) affinitätsgereinigtes Antiserum gegen TGA2.1, b) affinitätsgereinigtes Antiserum gegen TGA2.2, c) polyklonales Antiserum gegen Streptag® II. Der Marker gibt die ungefähren Molekulargewichte in kDa an. Pfeile kennzeichnen die Laufweite der nachzuweisenden Proteine. Der Stern markiert eine starke, unspezifische Kreuzreaktion.

Die Behandlung mit CHX hatte keinen Einfluß auf die kernlokalisierten Proteinmengen von endogenem TGA2.1 (Abbildung 5-14a)) und transgenen Proteinen (Abbildung 5-14a) und c)).

Die Menge an endogenem TGA2.2 (Abbildung 5-14b)) scheint in den Linien SNN VP2.1s #4 und SNN 2.2VPs #2 konstitutiv leicht erhöht zu sein, was mit Daten von KLINGEBIEL (unveröffentlicht) übereinstimmt. Zudem scheint in SA- bzw. SA- und CHX-behandelten Proben der Linie SNN VP2.1s #4 die Menge an kernlokalisiertem TGA2.2 anzusteigen. Bezieht man jedoch eine mögliche Ungleichbeladung des Gels mit ein, so relativieren sich diese Aussagen. Mit Hilfe des Antiserums gegen TGA2.2 lässt sich das transgene Protein 2.2VPs nicht eindeutig nachweisen.

Für beide endogenen TGA-Faktoren lässt sich nach SA-Behandlung eine sehr leichte Beschleunigung des Laufverhaltens beobachten. Dieses Phänomen, das auch KLINGEBIEL (unveröffentlicht) zeigen konnte, könnte auf posttranslationaler Modifikation (z. B. Phosphorylierung) beruhen.

Insgesamt ist festzustellen, dass weder SA noch CHX im frühen Verlauf der Induktion einen sichtbaren Einfluß auf die Menge an kernlokalisierten TGA-Faktoren der Klasse II haben.

5.5.3 Einfluss von Cycloheximid auf die Expression von *as-1-GUS*

Aus den unter 5.5 entnommenen Proben wurde die Gesamt-RNA gewonnen und jeweils 10 µg in denaturierenden Agarosegelen aufgetrennt und anschließend auf Nytranmembranen gebliottet.

Die entstandenen Filter wurden zunächst mit der *GUS*-Sonde hybridisiert. Das Ergebnis dieser Hybridisierung ist in Abbildung 5-15 gezeigt.

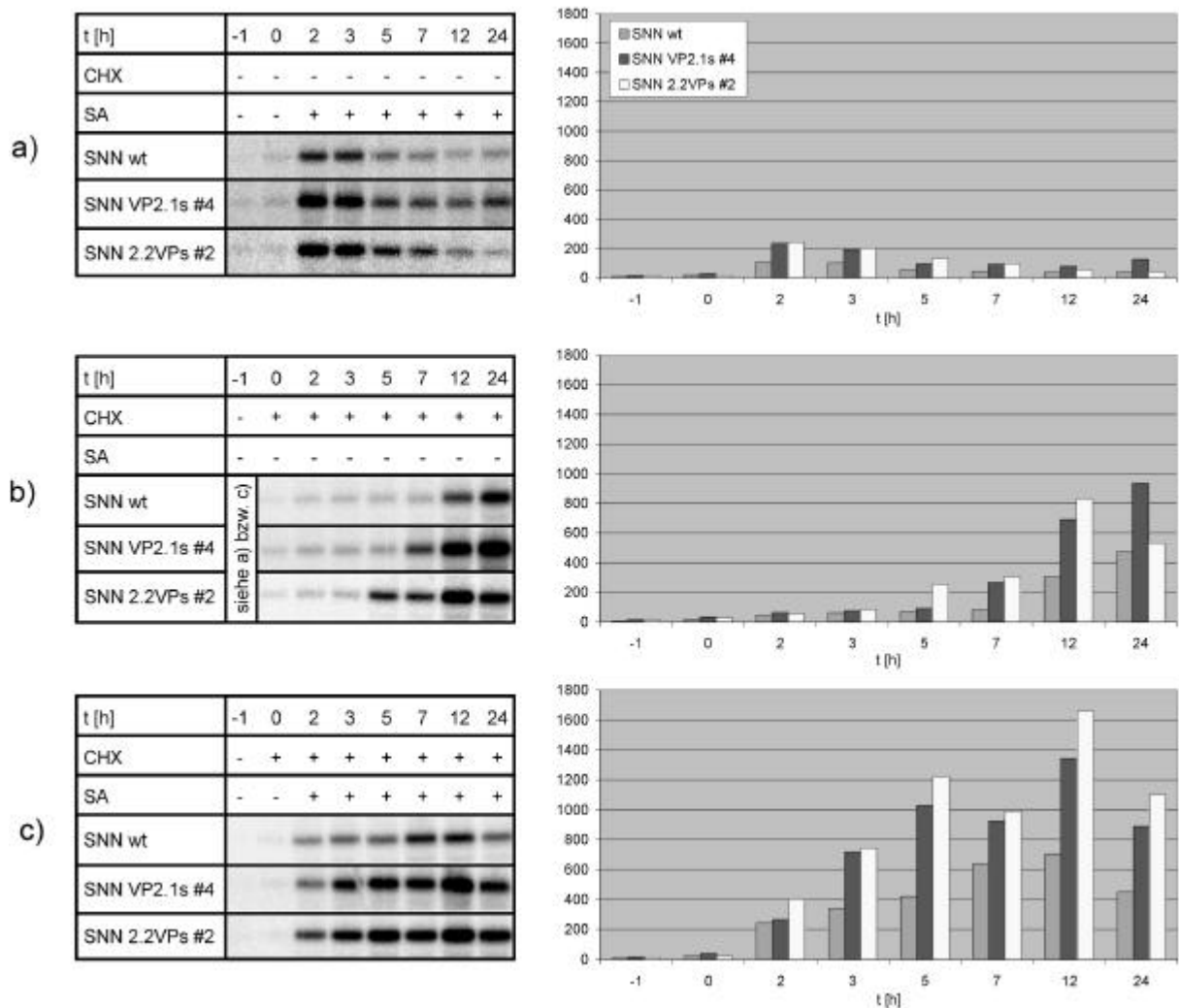


Abbildung 5-15: Induktionsversuche mit SA und CHX. Blattscheiben der Linien SNN *as-1-GUS* #12 (SNN wt), SNN VP2.1s #4 und SNN 2.2VPs #2 wurden in 50 mM Kaliumphosphatpuffer mit oder ohne CHX [100 mg/l] vakuumfiltriert, eine Stunde inkubiert und anschließend dem Puffer ggf. SA [1 mM] zugesetzt. Die Probenentnahme erfolgte wie angegeben. 10 µg Gesamt-RNA pro Spur wurden im denaturierenden Agarosegel aufgetrennt, auf Nytranmembranen gebliottet und die Filter mit einer radioaktiv markierten *GUS*-Sonde hybridisiert. Gezeigt sind jeweils die Ergebnisse der *GUS*-Hybridisierung und die korrespondierende quantitative Auswertung der Signalstärken. Der Abgleich zwischen verschiedenen Filtern erfolgte mit Hilfe von hier nicht gezeigten Standardspuren. Quantitative Angaben entsprechen dem prozentualen Anteil an dem Wildtyp-Signal 3 h nach SA-Behandlung. a) Induktion nur mit SA, b) Induktion nur mit CHX, c) Induktion mit SA nach Vorinkubation mit CHX.

Als wichtige Ergebnisse aus Abbildung 5-15 können festgehalten werden:

- Grundsätzlich verhalten sich beide transgenen Linien gleich bezüglich ihrer Effekte auf die *as-1-GUS*-Transkription. Alle im Wildtyp zu beobachtenden Transkriptionserhöhungen sind in den transgenen Linien um den Faktor zwei bis drei verstärkt.
- Wie bereits in einem unabhängigen Experiment unter Abschnitt 5.4.1 gezeigt, so konnte auch hier für die Linien SNN VP2.1s #4 und SNN 2.2VPs #2 im uninduzierten Zustand keine Aktivität des *as-1*-Elements beobachtet werden, die auf eine konstitutive Bindung der Fusionsproteine hindeuten würde (Abbildung 5-15a) bzw. c)). Es ist also wahrscheinlich, dass die Bindung erst nach SA-Behandlung induziert wird.
- Bezüglich der CHX-Labilität des postulierten TGA/Inhibitor-Komplexes lässt sich feststellen, dass im Gegensatz zu den *in-vitro*-Experimenten von JUPIN und CHUA, 1996, an dem hier *in-vivo* untersuchten *as-1*-Element keine Bindungsverstärkung nach einstündiger CHX-Behandlung eintritt (Abbildung 5-15c), -1 h und 0 h).
- Erst nach sechs- bis achtstündiger (t = 5h bzw. 7h) Inkubation mit CHX (Abbildung 5-15b)) zeichnet sich eine verstärkte *GUS*-Transkription in den transgenen Pflanzen ab. Dies lässt auf eine Bindungsverstärkung der TGA-Faktoren schließen, für die eine kurzzeitige CHX-Behandlung wie bei JUPIN und CHUA, 1996 beschrieben nicht ausreicht.
- Die gleichzeitige Behandlung mit SA und CHX führt in allen Linien zu einer stärkeren Transkription von *as-1-GUS*, als die Summe beider Einzelbehandlungen zusammen (Abbildung 5-15c)). Beide Behandlungen wirken bereits im frühen Verlauf der Transkriptionsaktivierung synergistisch. Im späten Verlauf bleibt der synergistische Effekt erhalten. Der prozentuale Einfluß der transgenen Proteine auf die SA-induzierbare Steigerung der Promotoraktivität ist im Vergleich zum Wildtyp für die Behandlung mit SA und SA + CHX jedoch unverändert.
- Die transiente Aktivierung von *as-1-GUS* nach SA-Behandlung geht in Gegenwart von CHX verloren, da die Bindung der TGA-Faktoren nicht wieder aufgehoben wird. Die Behandlung mit CHX unterdrückt offenbar die SA-induzierte Neusynthese eines Bindungsinhibitors der TGA-Faktoren.

5.5.4 Einfluss von Cycloheximid auf die Expression von *Nt103*

Die in Kapitel 5.5.3 entstandenen Filter wurden weiterhin mit einer radioaktiven Sonde gegen *Nt103* hybridisiert. Die in Abbildung 5-16 dargestellten Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

- In diesem Versuch ist die transiente Aktivierung der *Nt103*-Transkription nach SA-Behandlung nicht so deutlich ausgeprägt, wie sie normalerweise zu beobachten ist (vgl. NIGGEWEG *et al.*, 2000a). Dies hängt vermutlich damit zusammen, dass in diesem Versuch die Blattscheiben nicht nur auf Puffer aufgelegt, sondern zusätzlich vakuumfiltriert wurden.
- Die Induktion nur mit SA führt zu frühen Zeitpunkten (2 und 3h) für beide transgenen Linien gegenüber dem Wildtyp zu einer etwa dreifach erhöhten Transkriptionsrate für *Nt103*. Dieser Einfluß ist mit den Beobachtungen für *as-1-GUS* vergleichbar.
- Im späten Induktionsverlauf verhält sich *Nt103* nicht mehr so homogen wie *as-1-GUS*. Wahrscheinlich beeinflussen weitere *cis*-Elemente im *Nt103*-Promotor die Genexpression.
- Im Gegensatz zu *as-1-GUS* lässt sich *Nt103* durch alleinige CHX-Behandlung nicht induzieren. Weitere *cis*-Elemente im *Nt103*-Promotor verhindern offenbar den für *as-1-GUS* zu beobachtenden Effekt der späten Transkriptionsaktivierung.
- Erfolgt die SA-Induktion nach einstündiger Vorinkubation mit CHX, so lässt sich nach 2 – 3 h in beiden transgenen Linien die Transkription von *Nt103* auf durchschnittlich 240 % der Wildtyp-Transkription steigern. Im späten Verlauf kommt es erneut zu einem inhomogenen Verhalten der Transkription, das auf die Wirkung anderer *cis*-Elemente zurückzuführen ist.
- Der synergistische Effekt von CHX und SA auf die Transkription von *Nt103* fällt weniger stark aus als bei *as-1-GUS*.

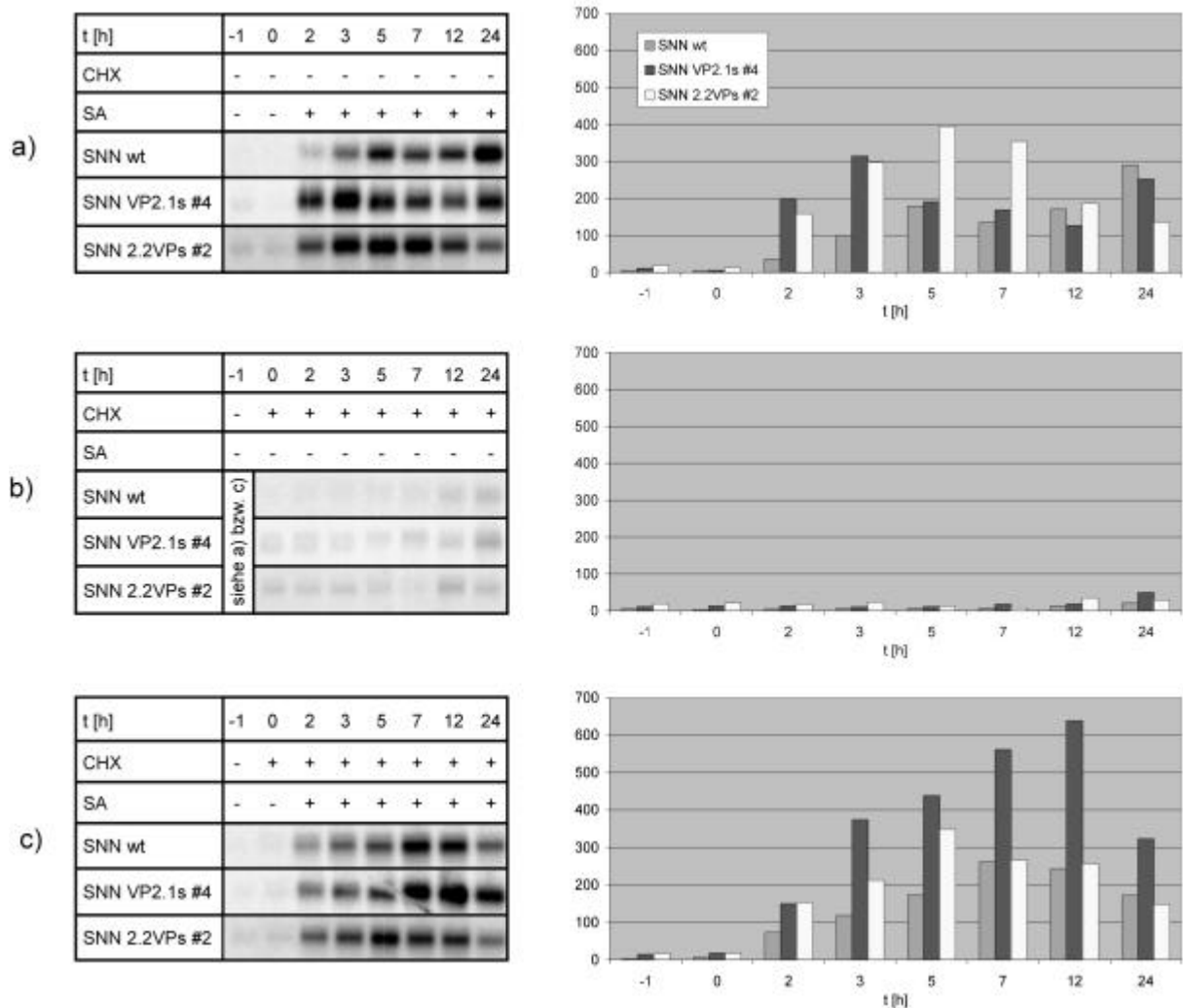


Abbildung 5-16: Induktionsversuche mit SA und CHX an den transgenen Linien SNN *as-1-GUS* #12 (SNN wt), SNN VP2.1s #4 und SNN 2.2VPs #2. Die Filter wurden mit der Sonde gegen *Nt103* hybridisiert. Alle weiteren Parameter wie in Abbildung 5-15 beschrieben. a) Induktion nur mit SA, b) Induktion nur mit CHX, c) Induktion mit SA nach Vorinkubation mit CHX.

5.5.5 Bewertung des Einflusses der Fusionsproteine im Vergleich zum Einfluß der überexprimierten Wildtyp-TGA-Faktoren

Die in Kapitel 5.5 beschriebenen Versuche wurden neben den Linien SNN *as-1-GUS* #12, SNN VP2.1s #4 und SNN 2.2VPs #2 auch mit den transgenen Linien SNN 2.1 Δ N #8, SNN 2.1 #22 und SNN 2.2 #8 durchgeführt. Auch diese Filter wurden mit der Sonde gegen *Nt103* hybridisiert. In Abbildung 5-17 bzw. Abbildung 5-18 sind beispielhaft nur die Resultate der SA-Induktionen dargestellt, da in Anwesenheit von CHX die Linien SNN 2.1 Δ N #8, SNN 2.1 #22 und SNN 2.2 #8 im Mittel für diese Behandlungen nur marginal schwächere Effekte auf die *Nt103*-Expression zeigten als die Linien SNN VP2.1s #4

und SNN 2.2VPs #2 (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse entsprechen damit den Resultaten aus Abbildung 5-16.

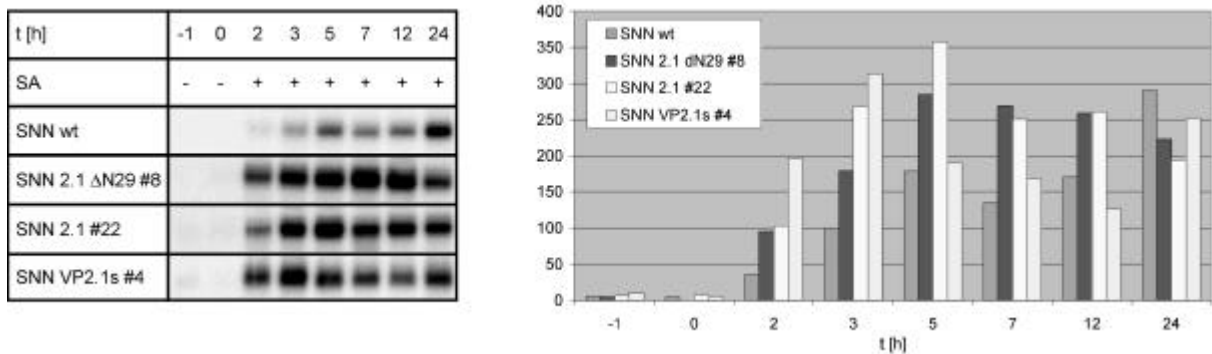


Abbildung 5-17: Induktionsversuche mit SA an transgenen Linien, die TGA2.1-Derivate überexprimieren. Die Filter wurden mit der Sonde gegen *Nt103* hybridisiert. Alle weiteren Parameter wie in Abbildung 5-15 beschrieben.

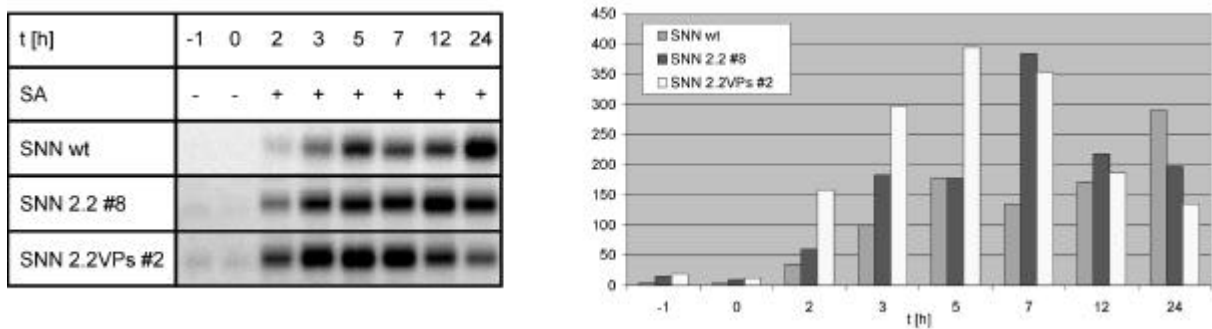


Abbildung 5-18: Induktionsversuche mit SA an transgenen Linien, die TGA2.2-Derivate überexprimieren. Die Filter wurden mit der Sonde gegen *Nt103* hybridisiert. Alle weiteren Parameter wie in Abbildung 5-15 beschrieben.

Für Abbildung 5-17 und Abbildung 5-18 sind folgende Ergebnisse festzuhalten:

- Nach SA-Behandlung steigern alle transgenen Proteine die Transkription von *Nt103* in einem Zeitraum von zwei bis drei Stunden.
- Die TGA2.2-Derivate der Linien SNN 2.2 #8 und SNN 2.2VPs #2 sind darüber hinaus auch zum Zeitpunkt 5h bzw. 7h in der Lage, die *Nt103*-Transkription gegenüber dem Wildtyp anzuheben. Die durchschnittliche Transkriptionssteigerung zwischen zwei und sieben Stunden nach SA-Behandlung ist in diesen beiden Linien zwei- bzw. dreifach.

5.5.6 Einfluss der Fusionsproteine auf die Expression von *PR-1a*

Da das *PR-1a*-Gen ein *as-1*-ähnliches Element in seinem Promotor besitzt, dem eine tragende Bedeutung bei der SA-Induzierbarkeit des Promotors zukommt (STROMPEN *et al.*, 1998), wurden die vorliegenden Filter mit einer radioaktiv markierten Sonde gegen dieses Transkript hybridisiert. Die Induktion von *PR-1a* ist abhängig von Proteinneusynthese (UKNES *et al.*, 1993). Deshalb kommt es in Gegenwart von CHX in keiner der untersuchten Linien zur Transkription dieses Gens (Daten nicht gezeigt). Durch Induktion mit SA lässt sich die *PR-1a*-Transkription in allen Linien etwa gleich stark induzieren (Abbildung 5-19). Die Tatsache, dass das Maximum der Transkription in diesem Versuch zu unterschiedlichen Zeitpunkten erreicht wird, muss als versuchsbedingte Schwankung angesehen werden. Die Überexpression keines der TGA-Derivate hat also einen nennenswerten Einfluß auf die Expression von *PR-1a*.

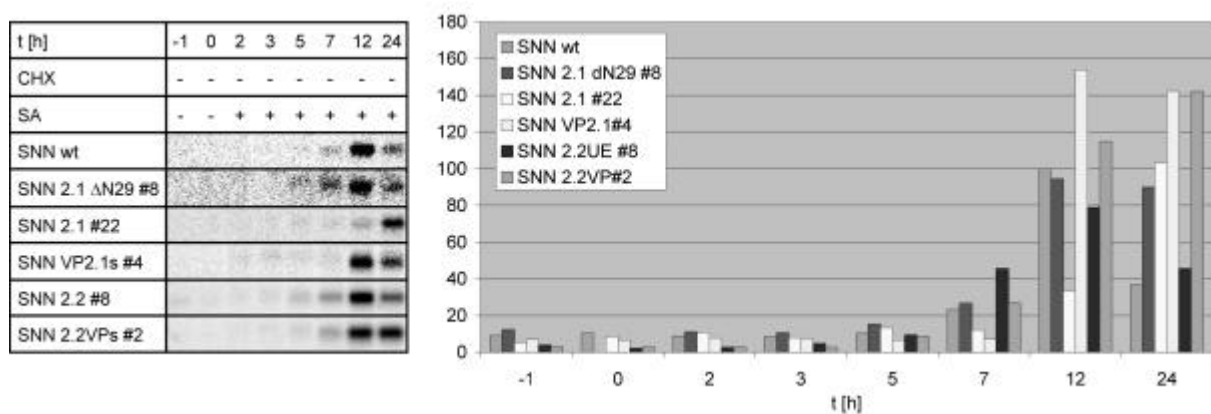


Abbildung 5-19: Induktion von *PR-1a* nach SA-Behandlung. Dargestellt sind ausschließlich die Filter aus Kapitel 5.5, die Proben nach SA-Behandlung tragen. Die Filter wurden mit der radioaktiven Sonde gegen *PR-1a* hybridisiert und autoradiografisch ausgewertet. Die entsprechenden Parameter sind wie in Abbildung 5-15 beschrieben. Die Transkriptionsrate des Wildtyps nach 12 Stunden wurde als 100 % angenommen.

5.5.7 Einfluss der Fusionsproteine auf die Expression des CaMV 35S Promotors

Durch das Einbringen des Transgens besitzt jede der untersuchten Pflanzen den CaMV 35S Promotor und damit ein *as-1*-Element im ursprünglichen Promotorkontext. Durch Vergleich der verschiedenen Transgentranskripte ist es möglich, Rückschlüsse auf das Bindungsverhalten des jeweiligen transgenen Proteins an den 35S Promotor zu ziehen. Zu diesem Zweck wurden die Filter mit der jeweiligen Sonde gegen das Transgen hybridisiert und autoradiografisch ausgewertet. Die Signale der verschiedenen Sonden wurden auf den uninduzierten Zustand normalisiert und in Abbildung 5-20 dargestellt. Als Kontrolle diente die Pflanze Hö *as-1-GUS* #1, die genauso wie die anderen Linien behandelt wurde. Diese Linie zeichnet sich durch die Überexpression des Tet-Repressors unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors aus. Im Falle der Linie SNN 2.2VPs #2 ist anzumerken, dass sich endogenes und transgenes Transkript überlagern. Der *TGA2.2*-Promotor ist aber weder durch SA noch durch CHX nennenswert stimulierbar (Kapitel 5.5.8.2 für SA, Daten für CHX nicht gezeigt). Die im Gesamt-Hybridisierungssignal enthaltenen endogenen Transkriptmengen von *TGA2.2* können aufgrund der schwachen Expression vernachlässigt werden. Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Allein die Infiltration mit anschließender einstündiger Vorinkubation in Puffer (Abbildung 5-20a)) führt zu einer durchschnittlich halbierten Aktivität des CaMV 35S Promotors in allen transgenen Linien, die ein TGA-Derivat überexprimieren. Nur in der Kontrolllinie Hö *as-1-GUS* #1 ist dies nicht zu beobachten.
- SA-Behandlung allein hat keinen Einfluß auf die Aktivität des CaMV 35S Promotors.
- Die Behandlung mit CHX (Abbildung 5-20b)) führt in allen Linien zur deutlichen Steigerung der CaMV 35S Promotoraktivität. Dabei zeichnet sich nach zwei und drei Stunden ein leicht steigender Einfluß von *TGA2.1* Δ N29 auf die Transkription ab, der aber nicht für VP2.1s zu beobachten ist. VP2.1s sowie *TGA2.2* wirken sich im Vergleich zum Wildtyp negativ auf die Transkriptionssteigerung durch CHX aus.
- Bei gleichzeitiger Applikation von CHX und SA (Abbildung 5-20c)) kommt es zu einer zur CHX-induzierten Aktivitätssteigerung und zusätzlich zur synergistischen Verstärkung durch SA. Dieser synergistische Effekt wird durch die Überexpression von *TGA2.1* und *TGA2.1* Δ N29 deutlich gesteigert. Typisch für SA-induzierte Aktivierung *as-1*-ähnlicher Elemente geschieht dies erst zwei Stunden nach SA-Gabe, jedoch nicht in transienter Weise. Die Linien SNN VP2.1s #4, SNN 2.2 #8 und SNN 2.2VPs #2 verhalten sich wie der Wildtyp.

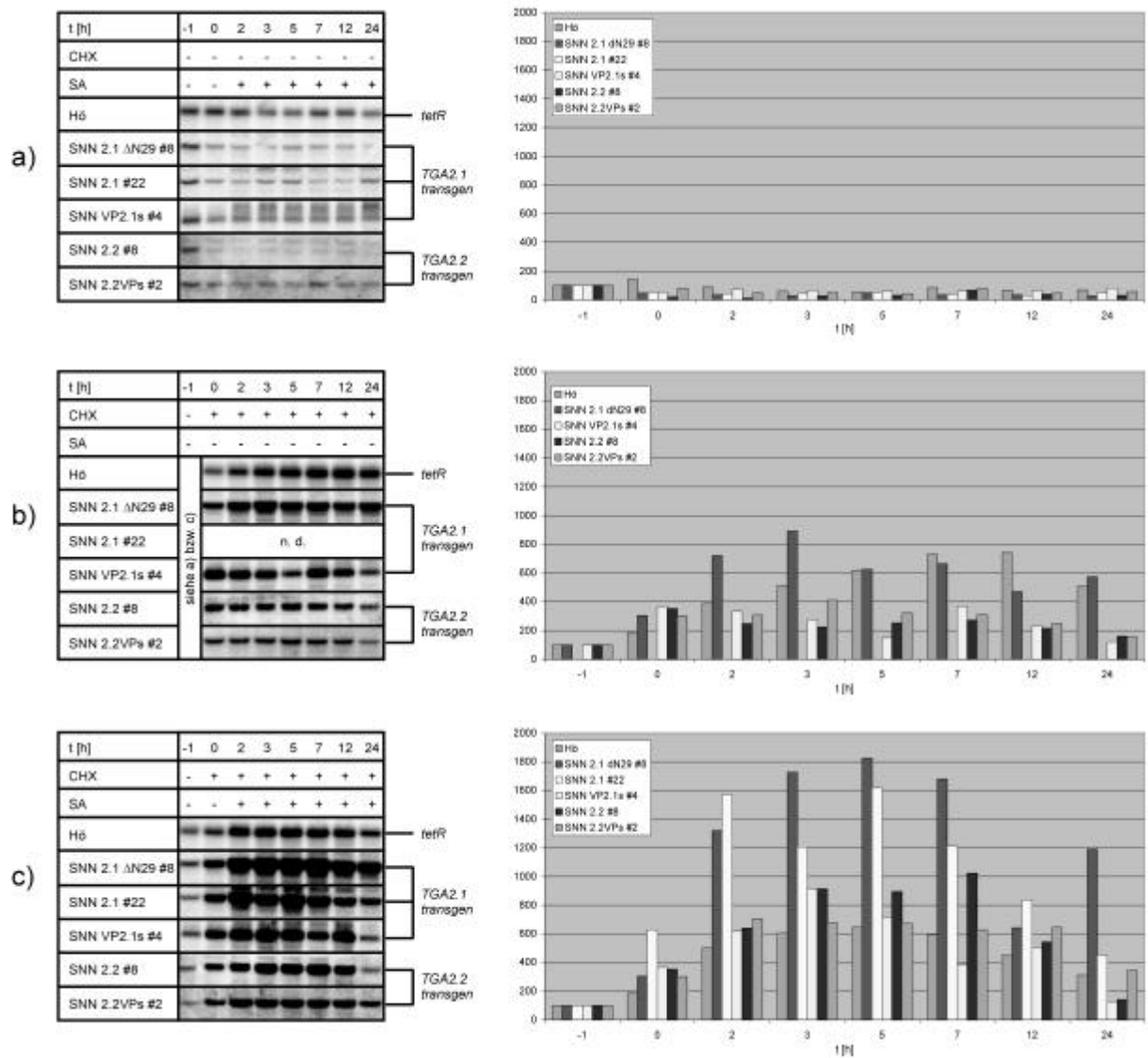


Abbildung 5-20: Einfluss von SA und CHX auf die Aktivität des 35S Promotors in transgenen Pflanzen. Filter für die Linien Hö *as-1-GUS* #1 (Hö), SNN 2.1 Δ N29 #8, SNN 2.1 #22, SNN VP2.1s #4, SNN 2.2 #8 und SNN 2.2VPs #2 wurden mit den entsprechenden Sonden gegen die Transgene *tetR*, *TGA2.1* bzw. *TGA2.2* hybridisiert und autoradiografisch ausgewertet. Alle weiteren Versuchsparameter wie in Abbildung 5-15 beschrieben. a) Induktion nur mit SA, b) Induktion nur mit CHX, c) Induktion mit SA nach Vorinkubation mit CHX.

5.5.8 Untersuchungen zur Expression der endogenen Transkriptmengen von *TGA2.1* bzw. *TGA2.2*

Zur Identifizierung möglicher autoregulatorischer Mechanismen der endogenen *TGA2.1*- bzw. *TGA2.2*-Transkription wurde in den transgenen Linien die Transkription beider Gene nach SA-Behandlung untersucht.

5.5.8.1 Untersuchung der endogenen Transkriptmengen von *TGA2.1*

Die unter 5.5 beschriebenen Filter der SA-Induktionsversuche wurden mit der Sonde gegen *TGA2.1* hybridisiert und autoradiografisch ausgewertet (Abbildung 5-21). Dabei konnten folgende Resultate festgehalten werden:

- In SNN wt kommt es nach SA-Behandlung zum kontinuierlichen Anstieg der *TGA2.1*-Transkriptmenge. Nach 24 h hat sich die Transkriptmenge etwa verfünffacht.
- Im Wildtyp ist kein *as-1*-typischer, transienter Verlauf der Transkription zu beobachten.
- Die Überexpression von TGA-Derivaten der Klasse II führt zur SA-induzierten und transienten Verstärkung der Transkription von endogenem *TGA2.1* nach drei Stunden. Die Verstärkung zeigt sich besonders deutlich in der Linie SNN VP2.1s #4. Hier sind die Transkriptmengen auch nach 2 und 24 h gegenüber dem Wildtyp erhöht.

In die Regulation des *TGA2.1*-Promotors ist demnach voraussichtlich ein *as-1*-ähnliches Element involviert, welches jedoch in der Wildtypsituation in diesem Promotorkontext nicht für eine frühe Aktivierung nach zwei und drei Stunden empfänglich ist. Durch Überexpression von TGA-Faktoren der Klasse II lässt sich dieses *cis*-Element aktivieren.

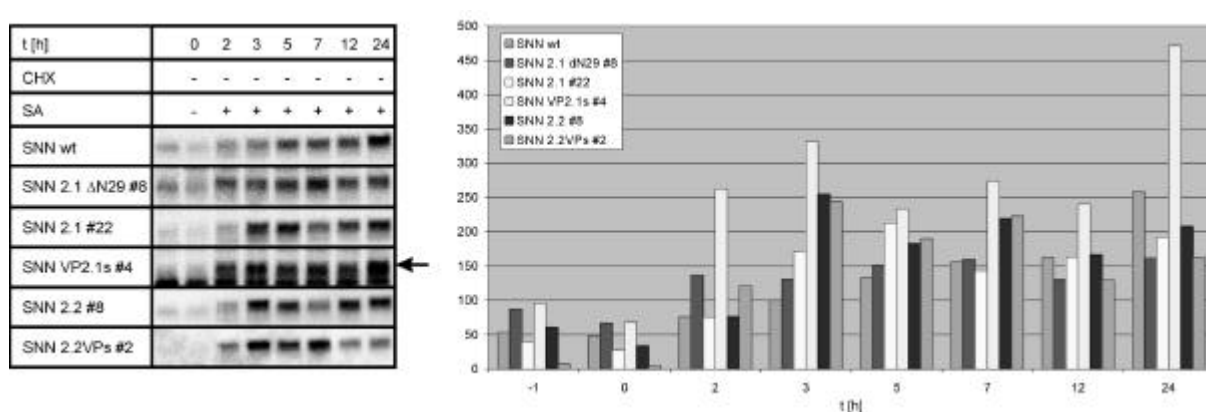


Abbildung 5-21: Untersuchung der endogenen *TGA2.1*-Transkription nach Behandlung mit SA. Gezeigt sind die Linien SNN *as-1-GUS* #12 (SNN wt), SNN 2.1 Δ N29 #8, SNN 2.1 #22, SNN VP2.1s #4 und SNN 2.2 #8. Die Hybridisierung erfolgte mit einer radioaktiv markierten Sonde gegen *TGA2.1*. Alle weiteren Parameter wie in Abbildung 5-15 beschrieben. Der Pfeil kennzeichnet das endogene *TGA2.1*-Transkript.

5.5.8.2 Untersuchung der endogenen Transkriptmengen von *TGA2.2*

Wie zuvor mit der Sonde gegen *TGA2.1* wurden die Filter mit einer radioaktiv markierten Sonde gegen *TGA2.2* hybridisiert und autoradiografisch ausgewertet (Abbildung 5-22). Da endogenes *TGA2.2*-Transkript und transgenes *2.2VPs*-Transkript im denaturierenden Agarosegel komigrieren, erfolgt für die Linie SNN 2.2VPs #2 keine Auswertung.

Bei Applikation von SA zeigt sich weder ein deutlicher Unterschied zwischen uninduziertem und induziertem Zustand, noch zwischen Wildtyp und transgenen Linien. In allen Linien ist durchschnittlich eine Verdoppelung der endogenen *TGA2.2*-Transkription zu verzeichnen. Ein direkter autoregulatorischer Mechanismus kann für *TGA2.2* auf Transkriptionsebene ausgeschlossen werden.

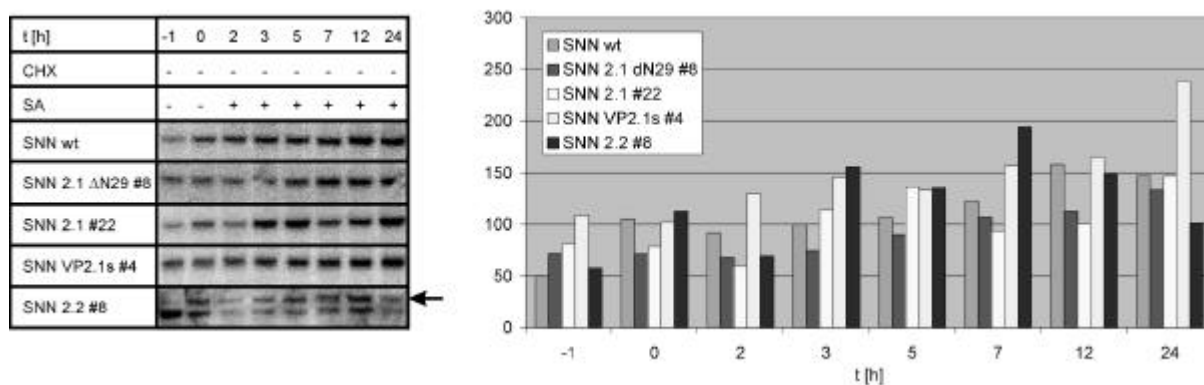


Abbildung 5-22: Untersuchung der endogenen *TGA2.2*-Transkription nach Behandlung mit SA. Gezeigt sind die Linien SNN *as-1-GUS* #12 (SNN wt), SNN 2.1 ΔN29 #8, SNN 2.1 #22, SNN VP2.1s #4 und SNN 2.2 #8. Die Hybridisierung erfolgte mit einer radioaktiv markierten Sonde gegen *TGA2.2*. Alle weiteren Parameter wie in Abbildung 5-15 beschrieben. Der Pfeil kennzeichnet das endogene *TGA2.2*-Transkript.

5.5.9 Phänotypische Beobachtungen an Pflanzen, die die Fusionsproteine VP2.1s bzw. 2.2VPs überexprimieren

Wie in Abschnitt 5.3.2 geschildert, zeigen Pflanzen der Linie SNN 2.1VPs #6 Störungen im Wachstum von Wurzeln und Blättern. Pflanzen vom Typ SNN VP2.1s und SNN 2.2VPs zeigen ebenfalls phänotypische Veränderungen. In Gewebekultur wachsen beide gedrungener gegenüber Wildtyppflanzen, woraus ein kürzerer Internodienabstand resultiert. Dieser Phänotyp manifestiert sich ebenso bei Kultivierung dieser Pflanzen in Erde. Um einen Zusammenhang dieses Phänotyps mit der gesteigerten Aktivität des *as-1*-Elements zu untersuchen, wurden Samen der geselbsteten Primärtransformanten SNN as-1-GUS #12, SNN VP2.1s #4 und SNN 2.2VPs #2 oberflächensterilisiert und auf geeigneten Selektionsmedien zur Germination gebracht. Jeweils 16 resistente Keimlinge jeder Linie wurden in Erde pikiert und unter gleichen Bedingungen kultiviert. Nach dreiwöchiger Kultivierung in Erde wurden die Pflanzen jeder Linie entsprechend ihres Erscheinungsbilds in zwei möglichst identische Gruppen von jeweils acht Pflanzen unterteilt. Eine Gruppe jeder Linie wurde in etwa zweiwöchigem Abstand mit 100 μ M Benzothiadiazol (BION®), einem funktionellen Analogon von SA, besprüht. Die andere Gruppe diente als unbehandelte Kontrolle. Nach vierwöchiger Behandlung mit BION® wurde die Größe der Pflanzen und der Internodienabstand für beide Gruppen bestimmt (Abbildung 5-23).

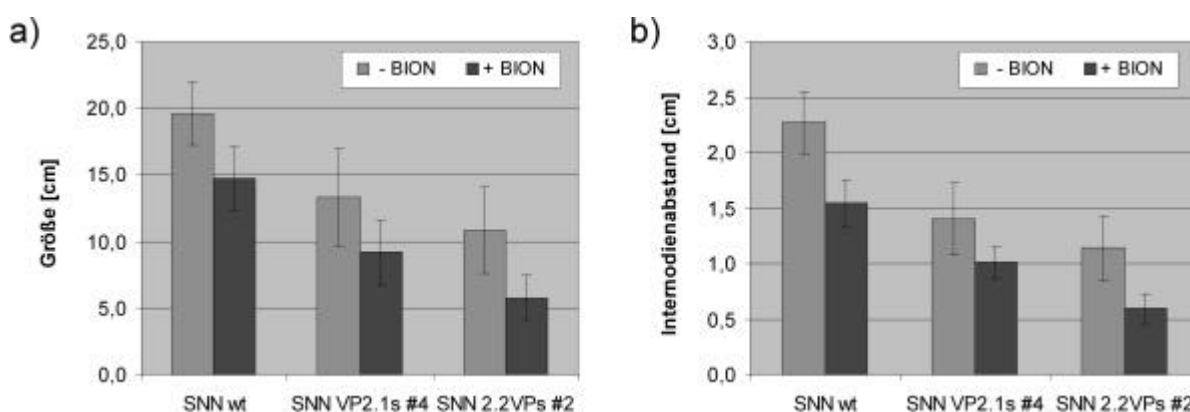


Abbildung 5-23: Phänotypische Veränderungen der transgenen Linien SNN VP2.1s #4 und SNN 2.2VPs #2 im Vergleich zu SNN as-1-GUS #12 (SNN wt). a) Größe [cm] und b) Internodienabstand [cm] wurden für unbehandelte und BION®-behandelte [100 μ M] Pflanzen der genannten transgenen Linien bestimmt. Fehlerbalken geben die Standardabweichung über jeweils acht Pflanzen an.

Während die Anzahl der Blätter pro Pflanze im Rahmen der Standardabweichung nicht verändert war, zeigte sich bei BION®-behandelten Pflanzen ein eindeutig reduziertes Längenwachstum im Vergleich zu unbehandelten Pflanzen der gleichen Linie (Abbildung

5-23a)). Auch zwischen den verschiedenen transgenen Linien zeigen sich Unterschiede bezüglich des Längenwachstums. Die transgenen Linien SNN VP2.1s #4 und SNN 2.2VPs #2 sind deutlich kleiner als der Wildtyp. Daraus resultiert ein deutlich reduzierter Internodienabstand (1.) innerhalb einer Linie nach BION®-Behandlung und (2.) der Linien SNN VP2.1s #4 und SNN 2.2VPs #2 im Vergleich zu SNN wt (Abbildung 5-23b)). Um Aussagen über die Empfindlichkeit der einzelnen Linien auf BION® machen zu können, wurde das Verhältnis der Internodienabstände zwischen uninduziertem und induziertem Zustand errechnet (Tabelle 5-2).

Dabei zeigte sich, dass bezogen auf eine induzierte Verkürzung des Internodienabstands nur die Linie SNN 2.2VPs #2 eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber BION® aufweist.

Tabelle 5-2: Verhältnis der Internodienabstände zwischen uninduziertem und BION®-induziertem Zustand transgener Tabakpflanzen.

SNN wt	SNN VP2.1s #4	SNN 2.2VPs #2
1,5	1,4	1,9

Es liegt die Vermutung nahe, dass es sich mindestens zum Teil um einen phänotypischen Effekt handelt, der durch *as-1*-gesteuerte Transkription hervorgerufen wird. Andererseits zeigen Pflanzen, die ein Fusionsprotein aus VP16-Aktivierungsdomäne und BZI-1, einem anderen bZIP-Transkriptionsfaktor überexprimieren, einen sehr ähnlichen Phänotyp (HEINEKAMP, unveröffentlicht). In diesen Studien wurden allerdings keine Induktionsversuche mit BION® durchgeführt. Dennoch könnte es sein, dass der Phänotyp zum Teil aus der Interaktion der VP16-Fusionsproteine mit einem weiteren Protein resultiert. Die direkte Interaktion von TGA2.1 bzw. TGA2.2 mit BZI-1 kann aufgrund von Hefe Two-Hybrid-Studien (STRATHMANN, 1999) ausgeschlossen werden.

5.6 Auswirkung von Fusionsproteinen aus ENG-Silencerdomäne und TGA2.1 bzw. TGA2.2 auf die Expression von *Nt103* nach Salicylsäure-Induktion

Blattscheiben der unter 5.2.2.2, 5.2.2.4 und 5.2.3.2 charakterisierten transgenen Linien SNN 2.1ENGs #2, SNN ENG2.1s #17 und SNN 2.2ENGs #3 wurden ebenso wie Blattscheiben von Wildtyppflanzen auf 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 5,8), 1 mM SA gelegt. Nach 0, 1, 3, 7, 12 und 24 h wurden Proben für die Gewinnung von Gesamt-RNA genommen. Jeweils 10 µg jeder Gesamt-RNA-Probe wurden im denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und auf Nytranmembranen geblottet. Die Filter wurden mit einer radioaktiv markierten Sonde gegen *Nt103* hybridisiert und anschließend autoradiografisch ausgewertet.

Die SA-induzierte *Nt103*-Transkription ist in allen transgenen Linien gegenüber der des Wildtyps verändert (Abbildung 5-24). Sie zeigen eine erhöhte *Nt103*-Transkription mit einem verzögerten Maximum nach sieben Stunden. Die Verstärkung fällt in den Linien SNN 2.1ENGs #2 und SNN ENG2.1s #17 deutlich geringer aus als in der Linie SNN 2.2ENGs #3. Da die Silencerdomäne in Fusion mit beiden TGA-Faktoren in Blättern offensichtlich keine reprimierende Funktion erfüllen kann, wurde auf weitere Versuche mit diesen Pflanzen verzichtet.

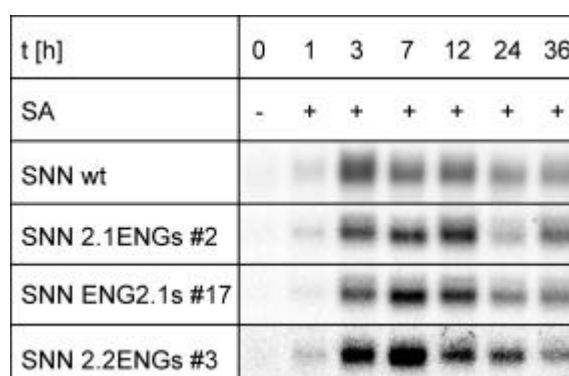


Abbildung 5-24: SA-induzierte *Nt103*-Expression in transgenen Pflanzen. Blattscheiben der Linien SNN wt, SNN 2.1ENGs #2, SNN ENG2.1s #17 und SNN 2.2ENGs #3 wurden mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 5,8), 1 mM SA behandelt, Gesamt-RNA nach der angegebenen Zeit isoliert, jeweils 10 µg im denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und auf Nytranmembranen geblottet. Die Filter wurden mit der radioaktiv markierten Sonde gegen *Nt103* hybridisiert und autoradiografisch ausgewertet.

5.7 Auswirkung des verkürzten Proteins 2.1-57s auf die Expression von *Nt103* nach Salicylsäure-Induktion

Blattscheiben der Linien SNN wt, SNN 2.1 #22 und SNN 2.1-57s #8 wurden mit 1 mM SA in 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 5,8) induziert. Proben wurden nach 0, 3, 7, 12 und 24 h entnommen, um Gesamt-RNA zu präparieren. 10 µg jeder Probe wurden im denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und auf Nytranmembranen geblottet. Die Filter wurden mit einer radioaktiv markierten Sonde gegen *Nt103* hybridisiert und autoradiografisch ausgewertet.

In beiden transgenen Linien zeigt sich eine gegenüber dem Wildtyp erhöhte Transkription von *Nt103* (Abbildung 5-25). Die Deletion des N-Terminus von TGA2.1 hat offensichtlich keine Auswirkung auf die Funktionalität des Proteins im Zusammenhang mit einer SA-Induktion.

t [h]	0	3	7	12	24
SA	-	+	+	+	+
SNN wt					
SNN 2.1 #22					
SNN 2.1-57s #8					

Abbildung 5-25: SA-induzierte *Nt103*-Expression in transgenen Pflanzen. Blattscheiben der Linien SNN wt, SNN 2.1 #22 und SNN 2.1-57s #8 wurden mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 5,8), 1 mM SA behandelt, Gesamt-RNA nach der angegebenen Zeit isoliert, jeweils 10 µg im denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und auf Nytranmembranen geblottet. Die Filter wurden mit der radioaktiv markierten Sonde gegen *Nt103* hybridisiert und autoradiografisch ausgewertet.

5.8 Untersuchung der Expression von Zielgenen in transgenen Suspensionskulturen von *N. tabacum*

5.8.1 Etablierung von Suspensionskulturen transgener Tabakpflanzen

Zu Beginn der im folgenden beschriebenen Versuche lagen bereits Daten aus Blättern von transgenen Pflanzen vor, die TGA2.1 Δ N29 bzw. TGA2.1trD überexprimieren (KEGLER, unveröffentlicht), wonach TGA2.1 Δ N29 die SA-induzierte Zielgenexpression positiv und TGA2.1trD diese negativ beeinflusst. Um eine pharmakologische Untersuchung der Signaltransduktionskette mit Inhibitoren durchführen zu können, wurden aus Blättern und Stängeln der Linien SNN wt, SNN 2.1 Δ N29 #8 und SNN 2.1trD #2 Suspensionskulturen angelegt. Die Verwendung der transgenen Linien sollte Auskunft darüber geben, ob in Suspensionskulturen nach SA-Induktion die gleichen Faktoren eine Rolle spielen wie in Blättern. Die Linie SNN 2.1trD #2 exprimiert eine transdominant negative Variante von TGA2.1, die unverändert mit anderen TGA-Faktoren dimerisieren kann, jedoch aufgrund zweier gezielter Aminosäureaustausche in der DNA-Bindedomäne nicht mehr in der Lage ist, an DNA zu binden (KEGLER, unveröffentlicht).

Die Suspensionszellen wurden standardmäßig auf Linsmaier & Skoog – Medium mit 3 % Saccharose und 1 μ M 2,4-D im zweiwöchigen Rhythmus 1 : 6 subkultiviert. Nach mindestens dreimonatiger Subkultivierung wurden Induktionsversuche durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die entsprechenden Kulturen drei Tage vor Induktion in 3 x 1 Volumen 2,4-D-freiem Medium gewaschen und bis zur Induktion ohne 2,4-D weiterkultiviert.

5.8.2 Induktionsversuche mit Salicylsäure

Suspensionskulturen der Linien SNN wt, SNN 2.1 Δ N29 #8 und SNN 2.1trD #2 wurden wie oben beschrieben gewaschen, mit 100 μ M SA versetzt und bis zur jeweiligen Probenentnahme weitergeschüttelt. Nach 0, 1, 3, 7, 12 und 24 h wurden Proben entnommen, die Gesamt-RNA isoliert, im denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und auf Nytranmembranen geblottet.

5.8.2.1 Expressionsverlauf von *Nt103* nach Salicylsäure-Induktion

Die unter 5.8.2 entstandenen Filter wurden mit einer radioaktiv markierten Sonde gegen *Nt103* hybridisiert und autoradiografisch ausgewertet.

Die SA-induzierte Genexpression von *Nt103* ist in beiden transgenen Linien für den Zeitraum zwischen 1 und 12 h gleichermaßen herabgesetzt. Zum Zeitpunkt der maximalen *Nt103*-

Transkription im Wildtyp (nach 3 h) erreicht die Transkription in den transgenen Linien durchschnittlich 31 % des Wildtyps. Die Ergebnisse in Zellsuspensionen stehen somit in deutlichem Gegensatz zum Einfluß von TGA2.1 Δ N29 auf die *Nt103*-Transkription in Blättern (vgl. Abbildung 5-11 und Abbildung 5-17).

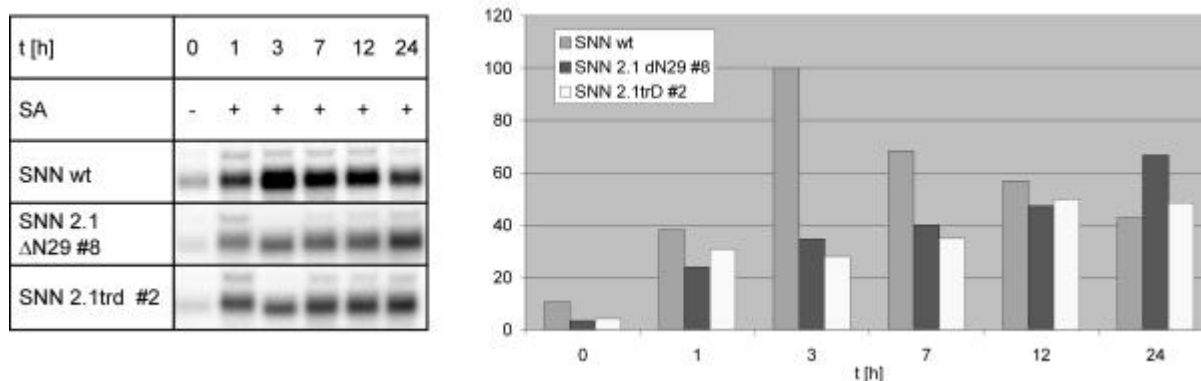


Abbildung 5-26: SA-induzierte Expression von *Nt103* in Tabaksuspensionskulturen. Suspensionskulturen der Linien SNN wt, SNN 2.1 Δ N29 #8 und SNN 2.1trD #2 wurden mit 100 μ M SA induziert und nach den angegebenen Zeiten die Gesamt-RNA isoliert. Pro Spur wurden 10 μ g Gesamt-RNA im denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und auf Nytranmembran gebロットet. Die Filter wurden mit einer radioaktiv markierten Sonde gegen *Nt103* hybridisiert und anschließend autoradiografisch ausgewertet. Die Quantifizierung erfolgte mittels nicht gezeigter Normalisierungssignale. Werte beziehen sich auf die Transkriptionsrate des Wildtyps nach drei Stunden.

5.8.2.2 Expressionsverlauf von *parA* nach Salicylsäure-Induktion

Die unter 5.8.2 entstandenen Filter wurden mit einer radioaktiv markierten Sonde gegen *parA* hybridisiert und autoradiografisch ausgewertet.

In beiden transgenen Linien ist die SA-induzierte Transkription von *parA* gegenüber dem Wildtyp massiv unterdrückt. Sie erreicht zum Zeitpunkt 3 h durchschnittlich 5 % des Wildtyps.

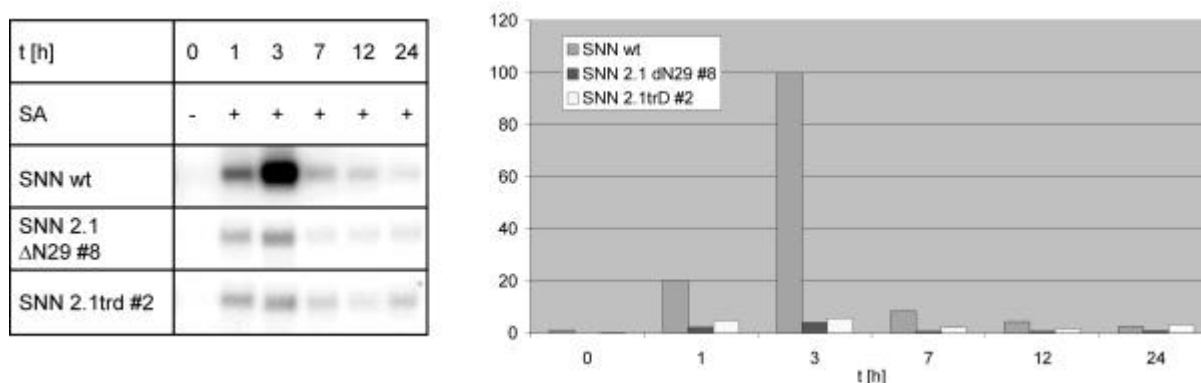


Abbildung 5-27: SA-induzierte Expression von *parA* in Tabaksuspensionskulturen. Die Hybridisierung der Filter erfolgte mit einer radioaktiv markierten Sonde gegen *parA*. Alle weiteren Parameter wie in Abbildung 5-26 beschrieben.

5.8.3 Induktionsversuche mit Auxin

In Blättern konnte Auxin-Induktion kein Einfluß von TGA2.1 Δ N29 oder TGA2.1trD auf die *as-1*-vermittelte Genexpression festgestellt werden (KEGLER, unveröffentlicht). Um auch in Zellkulturen den Einfluß der TGA-Faktoren auf diese Antwort zu untersuchen, wurden Suspensionskulturen der Linien SNN wt, SNN 2.1 Δ N29 #8 und SNN 2.1trD #2 analog der unter 5.8.2 beschriebenen Vorgehensweise mit 50 μ M 2,4 D behandelt.

5.8.3.1 Expressionsverlauf von *Nt103* nach Auxin-Induktion

Die unter 5.8.3 entstandenen Filter wurden mit einer radioaktiv markierten Sonde gegen *Nt103* hybridisiert und autoradiografisch ausgewertet (Abbildung 5-28).

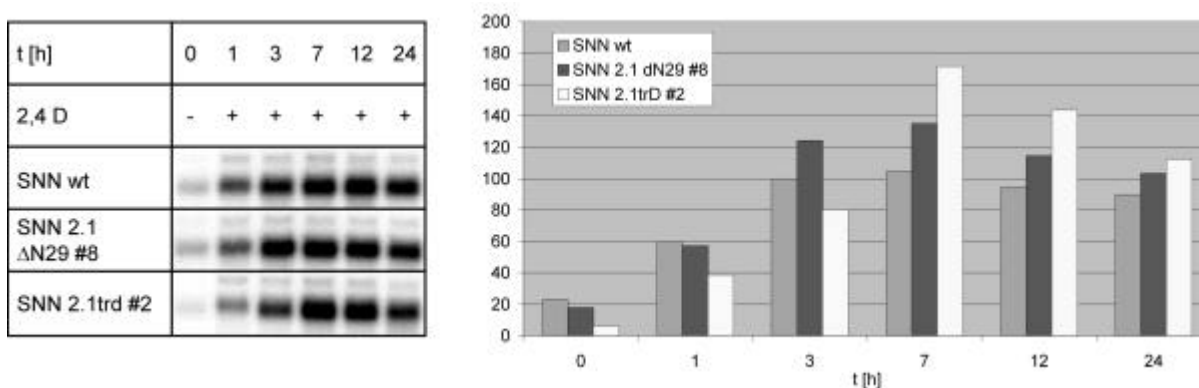


Abbildung 5-28: 2,4 D-induzierte Expression von *Nt103* in Tabaksuspensionskulturen. Die Induktion erfolgte mit 50 μ M 2,4 D. Die Hybridisierung der Filter erfolgte mit einer radioaktiv markierten Sonde gegen *Nt103*. Alle weiteren Parameter wie in Abbildung 5-26 beschrieben.

Nach Induktion mit 2,4 D zeigt sich bezüglich der *Nt103*-Transkription in den untersuchten Linien kein Unterschied. Wie in Blättern führt auch in Suspensionszellen die Überexpression von TGA2.1 Δ N29 nicht zur positiven und die Überexpression von TGA2.1trD nicht zur negativen Beeinflussung der 2,4-D-induzierten *Nt103*-Transkription. TGA2.1 ist nach diesen Ergebnissen eindeutig nicht an der Regulation der 2,4-D-induzierten *Nt103*-Transkription in Suspensionen beteiligt.

5.8.3.2 Expressionsverlauf von *parA* nach Auxin-Induktion

Die unter 5.8.3 entstandenen Filter wurden mit einer radioaktiv markierten Sonde gegen *parA* hybridisiert und autoradiografisch ausgewertet.

Beide transgenen Linien zeigen im frühen 2,4 D-induzierten Transkriptionsverlauf (bis 3 h) eine Reduktion der *parA*-Transkription um etwa 50 %. Während sich die Transkription in der Linie SNN 2.1trD #2 ab dem Zeitpunkt 7 h wie der Wildtyp verhält, verläuft sie in der Linie

SNN 2.1 Δ N29 #8 bis zum Ende des Versuchs mit gleichbleibend 20 – 30 % der Wildtyp-Transkription nach drei Stunden deutlich reduziert. Auf diesen Promotor scheint sich die Veränderung der TGA-Konstellation auszuwirken. Dieses Phänomen wurde aber nicht weiter untersucht.

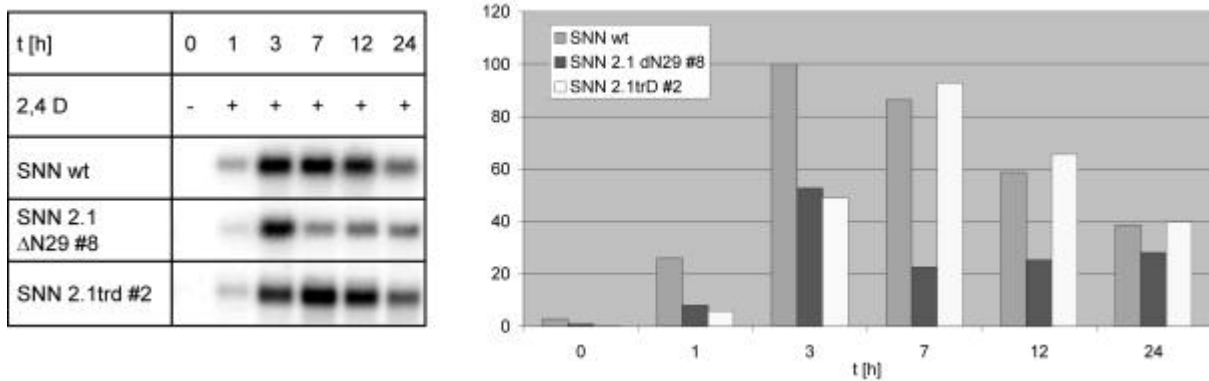


Abbildung 5-29: 2,4 D-induzierte Expression von *parA* in Tabaksuspensionskulturen. Die Induktion erfolgte mit 50 μ M 2,4 D. Die Hybridisierung der Filter erfolgte mit einer radioaktiv markierten Sonde gegen *parA*. Alle weiteren Parameter wie in Abbildung 5-26 beschrieben.

5.8.4 Analyse der *in-vitro* Bindung von SARP aus Suspensionskulturen

5.8.4.1 *In-vitro*-Bindungsaktivität an *as-1*-ähnliche Elemente in nativen Gesamtzellextrakten

Um die Ursachen der Wirkung von TGA2.1 Δ N29 auf die *as-1*-vermittelte Genexpression näher zu untersuchen, wurden *in-vitro*-Bindungsstudien mit nativen Gesamtzellextrakten (JUPIN und CHUA, 1996) aus Suspensionskulturen der Linien SNN wt und SNN 2.1 Δ N29 #8 durchgeführt.

Zellen beider Linien wurden drei Tage vor Induktion in hormonfreiem Medium gewaschen und bis zur Induktion mit SA unter Schütteln in hormonfreiem Medium weiterkultiviert. Die Induktion erfolgte für eine Stunde durch Zugabe von 100 μ M SA bzw. DMSO. Nach Abnutschen des Mediums wurden in Gegenwart des Phosphatase-Inhibitors NaF [10 mM] aus den Zellen native Gesamtzellextrakte (nach JUPIN und CHUA, 1996) gewonnen und diese im EMSA auf ihre Bindeaktivität an *as-1*, *pas-a* und *as-103* untersucht (Abbildung 5-30).

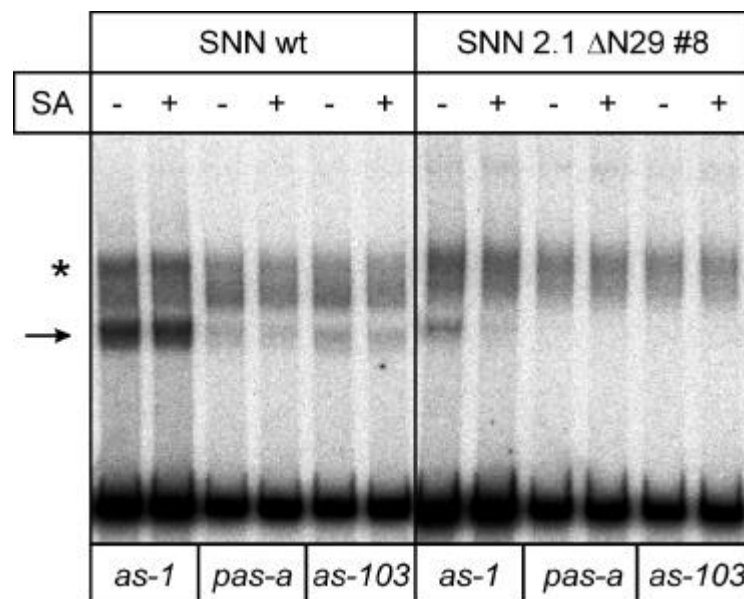


Abbildung 5-30: Untersuchung der Bindeaktivität an verschiedene *as-1*-ähnliche Elemente. Aus DMSO- (SA -) bzw. SA-behandelten (SA +) Suspensionskulturen der Linien SNN wt und SNN 2.1 Δ N29 #8 wurden Gesamtzellextrakte gewonnen und im EMSA jeweils 10 μ g Protein auf ihr Bindeverhalten an die *cis*-Elemente *as-1*, *pas-a* und *as-103* untersucht. Der Pfeil kennzeichnet die spezifische Bindung an eine Halbseite des jeweiligen *cis*-Elements, der Stern eine unspezifische Bindungsaktivität, die die Bande der Zweifachbesetzung überlagert.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Nach SA-Behandlung lässt sich im Wildtyp keine Veränderung der Bindung an die jeweiligen DNA-Fragmente erkennen.
- In SNN 2.1 ΔN29 #8 wurde nach SA-Induktion ein Bindungsverlust an *as-1* beobachtet.
- In SNN 2.1 ΔN29 #8 ist die Bindeaktivität an eine Halbseite des *as-1*-Elements (Pfeil) deutlich gegenüber dem Wildtyp reduziert.
- Die Bindung an die weniger stark konservierten Motive *pas-a* und *as-103* ist jeweils gegenüber der Bindung an das *as-1*-Element verringert. Bei der oberen, diffusen Bande ist diese Reduktion nur sehr gering ausgeprägt, was für die unspezifische Bindung eines weiteren Proteins an das verwendete Fragment spricht.

Aus diesen Ergebnissen resultiert die Frage nach der Zusammensetzung der gebundenen Komplexe. Einerseits wurde durch Konkurrenzexperimente mit einem Überschuss an nicht markierten Oligonucleotiden, die nur die 20 bp lange *as-1*-Sequenz beinhalten, gezeigt, dass es sich bei der diffusen Bande nicht um eine *as-1*-spezifische Bindeaktivität handelt (Daten nicht gezeigt). Andererseits wurde durch Supershift-Analysen die Zusammensetzung des *as-1*-bindenden Komplexes untersucht.

Mit DMSO behandelte Extrakte beider Linien wurden im EMSA mit Antiseren gegen TGA2.1, TGA2.2 und TGA1a versetzt (Abbildung 5-31a)). Der Anteil des jeweils erkannten Proteins am Komplex errechnet sich wie folgt: (Prozent ASF-1 [Pfeil] vom Gesamtshift ohne Antiserum) – (Prozent ASF-1 [Pfeil] vom Gesamtshift mit Antiserum). Der Anteil von TGA2.1 und TGA2.2 an ASF-1 in Zellsuspensionen ist unter Berücksichtigung der reduzierten Gesamtbindeaktivität in der transgenen Linie SNN 2.1 ΔN29 #8 in Abbildung 5-31b) grafisch dargestellt:

- Die Gesamtbindeaktivität in der transgenen Linie SNN 2.1 ΔN29 #8 ist im Vergleich zum Wildtyp auf etwa 58 % herabgesetzt.
- Im Wildtyp besteht ASF-1 zu etwa 54 % aus TGA2.2, während TGA2.1 nur etwa 14 % des bindenden Komplexes ausmacht.
- In der transgenen Linie SNN 2.1 ΔN29 #8 ist TGA2.2 nur noch zu etwa 27 % in ASF-1 anzutreffen. Die Menge an bindungsfähigem TGA2.1 hingegen bleibt unverändert.
- In beiden Linien ist TGA1a nicht Bestandteil von ASF-1. Die leichte Retardation bei Anwesenheit des TGA1a-Antiserums ist auch mit dem Präimmunserum nachzuweisen (NIGGEWEG, unveröffentlicht).

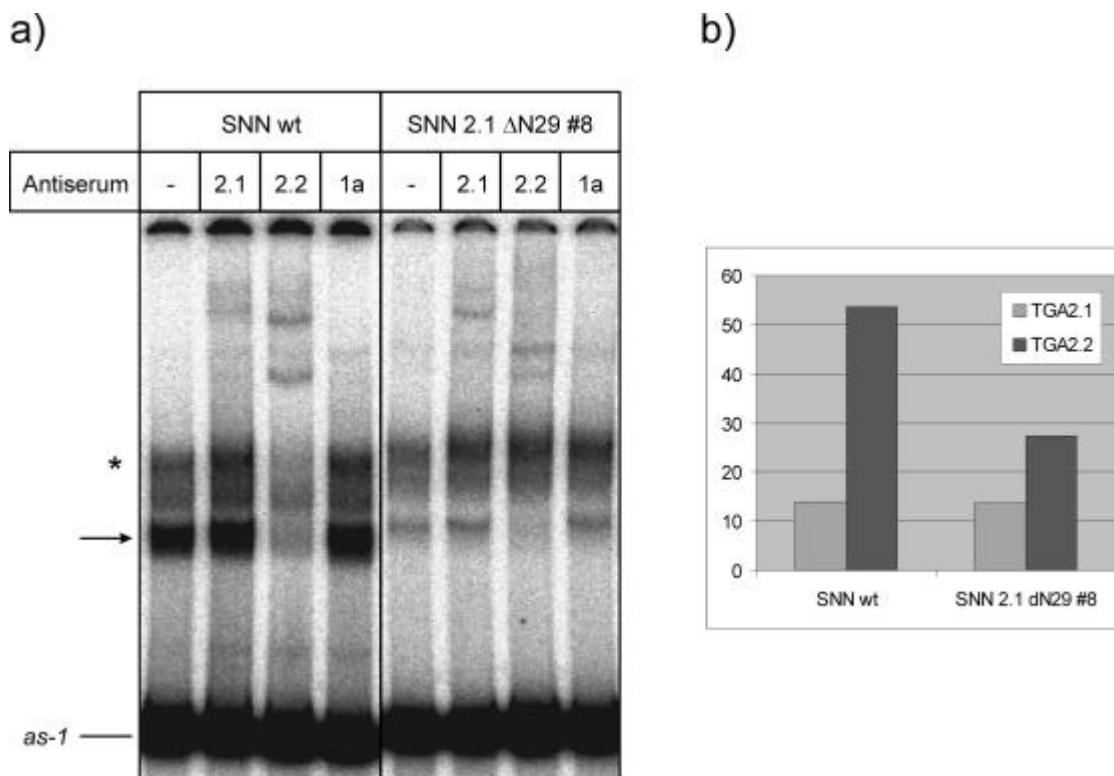


Abbildung 5-31: a) Supershift-Analyse der Zusammensetzung von SARP in Suspensionskulturen von SNN wt und SNN 2.1 Δ N29 #8. Jeweils 10 μ g nativer Gesamtzellextrakte beider Linien wurden im EMSA mit Antiseren gegen TGA2.1, TGA2.2 und TGA1a versetzt. b) Quantifizierung der Beteiligung von TGA2.1 und TGA2.2 am Gesamtschift. Angaben in Prozent des insgesamt retardierten Fragments.

5.8.4.2 Nachweis der Proteine TGA2.1 und TGA2.2 in Gesamtzellextrakten (nach JUPIN und CHUA, 1996) von SNN 2.1 Δ N29 #8-Suspensionskulturen

In Abbildung 5-31 konnte keine erhöhte Menge an TGA2.1 im DNA-Bindekomplex nachgewiesen werden. Bezogen auf die Gesamtbindeaktivität war die Menge an TGA2.2, die im Komplex nachgewiesen werden konnte, zudem deutlich vermindert. Es sollte deshalb gezeigt werden, wie stark die Suspensionslinie SNN 2.1 Δ N29 #8 die Proteine TGA2.1 und TGA2.2 exprimiert. Zu diesem Zweck wurden Immunoblot-Analysen durchgeführt. Es wurden jeweils 84 μ g Protein der mit DMSO behandelten nativen Gesamtzellextrakte von SNN wt und SNN 2.1 Δ N29 #8 einer Fällung (nach WESSEL und FLÜGGE, 1984) unterzogen und anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Blotten der Proteine auf zwei PVDF-Membranen wurden die Proteine TGA2.1 bzw. TGA2.2 mit Hilfe der entsprechenden affinitätsgereinigten Antiseren im Immunoblot mittels Chemilumineszenz detektiert (Abbildung 5-32).

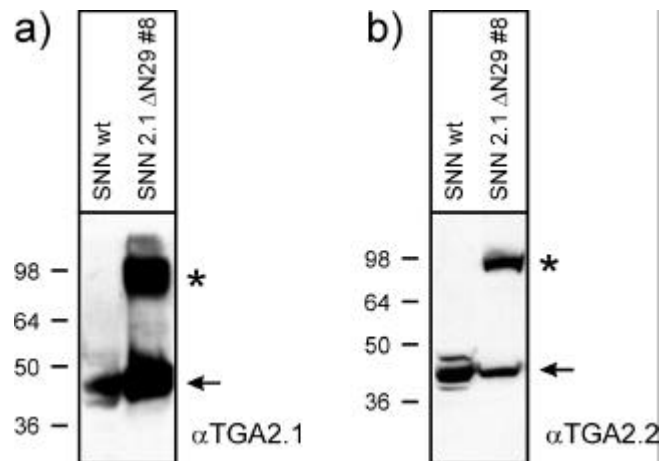


Abbildung 5-32: Immunoblot-Analysen zum Nachweis von TGA2.1 und TGA2.2 in Suspensionskulturen. Jeweils 84 μ g nativen Gesamtzellextrakt wurden nach vorheriger Fällung mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen geblottet. Die immunologische Detektion erfolgte mit Hilfe affinitätsgereinigter Antiseren gegen a) TGA2.1 bzw. b) TGA2.2, der Pfeil kennzeichnet die Laufhöhe von TGA2.2, mit * ist ein immunologisch verwandtes Protein gekennzeichnet, das von beiden Antiseren auf gleicher Laufhöhe erkannt wird. Der Marker gibt die ungefähren Molekulargewichte in kDa an.

In SNN 2.1 Δ N29 #8 lässt sich deutlich mehr TGA2.1 nachweisen als in SNN wt (Abbildung 5-32a)). TGA2.1 tritt jedoch nahezu vollständig in einer gekürzten Form (TGA2.1k) auf, die im Gel ein Molekulargewicht von etwa 45 kDa aufweist. Das Problem der proteolytischen Abspaltung des N-Terminus von TGA-Faktoren ist aus Tabak (KEGLER, unveröffentlicht) und aus *A. thaliana* (ZHOU *et al.*, 2000) bekannt. Die TGA2.2-Menge (Abbildung 5-32b)) ist in der Linie SNN 2.1 Δ N29 #8 insgesamt nicht reduziert.

Von beiden Antiseren wird ein Protein erkannt, das ein Molekulargewicht von etwas weniger als 98 kDa besitzt. Bei diesem Protein könnte es sich um ein kovalent verknüpftes Heterodimer zwischen TGA2.1 (50,1 kDa) und TGA2.2 (36,3 kDa) mit einer Gesamtgröße von etwa 86 kDa handeln, welches durch SDS und β -Mercaptoethanol nicht mehr zu denaturieren ist. In beiden Proteinen findet sich im C-terminalen Bereich, welcher zumindest in TGA1a für die Dimerstabilisierung verantwortlich gemacht wird (KATAGIRI *et al.*, 1992), ein einzelner Cysteinrest, über den die kovalente Verknüpfung in Form einer Disulfid-Brücke erfolgen könnte. Dieses Phänomen wurde in mehreren unabhängigen, nach der gleichen Methode hergestellten Gesamtzellextrakten beobachtet. Da es in denaturierenden Gesamtzellextrakten nicht auftrat, konnte angenommen werden, dass es sich um ein Artefakt der Proteinextraktion handelt. Diese kovalente Verknüpfung könnte der Grund für die verringerte Bindung von TGA2.2 im EMSA sein. Aus diesem Grund wurden im Folgenden native Gesamtzellextrakte nach einem anderen Protokoll (FixProt, s. 4.5.1.5) hergestellt.

5.8.4.3 Einführung eines neuen Protokolls zur Gewinnung von nativen Gesamtzellextrakten (nach KEGLER, unveröffentlicht)

Aus für zwei Stunden DMSO bzw. SA-behandelten Suspensionszellen der Linie SNN wt wurden native Gesamtzellextrakte gewonnen. Um einer möglichen Dephosphorylierung der TGA-Faktoren entgegenzuwirken, die u.U. das Bindungsverhalten an *as-1* verändern könnte, wurden die FixProt-Extrakte in Anwesenheit bzw. Abwesenheit des Phosphatase-Inhibitors NaF hergestellt. In diesen Extrakten wurde mittels Immunoblot die Menge und das Laufverhalten von TGA2.1 im Vergleich zu denaturierenden Gesamtzellextrakten untersucht (Abbildung 5-33).

Im Vergleich von denaturierenden und nativen (FixProt) Extrakten zeigt sich, dass in den neuen nativen Extrakten nur ein sehr geringes Maß an Degradation von TGA2.1 nachweisbar ist. Für die Darstellung der Bindung von TGA2.1 an *as-1* im EMSA sind diese Extrakte demnach geeignet. Im Immunoblot lässt sich zudem weder durch SA-Behandlung noch durch NaF (Daten nicht gezeigt) eine Beeinflussung von TGA2.1 beobachten.

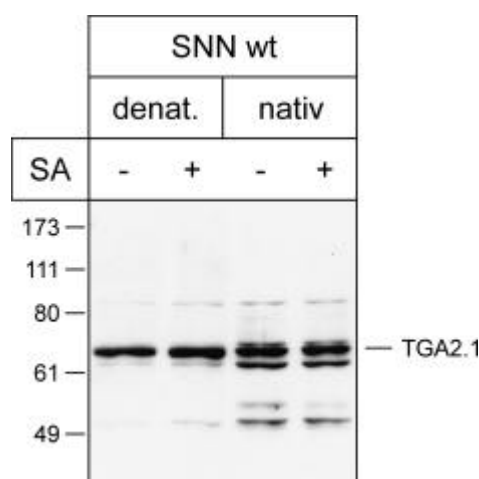


Abbildung 5-33: Immunoblot-Analyse von Gesamtzellextrakten aus Suspensionskultur von SNN wt zum Vergleich von denaturierenden und nativen Extrakten. Die hier dargestellten nativen Extrakte wurden in Gegenwart von NaF hergestellt. Vergleichbare Mengen Protein aus 2h DMSO- bzw. SA-behandelten Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membran geblottet. Die Detektion erfolgte mit dem affinitätsgereinigten Antiserum gegen TGA2.1. Das ungefähre Molekulargewicht ist in kDa angegeben.

5.8.4.4 Einfluss von Natriumfluorid auf das Bindeverhalten an *as-1* in Suspensionskulturen

Weiterhin wurde das *as-1*-spezifische Bindungsverhalten der Proteine in den nativen Extrakten von DMSO- bzw. SA-behandelten SNN wt-Zellsuspensionen (- / + NaF) im EMSA untersucht.

Proteinextrakte, die ohne NaF aus Wildtypsuspensionen gewonnen wurden, zeigen im EMSA eine stark reduzierte Bindeaktivität an *as-1* ohne und mit SA (Abbildung 5-34). Im Gegensatz dazu zeigen Extrakte, die in Gegenwart von 50 mM NaF hergestellt wurden, eine deutliche Bindeaffinität zu *as-1*. Es fällt auf, dass nach Behandlung nur mit DMSO die Doppelbesetzung (Pfeil 5 und 6) bevorzugt wird, während nach SA-Behandlung die Bindung so stark reduziert ist, dass nur noch eine Halbseite des *as-1*-Elements besetzt wird. Offenbar kommt es in Suspensionskulturen nach SA-Applikation zur reduzierten Bindung von TGA2.2 an das *as-1*-Element.

In SNN 2.1 Δ N29 #8 zeigt sich eine deutlich veränderte Situation. Bereits in Extrakten ohne NaF konnte sowohl im uninduzierten als auch im SA-induzierten Zustand eine starke Bindung an *as-1* festgestellt werden. Die Bindungsaktivität lässt sich durch die Anwesenheit von NaF nicht weiter steigern. Aufgrund von vorherigen Studien (KEGLER, unveröffentlicht; NIGGEWEG *et al.*, 2000b) kann unter Beachtung der Laufweite auf die Zusammensetzung der einzelnen Banden geschlossen werden (s. Abbildung 5-34 rechts). In hier nicht gezeigten Supershift-Analysen konnte diese Zuordnung für Zellsuspensionen erneut bestätigt werden. Während TGA2.2 in der Lage ist, effektiv als Homodimer die Einfach- und die Doppelbesetzung am *as-1*-Element einzunehmen (Banden 1 und 5), zeigt TGA2.1 eine effektive Bindungsbereitschaft an beide Besetzungen nur als Heterodimer mit TGA2.2 (Banden 3 und 6) oder dem gekürzten TGA2.1k (Bande 4). Auch das Heterodimer aus TGA2.2 und TGA2.1k (Bande 2) ist zu detektieren. Durch die starke Überexpression von TGA2.1 Δ N29 liegt in SNN 2.1 Δ N29 #8 ein größerer Anteil von TGA2.2 in Form von Heterodimeren mit TGA2.1 vor.

Wie oben erwähnt, muss es nach SA-Behandlung zur Ablösung von TGA2.2 vom *as-1*-Element kommen. Da dieser Mechanismus in SNN 2.1 Δ N29 #8 dereguliert erscheint, kommt es zum Verbleiben der TGA-Faktoren am *cis*-Element. Möglicherweise ist dies der Grund für die reduzierte Genexpression nach SA-Behandlung (Abbildung 5-26 und Abbildung 5-27).

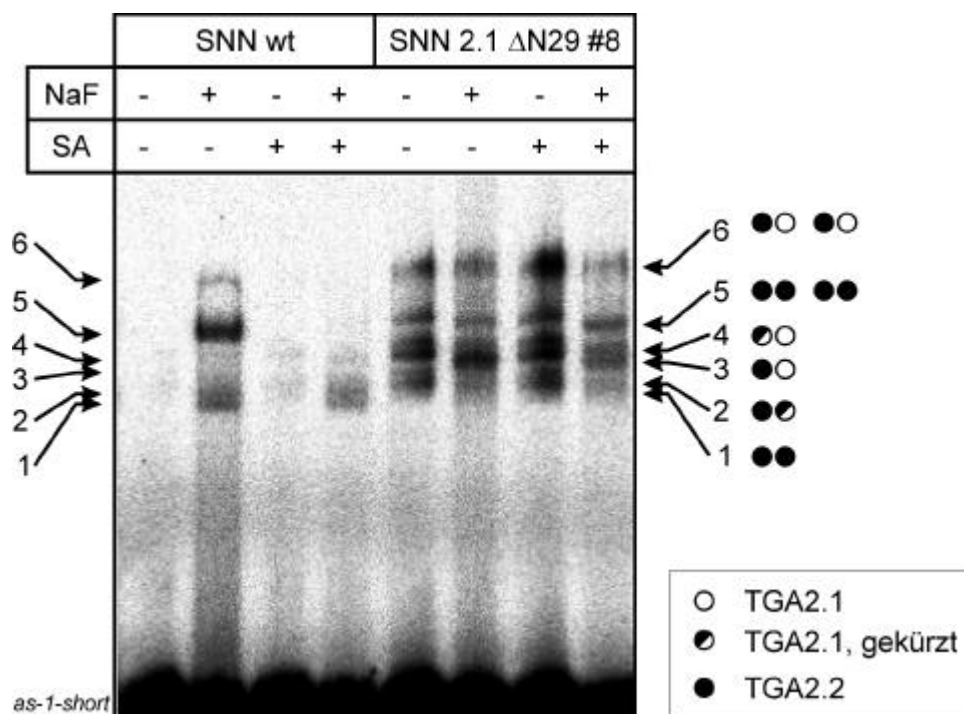


Abbildung 5-34: Veränderung der *as-1*-Bindeaktivität in nativen Extrakten von SNN wt Suspensionszellen nach SA-Behandlung und der Einfluss von NaF im EMSA. Pro Spur wurden 6,8 μ g Protein aus nativen Extrakten von 2h DMSO- bzw. SA-behandelten SNN wt-Zellen (Extraktion - / + 50 mM NaF) in Gegenwart von 20 mM NaF aufgetragen. Pfeile kennzeichnen den *as-1-short*-gebundenen Proteinkomplex.

5.8.4.5 Einfluss von Quercetin auf das Bindevverhalten an *as-1* in Suspensionskulturen

Die folgenden Untersuchungen erfolgten ausschließlich an Wildtyp-Suspensionskulturen. Da der Phosphorylierungszustand der Proteine im Zellextrakt offensichtlich die Bindung an *as-1* beeinflussen kann, wurde neben der Wirkung des Phosphatase-Inhibitors NaF auch die Wirkung des Kinase-Inhibitors Quercetin auf die *as-1*-Bindeaktivität untersucht. Zu diesem Zweck wurden Zellkulturen der Linie SNN wt für 2h mit DMSO bzw. 100 μ M SA inkubiert. Dies geschah sowohl in Abwesenheit als auch in Gegenwart von 100 μ M Quercetin. Aus den so behandelten Zellen wurden in modifizierter Weise native Gesamtzellextrakte gewonnen. Abbildung 5-35 zeigt schematisch die Herstellung verschiedener nativer Extrakte unter Verwendung von Quercetin bzw. NaF.

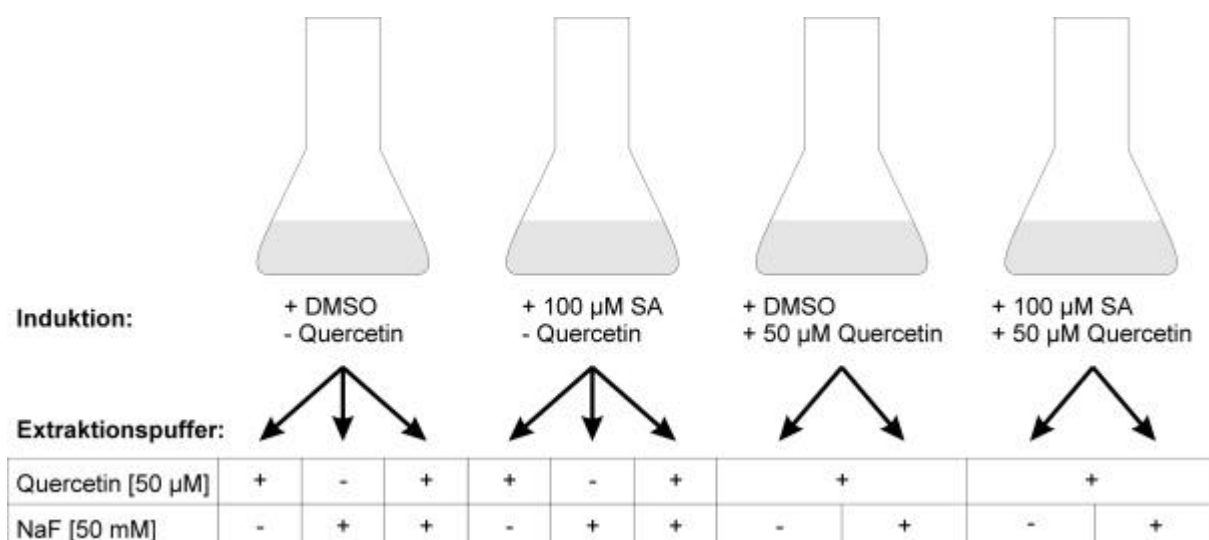


Abbildung 5-35: Schematische Darstellung der Induktionsversuche mit SA und Herstellung nativer Gesamtzellextrakte unter Verwendung der Hemmstoffe Quercetin und NaF.

Die Extrakte wurden verwendet, um das Bindeverhalten an *as-1* unter den verschiedenen Bedingungen im EMSA zu untersuchen. Pro Spur wurden 5 µg Protein unter Zusatz der jeweiligen Hemmstoffe im Bindeansatz mit radioaktiv markiertem *as-1*-Fragment inkubiert, im nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt und autoradiografisch detektiert (Abbildung 5-36).

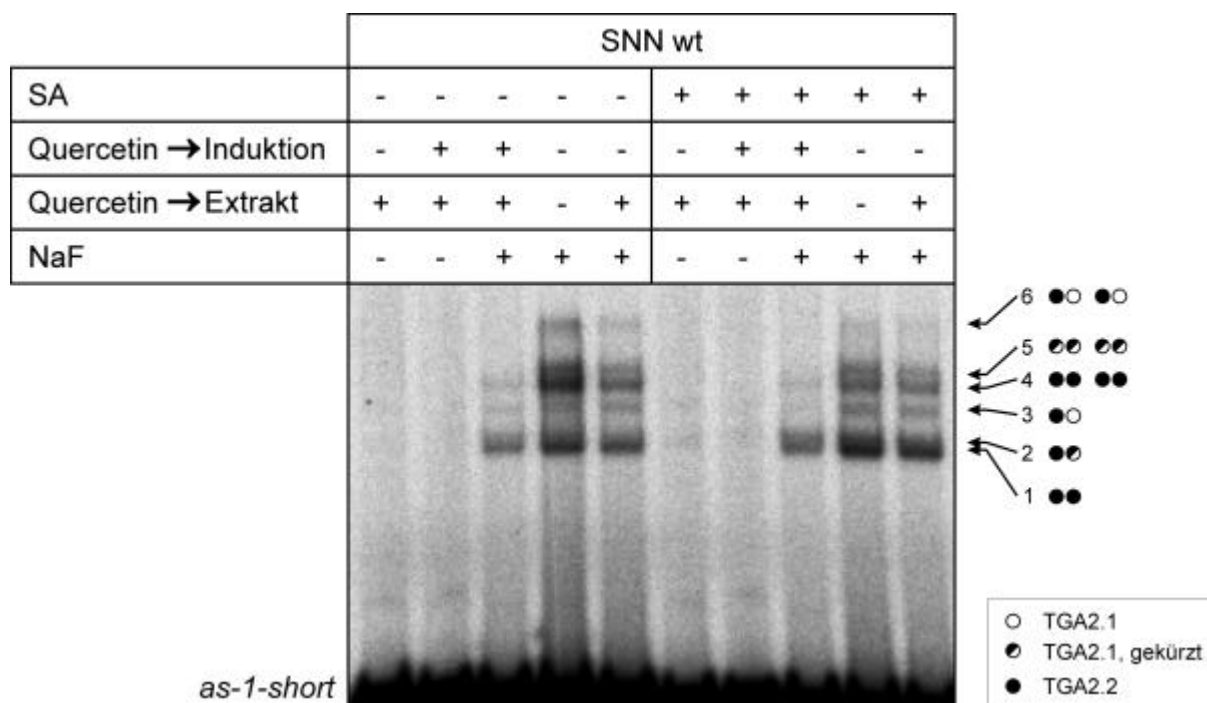


Abbildung 5-36: Einfluss von Quercetin und NaF auf die Bindung an *as-1* in Suspensionskulturen. Native Extrakte (5 µg) von für zwei Stunden DMSO- bzw. SA-behandelten SNN wt Suspensionen wurden in Gegenwart der angegebenen Inhibitoren (12,5 mM NaF bzw. 12,5 µM Quercetin) mit radioaktiv markiertem *as-1-short*-Fragment inkubiert, im nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt und autoradiografisch ausgewertet. Pfeile bezeichnen die Besetzung des *as-1*-Elements mit den verschiedenen Homo- bzw. Heterodimeren.

Nur in Gegenwart von NaF kommt es zu einer nachweisbaren Bindung an das *as-1*-Element. Die Bindung wird durch Anwesenheit von Quercetin bei der Extraktion leicht gehemmt. Bei zusätzlicher Anwesenheit von Quercetin im Suspensionsmedium wird die Hemmung weiter gesteigert. Diese Aussagen gelten sowohl für die Behandlung mit DMSO als auch mit SA. Die Stärke der Bindung an das *as-1*-Element ist also, wie bereits für Blätter beschrieben (JUPIN und CHUA, 1996; STANGE *et al.*, 1997), abhängig von Phosphorylierungs- bzw. Dephosphorylierungsereignissen.

Bei Induktion mit SA konnte erneut die Bindungsreduktion mit dem Resultat der bevorzugten Besetzung nur einer Halbseite des *as-1*-Elements (Verstärkung der Banden 1 und 2) beobachtet werden, während die Doppelbesetzung reduziert war (Verringerung der Banden 4, 5 und 6). Die Bande 3, die das Heterodimer aus TGA2.1 und TGA2.2 enthält, bleibt nach SA-Behandlung in ihrer Intensität nahezu unverändert, was darauf schließen lässt, dass TGA2.1 nicht durch die vorgenommenen Behandlungen in seinen Bindungseigenschaften zu beeinflussen ist.

Die geschilderte Reduktion der Bindung nach SA konnte in weiteren unabhängigen Extrakten nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die quantitative Auswertung der prozentualen Veränderung der Bandenintensitäten von insgesamt 12 unabhängigen Extrakten (sechs Paare + SA / + DMSO) belegt eine Verringerung von gesamt gebundenem Protein um 11,2 % bei einer Standardabweichung von 2,8 %. Bei allen Extrakten spiegelt sich die Bindungsreduktion in einer Abschwächung der Doppelbesetzung (Banden 4 – 6) und einem Anstieg der Einfachbesetzung in Bande 1 und 2, nicht aber in Bande 3 wider. SA-Behandlung führt also anders als in Blättern beschrieben (JUPIN und CHUA, 1996; STANGE *et al.*, 1997) in Gesamtzellextrakten zur Reduktion der Bindung an das *as-1*-Element.

6 Diskussion

6.1 In Blättern kommt es nach Salicylsäure zur transienten Bindung der Transkriptionsfaktoren TGA2.1 und TGA2.2 an das *as-1*-Element

6.1.1 Experimenteller Ansatz

Das Bindungsverhalten von Proteinkomplexen an das *as-1*-Element nach Behandlung mit Salicylsäure (SA) wurde bislang nur mit Hilfe von *in-vitro*-Experimenten untersucht (JUPIN und CHUA, 1996, STANGE *et al.*, 1997). Aufgrund dieser Studien wurde ein Modell für die Bindung an *as-1* postuliert, nach dem die Bindungsaktivität eines als ASF-1 bzw. SARP bezeichneten Proteinkomplexes nach SA-Behandlung von Blättern durch die Dissoziation eines ASF-1 / SARP – Inhibitor-Komplexes ansteigt. Die Bindung von ASF-1 bzw. SARP zeigte sich in diesen Studien stimulierbar durch Applikation von SA, Cycloheximid (CHX) bzw. ATP und ist reprimierbar durch die Behandlung mit Phosphatase.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das *in-vivo* Bindungsverhalten der beiden Hauptkomponenten von ASF-1, TGA2.1 und TGA2.2 (NIGGEWEG *et al.*, 2000a), mit Hilfe von VP16-Fusionsproteinen in transgenen Tabakpflanzen untersucht. Da nicht geklärt war, ob die zuvor erwähnten *in-vitro*-Bindungseigenschaften von ASF-1 mit der Situation *in-vivo* übereinstimmen, könnten zwei Mechanismen der SA-induzierten Aktivierung von *as-1* durch TGA2.1 bzw. TGA2.2 zutreffen. Die TGA-Faktoren könnten in einem inaktiven Zustand konstitutiv binden und erst nach SA-Behandlung aktiviert werden. In diesem Fall würde die Bindung von Fusionsproteinen zwischen TGA-Faktoren und VP16-Aktivierungsdomäne zu einer konstitutiven, starken Aktivierung der Zielgene ohne SA-Behandlung führen. Kommt es hingegen erst nach SA-Induktion zur Bindung der TGA-Faktoren, so wäre eine verstärkte, induzierte Aktivierung der Zielgene die Folge.

Es wurden transgene Pflanzen erzeugt und charakterisiert, die Fusionsproteine aus der VP16-Aktivierungsdomäne und TGA2.1 bzw. TGA2.2 überexprimieren. Die VP16-Domäne wurde jeweils N-terminal und C-terminal angefügt.

6.1.2 Die Menge der Fusionsproteine übersteigt im Kern nicht die Menge der endogenen TGA-Faktoren

Die transgenen Fusionsproteine und die transgenen Proteine der Kontrolllinien konnten durch Immunoblot-Analysen in Gesamtzellextrakten eindeutig nachgewiesen werden (Abbildung 5-9). Die Detektion mit Antiseren gegen Streptag® II bzw. TGA2.1 ließ ein etwa gleich starkes Ausmaß der Überexpression für die meisten verwendeten transgenen Linien in Gesamtzellextrakten erkennen. Von den Linien, die für weitere Versuche herangezogen wurden, wiesen nur die Linie SNN 2.1 #22 und SNN 2.2 #8, die die unveränderten Faktoren überexprimieren, eine etwas geringere Expression des transgenen Proteins auf.

Immunoblot-Analysen mit Kernextrakten der Linien SNN VP2.1s #4 und SNN 2.2VPs #2 belegten durch Detektion mit dem Antiserum gegen Streptag® II eindeutig, dass die Fusionsproteine in den Zellkern gelangen (Abbildung 5-10c)). Dies ist die erste notwendige Voraussetzung für den angestrebten Einfluß der Fusionsproteine auf die Zielgene. Die Menge der im Kern nachweisbaren Fusionsproteine VP2.1s und 2.2VPs bewegt sich in derselben Größenordnung und ist auch drei Stunden nach SA-Induktion unverändert. Die Effekte auf die Expression von Zielgenen sind deshalb direkt miteinander vergleichbar.

Durch den halbquantitativen Vergleich der in verschiedenen Immunoblots ermittelten Proteinmengen in Abbildung 5-10 konnte für die Linien SNN wt, SNN VP2.1s #4 und SNN 2.2VPs #2 ein Gesamtbild der Mengenverteilung der verschiedenen TGA-Derivate im Kern gewonnen werden (Tabelle 5-1a)). Demnach ist die endogene TGA2.1-Menge in Kernen aller drei Linien mit 7,5 % der TGA2.2-Proteinmenge im Wildtyp (Bezugswert) gleich und ändert sich nicht nach dreistündiger SA-Behandlung (Abbildung 5-10d)). Obwohl die Untersuchung der endogenen *TGA2.1*-Transkriptmengen nach SA-Behandlung (Abbildung 5-21) eine Induzierbarkeit insbesondere in SNN VP2.1s #4 belegt, schlägt sich diese Transkripterhöhung nicht in einer Steigerung der kernlokalisierten TGA2.1-Menge in dieser Linie nieder. Die Menge an transgenem Fusionsprotein VP2.1s ist mit 75 % der Wildtyp-TGA2.2-Menge zehnfach gegenüber der endogenen TGA2.1-Menge erhöht. Da in dieser Linie die kernlokalisierte Menge an endogenem TGA2.2 auf 200 % des Bezugswerts erhöht ist, macht das transgene Protein nur etwa 36 % der gesamten TGA2.x-Proteinmenge aus.

Für die Linie SNN 2.2VPs #2 zeichnet sich ein ähnliches Bild ab. Die Menge an transgenem Protein 2.2VPs ist gleich der Menge von endogenem TGA2.2 im Wildtyp, und macht bei gleichzeitiger Steigerung der kernlokalisierten endogenen TGA2.2-Menge auf 200 % des

Bezugswerts in dieser Linie etwa 33 % an der Gesamtmenge an TGA-Faktoren der Klasse II aus.

Bei Betrachtung der in Tabelle 5-1b) dargestellten Daten zur Heterodimerisierungssituation der TGA-Faktoren fällt auf, dass der Anteil der Dimere, die aus endogenen Faktoren entstehen (TGA2.1/TGA2.2 und TGA2.2/TGA2.2), in den transgenen Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp nahezu unverändert bleibt. Der erhöhte TGA2.2-Anteil wird fast vollständig in Heterodimeren mit dem jeweiligen transgenen Protein gebunden.

Für eine sorgfältige Diskussion sind Daten zu berücksichtigen, die bei der genauen Analyse der Linie SNN 2.2 #8 ermittelt wurden:

- Aus Studien an transgenen Pflanzen ist bekannt, dass die Überexpression von TGA2.2 die Expression der Zielgene *Nt103* und *IEGT* effektiv steigern kann (NIGGEWEG *et al.*, 2000a).
- Im Gesamtzellextrakt lässt sich im EMSA eine ca. dreimal stärkere Bindung an das *as-1*-Element feststellen, die durch eine gesteigerte Menge TGA2.2 hervorgerufen wird, und mit der Menge von TGA2.2 im Gesamtzellextrakt dieser Pflanzen korreliert (NIGGEWEG *et al.*, 2000a).
- KLINGEBIEL konnte in bislang unveröffentlichten Untersuchungen zeigen, dass diese Pflanzen im Zellkern keine nachweisbar erhöhte Menge an TGA2.2 besitzen.
- Dennoch ist in Kernextrakten dieser Pflanzen im EMSA eine gesteigerte Bindung von TGA2.2 an das *as-1*-Element nachzuweisen (KEGLER, unveröffentlicht).

Offenbar gibt es einen Mechanismus, der die Menge an TGA2.2 im Zellkern begrenzt. KLINGEBIEL konnte in bislang unveröffentlichten Untersuchungen weiterhin zeigen, dass die transgenen Linien SNN VP2.2s #8 und SNN 2.2VPs #2 eindeutig mehr TGA2.2 im Kern akkumulieren. Der Quervergleich mit diesen Daten in Abbildung 5-10 lässt vermuten, dass auch in der Linie SNN VP2.1s #4 die kernlokalisierte TGA2.2-Menge erhöht ist.

Zur Erklärung dieser Beobachtungen kann lediglich ein Modell vorgeschlagen werden, da im Rahmen dieser Arbeit keine weiteren Daten zu diesem Thema gesammelt wurden. Die vorliegenden Resultate deuten auf einen Mechanismus hin, der selektiv die Menge an TGA2.2-Homodimeren im Zellkern begrenzt. Die Mengenbegrenzung könnte entweder durch kontrollierten Kernimport oder durch selektiven Kernexport der TGA2.2-Homodimere gewährleistet werden. Heterodimere zwischen TGA2.2 und TGA-VP16-Fusionsproteinen werden nicht erkannt und können im Kern akkumulieren, so dass die Gesamtmenge an

TGA2.2 im Kern ansteigt, nicht aber die Menge an TGA2.2-Homodimeren. Für die ausschließliche Akkumulation von Heterodimeren aus TGA2.2 und Fusionsproteinen spricht die bereits erwähnte Beobachtung, dass die zusätzlichen TGA2.2-Moleküle im Kern fast ausschließlich als Heterodimere mit transgenen Proteinen vorliegen (Tabelle 5-1b)).

Die gesteigerte Zielgenexpression in SNN 2.2 #8 ist indes nur dadurch zu erklären, dass sich die aus dem Zellkern ausgeschlossenen TGA-Faktoren im Cytosol anreichern und einen repressorischen Faktor der Bindung an das *as-1*-Element austitrieren. Dies könnte dazu führen, dass die gleiche Menge an kernlokalisierten TGA-Faktoren eine verstärkte Bindungs- bzw. Zielgenaktivität hervorruft. Die Überexpression von Fusionsproteinen könnte den gleichen Effekt zur Folge haben.

Demnach könnte eine Verstärkung der SA-induzierten Zielgenexpression in diesen Pflanzen ebenfalls auf der Reduktion dieser repressorischen Funktion beruhen. Somit wäre keine Aussage über die *in-vivo*-Bindungseigenschaften der TGA-Faktoren möglich, solange nicht die Bindungsfähigkeit der Fusionsproteine nachgewiesen ist. Dieser Nachweis ist deshalb besonders wichtig, weil im EMSA die Bindung von *in-vitro*-translatierten Fusionsproteinen nicht nachgewiesen werden konnte.

6.1.3 Direkte Effekte der Fusionsproteine auf die Zielgenexpression

Bei Überexpression der TGA-VP16-Fusionsproteine kommt es zu einer erhöhten Basaltranskription der Zielgene *Nt103* und *as-1-GUS* (Abbildung 5-11, Tabelle 6-1). Deshalb ist eine Restbindeaktivität der TGA-Faktoren wahrscheinlich. Insbesondere die Beobachtung, dass die Überexpression von TGA2.2 nicht zu einer Anhebung der Hintergrundaktivität führt, während diese in SNN 2.2VPs #2 deutlich erhöht ist, legt die Vermutung nahe, dass dieses Phänomen sich nur bei Überexpression von TGA-Faktoren ausprägt, die über eine Aktivierungsdomäne verfügen. Konform mit dieser Vermutung zeigen Fusionsproteine aus TGA2.1 und VP16-Domäne ebenfalls eine erhöhte Basalaktivität der Zielgene. Auch die Überexpression von unverändertem TGA2.1, für den im Hefe Two-Hybrid-System eine Aktivierungsfunktion nachgewiesen werden konnte (NIGGEWEG *et al.*, 2000b), hat eine solche Anhebung zur Folge (Tabelle 6-1). Diese ist jedoch nicht so stark, wie bei Anwesenheit der Fusionsproteine, was mit einem geringeren Transaktivierungspotential von TGA2.1 gegenüber der VP16-Aktivierungsdomäne begründet werden kann.

Ein entscheidender Punkt, der aus dieser Betrachtung resultiert, ist die funktionelle Bindung der VP16-Fusionsproteine an das *as-1*-Element. Weitere unveröffentlichte Untersuchungen

von WEIGEL im Hefe One-Hybrid-System belegen die Fähigkeit von 2.2VPs, an DNA zu binden und die Aktivität eines Reportergens zu steigern. Da TGA2.1-VP16-Fusionsproteine wahrscheinlich als Heterodimere mit TGA2.2 im Zellkern vorliegen und TGA2.1/TGA2.2-Heterodimere *in-vitro* etwa die gleiche Bindeaktivität zeigen wie TGA2.2-Homodimere, können diese Ergebnisse mit einiger Wahrscheinlichkeit auf Fusionsproteine aus TGA2.1 und VP16 übertragen werden.

Tabelle 6-1: Relative Transkriptmengen und Induktionsfaktoren der Zielgene *as-1-GUS* und *Nt103* in verschiedenen transgenen Pflanzen uninduziert bzw. nach dreistündiger SA-Induktion. Relative Werte in Prozent der Wildtyp-Transkription nach SA-Induktion.

Pflanze	<i>GUS</i>			<i>Nt103</i>		
	0 h SA	3 h SA	3 h / 0 h	0 h SA	3 h SA	3 h / 0 h
SNN <i>as-1-GUS</i>	12	100	8	6	100	18
SNN VP2.1s #2	34	255	8	46	697	15
SNN VP2.1s #4	32	272	8	51	558	11
SNN 2.1VPs #3	36	242	7	24	757	32
SNN 2.1VPs #6	19	102	5	39	829	21
SNN 2.1 Δ N29 #8	-	-	-	20	537	27
SNN 2.1 #22	-	-	-	15	320	22
SNN 2.2VPs #1	37	201	5	27	393	15
SNN 2.2VPs #2	17	304	18	52	1125	22
SNN VP2.2s #3	23	226	10	29	500	17
SNN VP2.2s #8	31	203	7	31	416	14
SNN 2.2 #8	-	-	-	9	417	49

Für die Betrachtung der Effekte auf die Zielgenexpression in transgenen Pflanzen unter Kapitel 6.3 ist festzuhalten, dass mit großer Wahrscheinlichkeit von einer Funktionalität der Fusionsproteine auszugehen ist.

6.2 Die Bindung der Fusionsproteine zwischen VP16 und TGA2.1 bzw. TGA2.2 an das *as-1*-Element ist Salicylsäure-induziert und transient

6.2.1 ASF-1 ist im uninduzierten Zustand mit einem Bindungsinhibitor assoziiert

In Pflanzen, die ein Fusionsprotein aus VP16-Aktivierungsdomäne und TGA2.1 bzw. TGA2.2 überexprimieren, konnte sowohl im uninduzierten Zustand als auch drei Stunden nach SA-Induktion eine Erhöhung der Transkription der Zielgene *as-1-GUS* und *Nt103* gegenüber der Transkriptionsrate im Wildtyp beobachtet werden (Abbildung 5-11). Die Induzierbarkeit durch SA blieb dabei deutlich erhalten. Im Falle einer konstitutiven Bindung der VP16-Fusionsproteine sollte die Anwesenheit der VP16-Aktivierungsdomäne zu einer starken konstitutiven Transkription führen. Da dies nicht zu beobachten ist (Abbildung 5-11 und Tabelle 6-1), erscheint eine Bindung der Fusionsproteine im uninduzierten Zustand unwahrscheinlich. Dies Ergebnis unterstützt die Annahme von JUPIN und CHUA (1996), wonach SARP im uninduzierten Zustand mit einem Bindungsinhibitor SAI assoziiert vorliegt, und es nach SA-Induktion zur Dissoziation dieses Komplexes kommt. Weitere Studien (JOHNSON *et al.*, 2001) belegen darüber hinaus die Assoziation des eng verwandten Transkriptionsfaktors TGA1a aus *N. tabacum* mit einem ca. 120 kDa großen Protein, wenn TGA1a nicht an die DNA bindet, bzw. deuten auf eine Dissoziation des TGA1a/Inhibitor-Komplexes nach Stimulus (in diesem Fall 2,4-D) hin. Die für die Interaktion seitens TGA1a verantwortliche Region konnte in der C-terminalen Region lokalisiert werden. Die Tatsache, dass TGA1a und die TGA-Faktoren 2.1 bzw. 2.2 im Bereich der bZIP-Domäne und des C-Terminus auf Proteinebene eine 67%ige bzw. 72%ige Homologie (NIGGEWEG, 1999) aufweisen, lässt einen ähnlichen Regulationsmechanismus der Bindung auch für TGA2.1 bzw. TGA2.2 wahrscheinlich erscheinen.

6.2.2 Die Bindungsaktivität von ASF-1 wird durch zwei getrennte Ereignisse reguliert

Da die Modellvorstellung der Bindungsinhibition von ASF-1 im uninduzierten Zustand nach JUPIN und CHUA (1996) bezüglich der SA-induzierten Dissoziation des ASF-1/SAI-Komplexes durch die zuvor beschriebenen Versuche *in-vivo* bestätigt werden konnte, sollten weitere *in-vitro*-Experimente der Autoren *in-vivo* nachvollzogen werden. Durch einstündige Behandlung der Pflanzen mit CHX konnten die Autoren im EMSA ein massive Verstärkung

der Bindeaktivität an *as-1* erzielen. Aufgrund dieser Daten wurde auf die CHX-Labilität des ASF-1/SAI-Komplexes geschlossen.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen, konnte durch einstündige Inkubation der transgenen Linien SNN VP2.1s #4 und SNN 2.2VPs #2 sowie des Wildtyps mit CHX keine Steigerung der *as-1-GUS*-Transkription erreicht werden (Abbildung 5-15b)). Nimmt man an, dass CHX die Dissoziation des SAI/ASF-1-Komplexes auch *in-vivo* bereits nach einer Stunde bewirken kann, so muss man andererseits postulieren, dass für eine effektive Bindung von ASF-1 die TGA-Faktoren eine weitere Modifikation (zu ASF-1*) erfahren müssen. Dabei könnte es sich z. B. um eine posttranslationale Modifikation wie Phosphorylierung handeln. Für diese Art der Modifikation konnte gezeigt werden, dass sie die Bindung von ASF-1 *in-vitro* beeinflussen kann (JUPIN und CHUA, 1996; STANGE *et al.*, 1997). Gleichzeitig muss geschlossen werden, dass die Bedingungen für diese Modifikation bei SA-Behandlung gegeben sind, bei alleiniger CHX-Behandlung jedoch nicht.

Die Tatsache, dass es in allen Linien bei längerer alleiniger Einwirkung von CHX ebenfalls zur Akkumulation des *GUS*-Transkripts kommt, kann z. B. dadurch begründet werden, dass eine lange CHX-Behandlung die Umwandlung von ASF-1 zu ASF-1* begünstigt. Man kann also annehmen, dass nicht die Umwandlung zu ASF-1* sondern die Dissoziation von SAI/ASF-1 der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Ereigniskette ist und es latent zu einer schwachen Konversion von ASF-1 nach ASF-1* kommt. Es ist möglich, dass diese normalerweise SA-induzierte Konversion von JUPIN und CHUA nicht gezeigt werden konnte, weil in den verwendeten Gesamtzellextrakten z. B. eine Kinase aktiv war, die das Gleichgewicht komplett zugunsten von ASF-1* verschoben hat. Für diese Annahme spricht, dass die Bindungsverstärkung durch Phosphatasebehandlung aufzuheben war.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass ASF-1 mit einem zweiten Inhibitor assoziiert vorliegt, welcher nicht CHX-labil ist; für diese Möglichkeit gibt es jedoch keine zusätzlichen experimentellen Hinweise.

JUPIN und CHUA konnten ferner nachweisen, dass die gleichzeitige Behandlung von Wildtyp-Pflanzen mit SA und CHX im EMSA zu einer synergistischen Verstärkung der Bindung an das *as-1*-Element führt. Die Autoren begründen das synergistische Potential der ASF-1-Bindeaktivität damit, dass es nach alleiniger SA-Behandlung nicht zur Dissoziation aller ASF-1/SAI-Komplexe kommt, und die CHX-Behandlung die Dissoziation weiter steigern kann. Ein ähnlicher synergistischer Effekt auf die Reporterexpression konnte auch in den hier durchgeführten Versuchen *in-vivo* gezeigt werden (Abbildung 5-15c)). Nach entsprechender Behandlung kommt es zur Hyperakkumulation des *GUS*-Transkripts sowohl

im Wildtyp als auch in Anwesenheit der Fusionsproteine. Dabei bleibt die relative verstärkende Wirkung der Fusionsproteine unverändert zu der Situation, die bei alleiniger SA-Applikation zu beobachten ist. Das zitierte Modell konnte also in diesem Punkt bestätigt werden.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass ASF-1 gemäß aller zur Verfügung stehenden Daten im uninduzierten Zustand mit einem Bindungsinhibitor SAI assoziiert ist. Dieser Komplex kann durch SA- und/oder CHX-Behandlung dissoziiert werden. ASF-1 kann in diesem Zustand jedoch noch immer nicht effizient binden. Die Bindungsbereitschaft wird durch ein zweites, SA-induziertes Ereignis, die Konversion zu ASF-1* verstärkt. Bei diesem Schritt könnte es sich z. B. um eine Phosphorylierung handeln. Diese Zusammenhänge sind der modellhaften Darstellung in Abbildung 6-1 zu entnehmen.

6.2.3 Die transiente Bindung von ASF-1 wird durch einen Salicylsäure-induzierten Bindungsinhibitor gewährleistet

Nach Behandlung mit SA kommt es zur transienten Bindung beider Fusionsproteine an das *as-1*-Element und somit zur verstärkten Aktivierung der *as-1-GUS*-Transkription (Abbildung 5-15a)). Um diese transiente Bindung zu erreichen, muss die Bindeaktivität der TGA-Faktoren nach zunächst erfolgter Bindung durch ein weiteres Ereignis wieder herabgesetzt werden.

Wie aus Abbildung 5-15c) zu entnehmen ist, kommt es bei gleichzeitiger Behandlung mit SA und CHX nicht mehr zur Bindungsinaktivierung der TGA-Faktoren, sondern zu einer kontinuierlichen Akkumulation des *GUS*-Transkripts. Dieses Phänomen stimmt mit Daten von QIN *et al.* (1994) überein. Demzufolge kommt es nach alleiniger SA-Induktion zur Neusynthese eines Bindungsinhibitors der TGA-Faktoren (SIBI für SA-induzierter Bindungs-Inhibitor). Unter der Annahme, dass die Expression des Bindungsinhibitors auf transkriptioneller Ebene mit der gleichen Kinetik erfolgt wie die *as-1-GUS*-Transkription, kann unter Einbeziehung der Translationsdauer der transiente Verlauf der *as-1*-Aktivierung erklärt werden. Unterdrückt man mit Hilfe von CHX die Proteinneusynthese, so kommt es aufgrund des Fehlens des Bindungsinhibitors nicht mehr zur transienten, sondern zur kontinuierlichen *as-1*-vermittelten Aktivierung der Transkription durch die TGA-Faktoren und somit zur Hyperakkumulation des *GUS*-Transkripts.

Dieses Ergebnis wirft für die Zukunft die Frage auf, ob bzw. wie die mit SIBI assoziierten TGA-Faktoren die späte SA-induzierte Genexpression vermitteln.

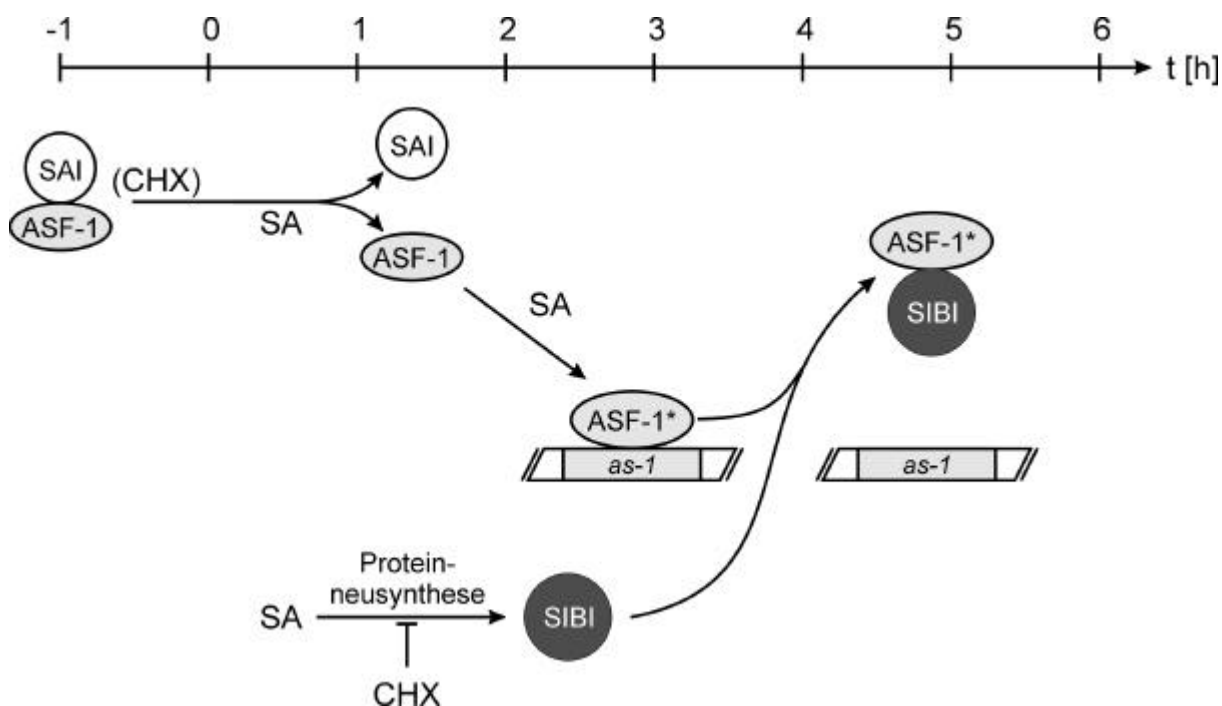


Abbildung 6-1: Modell der zeitlichen Bindungsregulation von ASF-1. SAI: SA-Inhibitor (JUPIN und CHUA, 1996), SIBI: SA-induzierter Bindungs-Inhibitor

6.3 Der Promotorkontext der Zielgene moduliert den Einfluss *as-1*-ähnlicher Elemente auf die Transkription

6.3.1 Im Promotor von *Nt103* übernehmen weitere *cis*-Elemente regulatorische Funktionen

Das *as-1*-ähnliche *cis*-Element *as-103* spielt für die SA-Induzierbarkeit des *Nt103*-Promotors eine entscheidende Rolle (DROOG *et al.*, 1995). Nach SA-Induktion wird für die *Nt103*-Transkription ein ähnlicher Einfluß der Fusionsproteine wie für *as-1-GUS* beobachtet (Abbildung 5-16a)). Da die Expression des *Nt103*-Promotors deutlich stärker ist, als die des *as-1*-Reportergens, muss auf die Existenz eines für den *Nt103*-Promotor spezifischen Faktors geschlossen werden, der zusammen mit ASF-1* in synergistischer Weise die *Nt103*-Expression bewerkstelligt.

Im uninduzierten Zustand kommt es am *Nt103*-Promotor nicht zur Bindung der Fusionsproteine, während nach SA-Behandlung die Fusionsproteine VP2.1s und 2.2VPs die Transkription von *Nt103* gegenüber dem Wildtyp steigern. Dies gilt für die Zeitpunkte 2 h und 3 h für beide Proteine und darüber hinaus für 5 h und 7 h nur für 2.2VPs. Da die *Nt103*-Expression zwischen zwei Versuchsreihen leicht schwanken kann, wird diese Abweichung in SNN 2.2VPs #2 nicht weitergehend diskutiert.

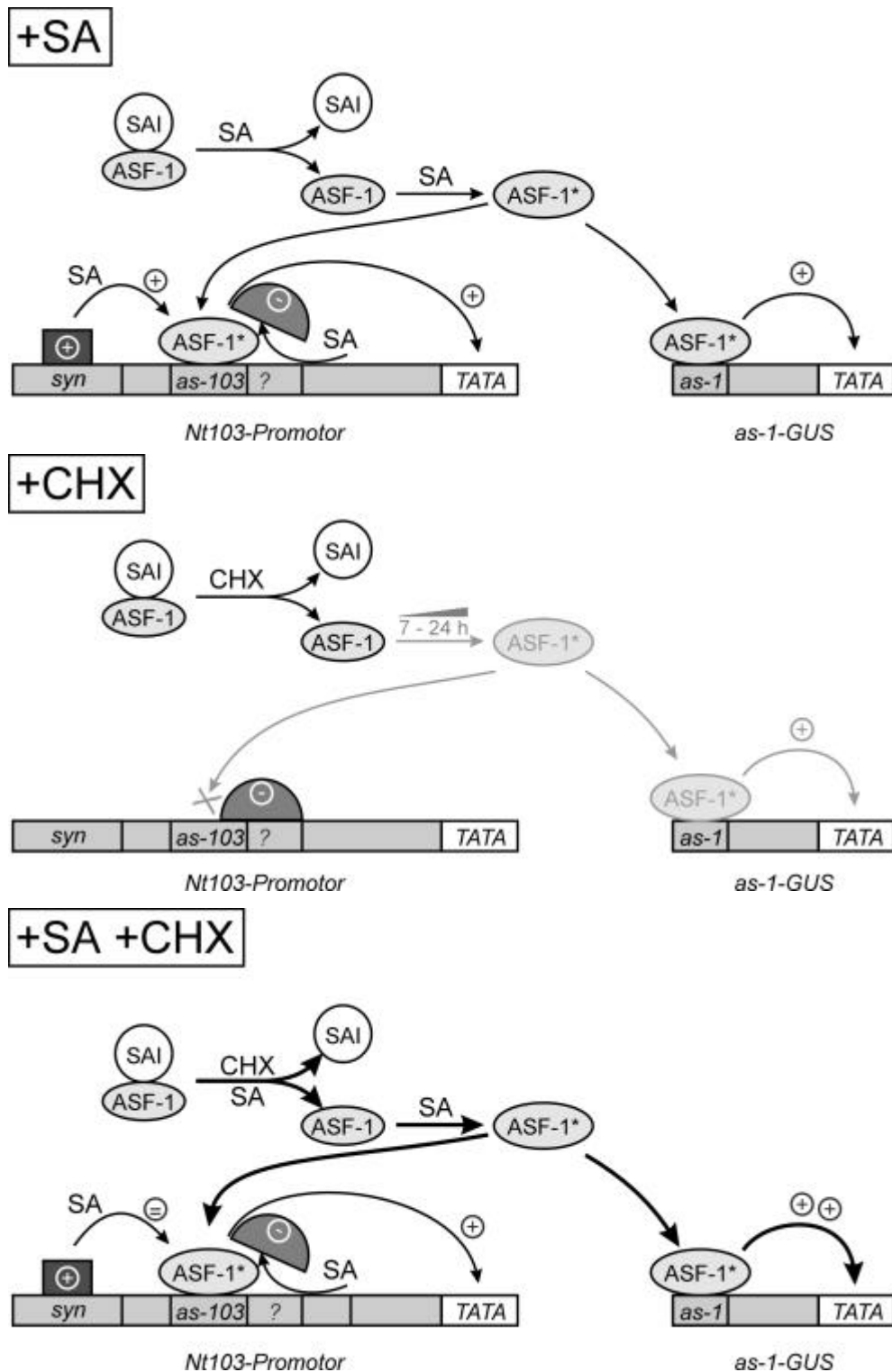


Abbildung 6-2: Modell der Bindungs- und Transaktivierungssituation an den Promotoren der Zielgene *Nt103* und *as-1-GUS*. Legende: *syn* ist ein *cis*-Element, das einen synergistisch (+) und gleichzeitig bindungsbegrenzenden (=) *trans*-Faktor für ASF-1 bindet; ? ist ein nicht identifiziertes *cis*-Element mit repressorischer Funktion auf *as-1*. Halb gefüllt sind Ereignisse nach längerer CHX-Inkubation dargestellt. Weitere Erläuterungen sind den Abschnitten 6.2 und 6.3.1 zu entnehmen.

Im Gegensatz zu *as-1-GUS* (vgl. Abbildung 5-15b)) ist nach CHX-Behandlung die *Nt103*-Transkription auch im späten Verlauf nicht induzierbar (Abbildung 5-16b)). Es kann deshalb auf die Anwesenheit eines inhibitorischen Proteins geschlossen werden, das an ein benachbartes *cis*-Element im Promotor von *Nt103* bindet, und die Aktivierung durch den sich anreichernden ASF-1* verhindert. Die DNA-Bindung bzw. Repressorfunktion dieses Proteins wird durch SA-Behandlung, jedoch nicht durch CHX-Behandlung aufgehoben.

Bei gleichzeitiger Behandlung mit SA und CHX kommt es im Gegensatz zu *as-1-GUS* (Abbildung 5-15c)) nicht zur weiteren Steigerung der Promotoraktivität (Abbildung 5-16c)). Dies gibt Grund zu der Annahme, dass der zuvor beschriebene *Nt103*-spezifische, synergistische Faktor begrenzend für die Transkriptionsaktivierung wird.

Abbildung 6-2 zeigt eine modellhafte Darstellung der wahrscheinlichen Situation am *Nt103*-Promotor und am isolierten *as-1*-Element im Reporterkonstrukt *as-1-GUS*.

6.3.2 Der CaMV 35S Promotor wird durch Cycloheximid-Behandlung hyperaktiviert

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals der Einfluss von TGA2.1 und TGA2.2 auf die Expression des CaMV 35S Promotors untersucht (Abbildung 5-20). Anders als in der Literatur beschrieben (QIN *et al.*, 1994), konnte in keiner der analysierten Linien eine SA-Induzierbarkeit des 35S Promotors nachgewiesen werden (Abbildung 5-20a)). Unterschiede zwischen den beschriebenen Studien bestehen in der Verwendung verschiedener Tabak-Kultivare (SR1 bei QIN *et al.*, 1994; SNN in dieser Arbeit) und die Behandlung mit unterschiedlichen SA-Konzentrationen (2 mM SA bei QIN *et al.*, 1994; 1 mM SA in dieser Arbeit). Zudem diente in dieser Arbeit als Reportergen nicht *CaMV 35S::GUS* sondern *CaMV 35S::tetR*.

Obwohl *in-vitro* (NIGGEWEG *et al.*, 2000a; NIGGEWEG *et al.*, 2000b) und *in-vivo* (diese Arbeit) eine Bindung von TGA2.1 und TGA2.2 an das *as-1*-Element des CaMV 35S Promotors nachgewiesen werden konnte, zeigt die Überexpression von Wildtyp- wie VP16-Fusionsderivaten keine sichtbare Auswirkung auf die Expression des CaMV 35S Promotors nach SA-Induktion. Offenbar können die Fusionsproteine nicht an den CaMV 35S Promotor binden. Eine mögliche Erklärung ist die benachbarte Bindung eines anderen Proteins, das die Bindung an *as-1* verhindert.

Eine einstündige Behandlung der Blätter mit CHX führte sowohl in den transgenen Linien als auch im Wildtyp zu einer bislang nicht beschriebenen, etwa gleichförmig verstärkten Expression des Promotors (Abbildung 5-20b)), jedoch ohne nennenswerte Unterschiede zwischen den verschiedenen Linien. Dies belegt, dass es nach CHX-Behandlung nicht automatisch zur starken Bindung der TGA-Faktoren an das *as-1*-Element kommt (vgl. Abschnitt 6.2.2). Die CHX-induzierte Transaktivierung könnte entweder auf das Anschalten eines *trans*-Faktors an einem anderen *cis*-Elements oder auf die Unterdrückung einer repressorischen Funktion durch CHX zurückzuführen sein.

Bei gleichzeitiger Behandlung mit SA und CHX zeigen ausschließlich die Linien SNN 2.1 #22 und SNN 2.1 ΔN29 #8 eine eindeutige Verstärkung der CaMV 35S Promotoraktivität gegenüber dem Wildtyp (Abbildung 5-20c)). Diese TGA2.1-Derivate sind also in der Lage, an das *as-1*-Element im 35S Promotor zu binden und zur Aktivierung der Genexpression beizutragen. Die Tatsache, dass nur TGA2.1 diesen Effekt hervorrufen kann, spricht für eine selektive Erkennung von TGA2.1 am Promotor. Da weder 2.2VPs noch VP2.1s verglichen mit der Wildtypsituation einen verstärkenden Einfluß auf die Promotoraktivität zeigen, muss angenommen werden, dass keines dieser Fusionsproteine im Proteinkomplex am Promotor akzeptiert wird. Da TGA2.2 keine eigene Aktivierungsdomäne besitzt, kann in diesem Fall keine eindeutige Aussage getroffen werden.

Demnach können nur Dimere, die TGA2.1 enthalten, an den CaMV 35S Promotor binden. Außerdem spricht dieses Ergebnis sehr stark dafür, dass nach CHX-Einwirkung eine Bindungsinhibition an *as-1* aufgehoben wird, so dass es durch die in Domäne B gelegene, konstitutive Aktivierungsfunktion und die Transaktivierungsfunktion von ASF-1* zu einer synergistischen Verstärkung der Promotoraktivität kommt. Die synergistische Wirkung von Domäne B und Domäne A wurde bereits von BENFEY *et al.*, 1990 vorgeschlagen. Für diese Annahme spricht außerdem, dass die Bindung an *as-1* in *as-1-GUS* eine deutlich geringere Transkription hervorruft, als es beim CaMV 35S Promotor zu beobachten ist. Deshalb kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass es nach alleiniger CHX-Behandlung zu einer latenten Bindung von ASF-1* an das *as-1*-Element kommt, diese sich jedoch nicht sichtbar auf die Promotoraktivität auswirkt. Ein Modell dieser Zusammenhänge ist in Abbildung 6-3 dargestellt.

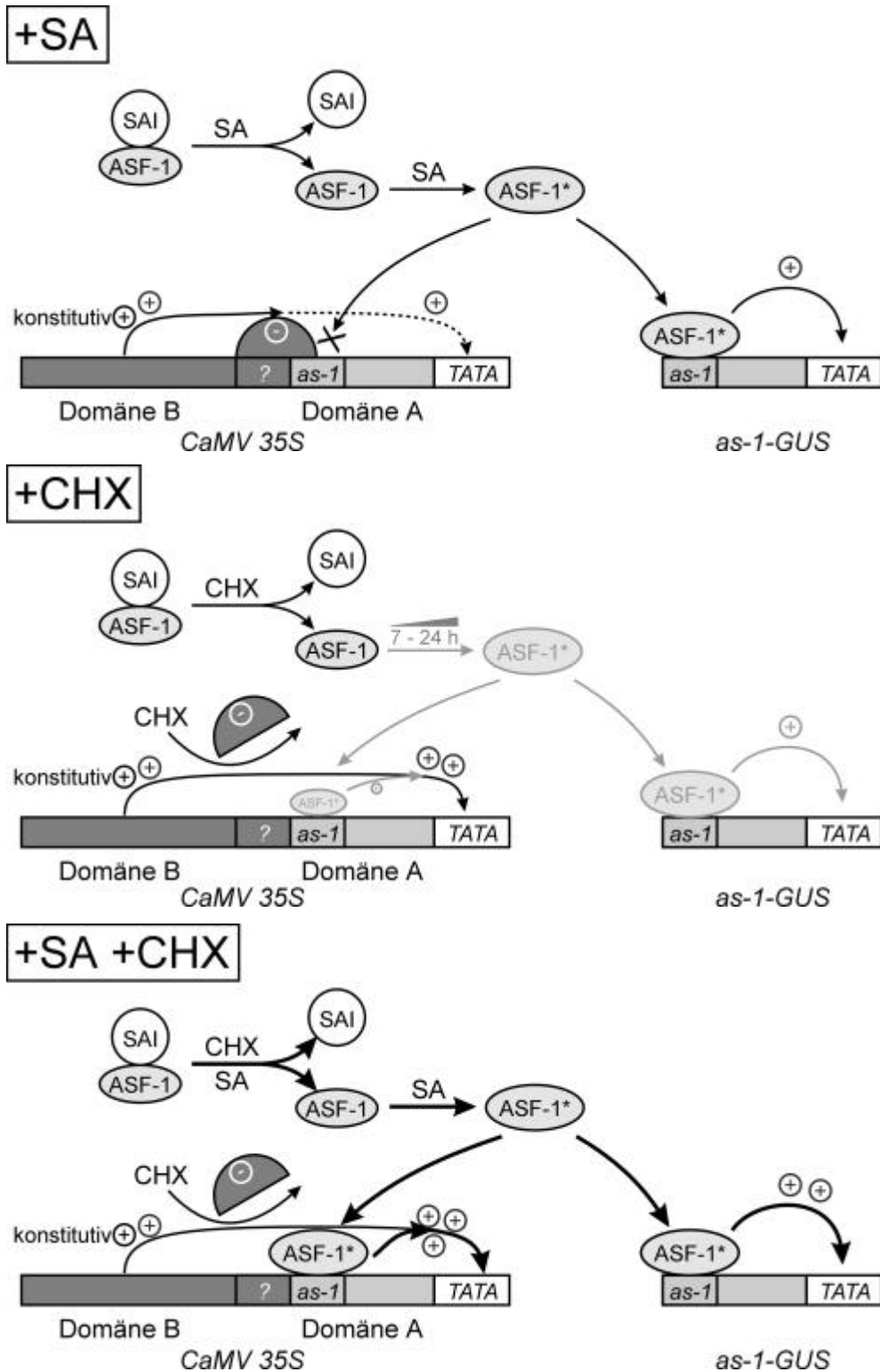


Abbildung 6-3: Modell der Bindungs- und Transaktivierungssituation an den Promotoren CaMV 35S und *as-1-GUS*. Legende: ? ist ein nicht identifiziertes *cis*-Element mit bindungsrepressorischer Funktion auf *as-1*. Halb gefüllt sind Ereignisse nach längerer CHX-Inkubation dargestellt. ASF-1* besteht am CaMV 35S Promotor vermutlich nur aus TGA2.1/TGA2.2-Heterodimeren. Weitere Erläuterungen sind den Abschnitten 6.2 und 6.3.2 zu entnehmen.

6.4 Die ENGRAILED-Silencerdomäne zeigt in Fusion mit TGA2.1 bzw. TGA2.2 keinen repressorischen Effekt auf die Expression von *Nt103*

Die Transkriptionsfaktoren TGA2.1 und TGA2.2 wurden neben der VP16-Aktivierungsdomäne auch mit der Silencerdomäne von ENGRAILED aus *D. melanogaster* fusioniert. WERR konnte in bislang unveröffentlichten Experimenten zeigen, dass diese Domäne in Fusion mit Transkriptionsfaktoren, die die Entwicklung der Blüte in *A. thaliana* beeinflussen, repressorisch aktiv ist. Fusionsproteine aus der ENGRAILED-Silencerdomäne und TGA2.1 bzw. TGA2.2 führten, in transgenen Tabakpflanzen überexprimiert, nicht zur Repression von Zielgenen nach SA-Induktion (Abbildung 5-24). Vielmehr konnte für SNN 2.2ENGs #3 eine leichte Steigerung der Transkription von *Nt103* zu einem ungewöhnlich späten Zeitpunkt nach 7 h SA-Einwirkung beobachtet werden. Obwohl für ENGRAILED auch ein Transaktivierungspotential beschrieben ist (HEEMSKERK *et al.*, 1991; SERRANO und MASCHAT, 1998), können die hier beobachteten Effekte nicht schlüssig erklärt werden, da das Maximum der *Nt103*-Expression zeitlich verzögert ist. Die Überexpression von 2.2ENGs in der Pflanze könnte zu pleiotropen Veränderungen geführt haben, die in einer Modifikation der *Nt103*-Transkription resultieren.

6.5 Die SA-induzierte *as-1*-Aktivierung in Blättern und Suspensionszellen erfolgt in unterschiedlicher Weise

Die in dieser Arbeit beschriebenen Analysen wie auch andere intensive Untersuchungen in der Arbeitsgruppe (KEGLER, unveröffentlicht) belegen, dass die Überexpression von TGA2.1 Δ N29 nach SA-Induktion in Blattgewebe zu einer deutlichen Steigerung der Expression von *Nt103* führt, während ein weiteres Zielgen *parA* (TAKAHASHI *et al.*, 1989) nur eine moderate Steigerung erfährt. Darüber hinaus konnte KEGLER zeigen, dass eine transdominante Suppressorvariante von TGA2.1, die nicht mehr in der Lage ist, an DNA zu binden, jedoch weiterhin Dimere mit anderen TGA-Faktoren bilden kann, in Blättern nur zu einer moderaten Unterdrückung der SA-induzierten *Nt103*- bzw. *parA*-Expression führt. Um mit Hilfe von pharmakologischen Untersuchungen den Einfluß von Inhibitoren auf die Signaltransduktionskette erfassen zu können, wurden Suspensionszelllinien von SNN wt und den vorhandenen transgenen Pflanzen SNN 2.1 Δ N29 #8 und SNN 2.1trD #2 etabliert und bezüglich der SA-induzierten Transkription von *Nt103* und *parA* charakterisiert.

Beim Vergleich der Zielgenexpression in Zellkulturen zeigten sich deutliche Unterschiede zur Situation in Blättern (vgl. oben):

- Die SA-induzierte Expression von *Nt103* war in Suspensionskulturen mit ca. 31 % der Wildtyp-Expression moderat gedämpft (Abbildung 5-26, Angabe für 3 h – Wert).
- Die SA-induzierte *paraA*-Expression wurde drastisch auf ca. 5 % der Wildtyp-Expression herabgesetzt (Abbildung 5-27, Angabe für 3 h – Wert).

In Suspensionszellen liegt also eindeutig ein anderer Regulationsmechanismus für diese Gene vor als in Blättern.

In EMSA-Analysen mit nativen Gesamtzellextrakten nach JUPIN und CHUA (1996) konnte zunächst konform zu den Erwartungen eine Reduktion der Bindeaktivität von SARP in SNN 2.1 Δ N29 #8 gegenüber Wildtyp-Extrakten nachgewiesen werden (Abbildung 5-30 und Abbildung 5-31a)). Immunoblot-Analysen zeigten jedoch, dass es in diesen Extrakten wahrscheinlich zu einer artifiziellen, kovalenten Verknüpfung der TGA-Faktoren TGA2.1 und TGA2.2 kommt (Abbildung 5-32). Deshalb wurden weitere Studien mit einem veränderten Protokoll nach KEGLER (FixProt, unveröffentlicht) durchgeführt. Diese Extrakte boten den Vorteil, dass die proteolytische Abspaltung des N-Terminus weitgehend unterdrückt war (Abbildung 5-33).

Bei der Untersuchung von FixProt-Extrakten aus für 2 h DMSO- bzw. SA-behandelten Wildtyp-Suspensionen im EMSA konnten folgende Beobachtungen gemacht werden (Abbildung 5-34, links):

- Nach SA-Behandlung kommt es zu einer deutlichen Bindungsreduktion von SARP am *as-1*-Element. SARP besteht in diesem Fall überwiegend aus TGA2.2-Homodimeren und zu einem geringen Teil aus TGA2.1/TGA2.2-Heterodimeren.
- Im dephosphorylierten Zustand (ohne den Phosphatase-Inhibitor NaF) kann keine effektive Bindung an das *as-1*-Element nachgewiesen werden.

Hier zeigt sich wiederum ein deutlicher Unterschied zur Situation in Blättern. Dort wurde eine SA-abhängige Bindungsverstärkung gezeigt, die jedoch ebenfalls durch Dephosphorylierung unterbunden werden konnte (JUPIN und CHUA, 1996; STANGE *et al.*, 1997).

In Suspensionen erscheint ein Modell plausibel, nach dem es nach SA-Behandlung zur Bindungsreduktion von SARP an *as-1* kommt. Die Transkriptionsaktivierung könnte durch einen anderen Faktor erfolgen, der in den hier gezeigten Experimenten im EMSA nicht nachzuweisen ist. Dabei ist zu berücksichtigen, dass in FixProt-Extrakten die

Kernproteinfraktion stark unterrepräsentiert ist. Im dephosphorylierten Zustand (-NaF) ist die Bindung an *as-1* inhibiert.

Führt man die gleichen Versuche mit FixProt-Extrakten aus SNN 2.1 Δ N29 #8-Suspensionen durch (Abbildung 5-34, rechts), so ist folgende Situation zu beobachten:

- Es kommt zu einer konstitutiven starken Bindung an das *as-1*-Element. Ein Einfluß von SA auf die Bindung ist nicht nachzuweisen.
- Die Menge an TGA2.2-Homodimeren ist zugunsten des TGA2.1/TGA2.2-Heterodimers reduziert.
- Es lassen sich keine nennenswerten Unterschiede zwischen NaF-behandelten und NaF-freien Zellextrakten erkennen. Im Gegensatz zum Wildtyp ist die Bindung nicht von der Phosphorylierung einer regulatorischen Komponente abhängig.

In das zuvor beschriebene Modell lassen sich diese Daten wie folgt integrieren:

In der transgenen Zelllinie SNN 2.1 Δ N29 #8 kommt es nicht zur Ablösung des SARP-Komplexes vom *as-1*-Element. Die SA-abhängige Bindungsreduktion greift nicht mehr, weshalb der transkriptionsaktivierende Faktor nicht wirksam werden kann. Dieses Phänomen lässt sich durch zwei alternative Annahmen erklären. Einerseits könnte es sein, dass das vorherrschend gebundene TGA2.1/TGA2.2-Heterodimer nicht von einem Inhibitor der Bindung erkannt wird, wodurch es zum Verbleib des Komplexes an der DNA kommt. Andererseits könnte durch die Überexpression von TGA2.1 Δ N29 ein Bindungsinhibitor ausgetitriert werden, was ebenfalls in einem Verbleib der TGA-Faktoren an der DNA resultiert. Beide Möglichkeiten erklären die Unwirksamkeit des vermutlich über Dephosphorylierung wirkenden bindungsinhibierenden Mechanismus'.

Unterstützt wird dieses Modell einer phosphorylierungsabhängigen Bindungsregulation durch Ergebnisse aus Versuchen, in denen der Kinase-Inhibitor Quercetin appliziert wurde (Abbildung 5-36). In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass sich die Verhinderung der Phosphorylierung sowohl *in-vivo* als auch *in-vitro* negativ auf die uninduzierte Bindung an das *as-1*-Element auswirkt.

Die beschriebenen Phosphorylierungsereignisse können entweder an der inhibitorischen Komponente oder direkt an den TGA-Faktoren stattfinden. Im Falle der letzteren Möglichkeit kann man durch Datenbankvergleiche potentielle Phosphorylierungsstellen ermitteln. Für die Vorhersage wurden die Aminosäuresequenzen von Proteinen mit hoher Homologie zu TGA2.1 und TGA2.2 mit Hilfe des Programms NetPhos 2.0 analysiert

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) und die Ergebnisse als Alignment in Abbildung 6-4 dargestellt. Potentielle Phosphorylierungsstellen mit einer Voraussagewahrscheinlichkeit über 0.5 für die Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin wurden hervorgehoben. Besonders interessant für eine differenzielle Regulation von TGA2.1 und TGA2.2 sind potentielle Phosphorylierungsstellen, die nur in einem der beiden TGA-Faktoren anzutreffen sind.

Die Häufung von basischen Aminosäuren insbesondere in der DNA-Bindedomäne könnte zudem auf eine potentielle Interaktionsstelle für MAP-Kinasen hinweisen. Die Argininreste in der Aminosäuresequenz **LRRL** zu Beginn der basischen Domäne konnten von TANOUE *et al.*(2000) experimentell als essentiell für die Interaktion zwischen der MAP-Kinase ERK2 und der Phosphatase MKP3 aus *Xenopus laevis* nachgewiesen werden. Die Autoren machen generell ionische Wechselwirkungen zwischen gehäuft auftretenden basischen und sauren Aminosäureresten für diese Interaktionen verantwortlich. In TGA2.2 und verwandten Transkriptionsfaktoren fällt eine Häufung dieser Reste im Bereich der DNA-Bindedomäne auf.

Weiteren Aufschluss darüber, ob SARP oder ein assoziiertes Protein in seinem Phosphorylierungszustand modifiziert wird, könnten z. B. Immunopräzipitationsexperimente nach Inkubation mit radioaktiv markiertem Phosphat unter verschiedenen Bedingungen liefern.

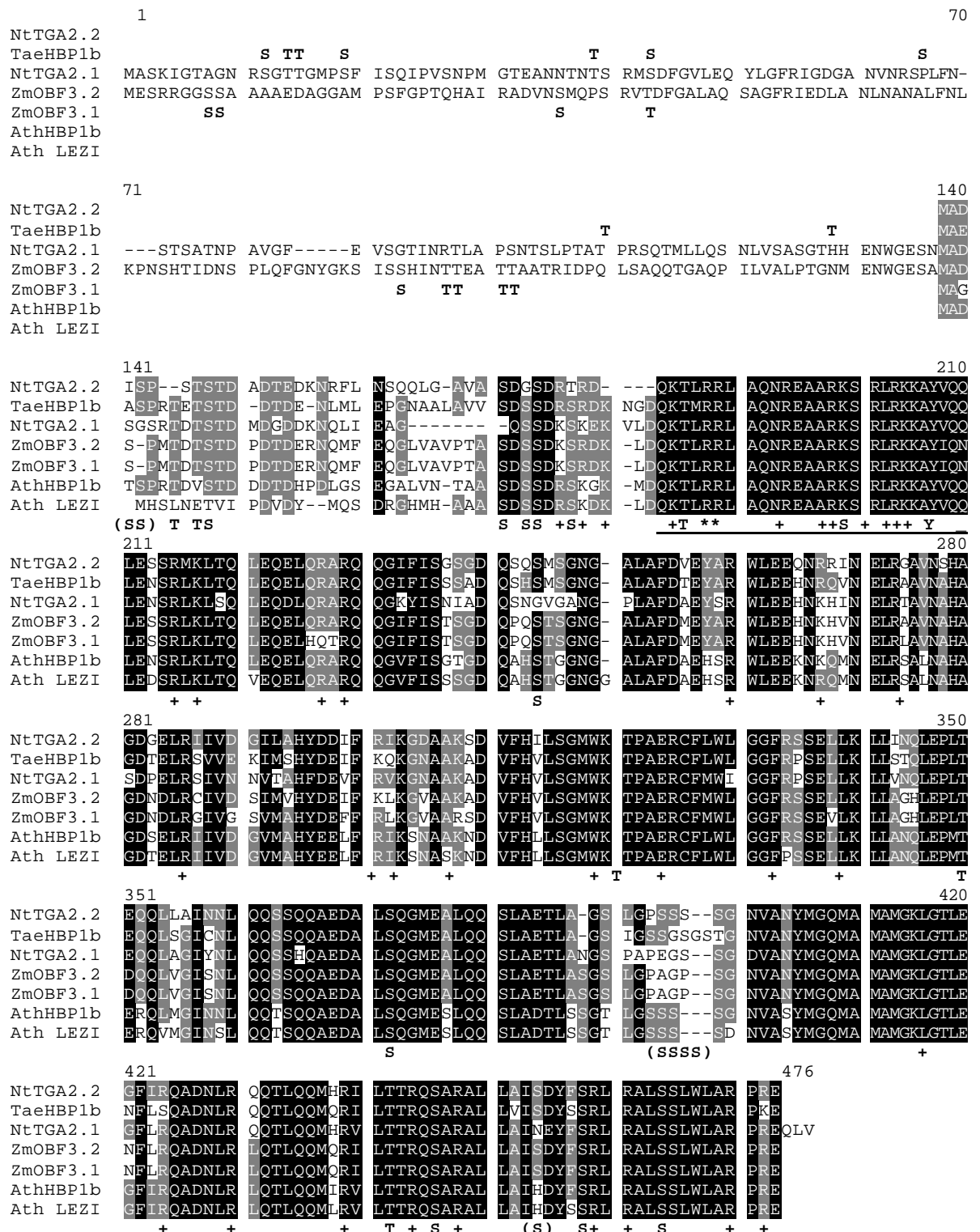


Abbildung 6-4: Alignment von TGA2.1 und TGA2.2 mit weiteren Vertretern der Klasse II-TGA-ähnlichen Faktoren aus verschiedenen Pflanzenspezies. Potentielle Phosphorylierungsstellen sind oberhalb bzw. unterhalb durch die entsprechenden Aminosäurereste gekennzeichnet. Potentielle MAP-Kinase-Interaktionsstelle: ** ; Konservierte saure Aminosäuren: + ; Basische DNA-Bindedomäne: unterstrichen. Acc.No.: TGA2.2 aus *N. tabacum* (AAF06696), HBP1b aus *T. aestivum* (CAA40102), TGA2.1 aus *N. tabacum* (O24160), OBF3.2 und OBF3.1 aus *Z. mays* (S33222 bzw. S33223) und AthHBP1b und AthLEZI aus *A. thaliana* (P43273 bzw. AAC37470).

6.6 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe von Fusionsproteinen zwischen der VP16-Aktivierungsdomäne und TGA2.1 bzw. TGA2.2 die Frage nach der *in-vivo*-Bindungsregulierung des *as-1*-bindenden Komplexes ASF-1 untersucht. Viele der vorgestellten Daten sprechen für eine induzierte Bindung der TGA-Faktoren nach SA-Induktion. Letztendliche Gewissheit über diese Frage könnten Chromatin Immunopräzipitations-Experimente (CHIP) liefern, in denen die TGA-Faktoren mit der DNA quervernetzt, die entsprechenden Promotorabschnitte koimmunopräzipitiert und mittels PCR nachgewiesen werden.

Für das Verständnis der Regulationsmechanismen der *as-1*-vermittelten Genexpression erscheint weiterhin die Identifikation neuer Proteine wichtig, die mit ASF-1 / SARP interagieren. Durch Screening in geeigneten Hefe Hybrid-Systemen (One-Hybrid / Two-Hybrid) könnten wichtige Regulatoren der ASF-1-Aktivität wie der Bindungsinhibitor SAI, ein Protein, das die Konversion von ASF-1 zu ASF-1* katalysiert und u. U. auch der späte Bindungsinhibitor SIBI isoliert werden.

Die hier gelieferten Modellvorstellungen bieten die Möglichkeit, auf diese Weise neu identifizierte Proteine gezielt in funktionellen Studien zu untersuchen.

7 Literatur

- BENFEY, P. N., REN, L., CHUA, N. H. (1989) The CaMV 35S enhancer contains at least two domains which can confer different developmental and tissue-specific expression patterns. *Embo J* 8: 2195-2202
- BENFEY, P. N., REN, L., CHUA, N. H. (1990) Tissue-specific expression from CaMV 35S enhancer subdomains in early stages of plant development. *The-EMBO-journal* 9: 1677-84
- BOOT, K. J. M., VAN DER ZAAL, B. J., VELTEROP, J., QUINT, A., MENNES, A. M., HOOYKAAS, P. J. J., LIBBENGA, K. R. (1993) Further characterization of expression of auxin-induced genes in tobacco (*Nicotiana tabacum*) cell-suspension cultures. *Plant Physiol* 102: 513-520
- BOUCHEZ, D., TOKUHISA, J. G., LLEWELLYN, D. J., DENNIS, E. S., ELLIS, J. G. (1989) The ocs-element is a component of the promoters of several T-DNA and plant viral genes. *The-EMBO-journal* 8: 4197-204
- BRADFORD, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54
- BULLOCK, W. O., FERNANDEZ, J. M., SHORT, J. M. (1987) XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming recA-*Escherichia coli* strain with beta galactosidase selection. *Bio Techniques* 5: 376-379
- CAO, H., BOWLING, S. A., GORDON, A. S., DONG, X. (1994) Characterization of an Arabidopsis mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *Plant Cell* 6: 1583-1592
- CAO, H., GLAZEBROOK, J., CLARKE, J. D., VOLKO, S., DONG, X. (1997) The Arabidopsis NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* 88: 57-63
- CHEN, W., CHAO, G., SINGH, K. B. (1996) The promoter of a H₂O₂-inducible, Arabidopsis glutathione S-transferase gene contains closely linked OBF- and OBP1-binding sites. *Plant J* 10: 955-66
- CHEN, Z., KLESSIG, D. F. (1991) Identification of a soluble salicylic acid-binding protein that may function in signal transduction in the plant disease-resistance response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 8179-8183
- CHUANG, C. F., RUNNING, M. P., WILLIAMS, R. W., MEYEROWITZ, E. M. (1999) The PERIANTHIA gene encodes a bZIP protein involved in the determination of floral organ number in Arabidopsis thaliana. *Genes Dev* 13: 334-44
- CONRATH, U., CHEN, Z., RICIGLIANO, J. W., KLESSIG, D. (1995) Two inducers of plant defense responses, 2,6-dichloroisonicotinic acid and salicylic acid, inhibit catalase activity in tobacco. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 7143-7147

- CONRATH, U., SILVA, H., KLESSIG, D. (1997) Protein dephosphorylation mediates salicylic acid-induced expression of PR-1 genes in tobacco. *Plant J* 11: 747-757
- CUTT, J. R., DIXON, D. C., CARR, J. P., KLESSIG, D. F. (1988) Isolation and nucleotide sequence of cDNA clones for the pathogenesis-related proteins PR1a, PR1b and PR1c of *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc induced by TMV infection. *Nucleic-acids-research* 16: 9861
- CZEKO, A. (2000) Expression von TGA2.2-VP16 und TGA2.2-ENGRAILED in transgenen Tabakpflanzen: Analyse der Expression von TGA2.2-gesteuerten Zielgenen. *Examensarbeit*. Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen
- DANGL, J. L., DIETRICH, R. A., RICHBURG, M. H. (1996) Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* 8: 1793-1807
- DEBLAERE, R., BYTEBIER, B., DE GREVE, H., DEBOECK, F., SCHELL, J., VAN MONTAGU, M., LEEMANS, J. (1985) Efficient octopine Ti-plasmid derived for *Agrobacterium*-mediated gene transfer. *Nucleic Acids Res* 13: 4777-4788
- DELANEY, T. P., UKNES, S., VERNOOIJ, B., FRIEDRICH, L., WEYMANN, K., NEGROTTO, D., GAFFNEY, T., GUT-RELLA, M., KESSMANN, H., WARD, E., RYALS, J. (1994) A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* 266: 1247-1250
- DESPRES, C., DELONG, C., GLAZE, S., LIU, E., FOBERT, P. R. (2000) The Arabidopsis NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors [see comments]. *Plant Cell* 12: 279-90
- DONG, X. (1998) SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Curr Opin Plant Biol* 1: 316-23
- DOWER, W., MILLER, J., RAGSDALE, C. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16: 6127-45
- DRÖGE-LASER, W., KAISER, A., LINDSAY, W. P., HALKIER, B. A., LOAKE, G. J., DOERNER, P., DIXON, R. A., LAMB, C. (1997) Rapid stimulation of a soybean protein-serine kinase that phosphorylates a novel bZIP DNA-binding protein, G/HBF-1, during the induction of early transcription-dependent defenses. *Embo J* 16: 726-38
- DROOG, F., SPEK, A., VAN DER KOOY, A., DE RUYTER, A., HOGE, H., LIBBENGA, K., HOOYKAAS, P., VAN DER ZAAL, B. (1995) Promoter analysis of the auxin-regulated tobacco glutathione S-transferase genes Nt103-1 and Nt103-35. *Plant Mol Biol* 29: 413-29
- DROOG, F. N., HOOYKAAS, P. J., LIBBENGA, K. R., VAN DER ZAAL, E. J. (1993) Proteins encoded by an auxin-regulated gene family of tobacco share limited but significant homology with glutathione S-transferases and one member indeed shows in vitro GST activity. *Plant Mol Biol* 21: 965-72
- DU, H., KLESSIG, D. F. (1997) Identification of a soluble, high-affinity salicylic acid-binding protein in tobacco. *Plant Physiol* 113: 1319-1327

- DURNER, J., KLESSIG, D. F. (1996) Salicylic acid is a modulator of tobacco and mammalian catalases. *The-Journal-of-biological-chemistry* 271: 28492-501
- ELION, E. A. (1998) Routing MAP Kinase cascades. *Science* 281: 1625-1627
- ELLIS, J. G., TOKUHISA, J. G., LLEWELLYN, D. J., BOUCHEZ, D., SINGH, K., DENNIS, E. S., PEACOCK, W. J. (1993) Does the ocs-element occur as a functional component of the promoters of plant genes? *Plant J* 4: 433-43
- FEINBERG, A., VOGELSTEIN, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to. *Anal Biochem* 132: 6-13
- FOURNEY, R., MIYAKOSHI, J., DAY III, R. S., PATERSON, M. C. (1988) Northern Blotting: Efficient RNA staining and transfer. *Focus* 10: 5-7
- FROMM, H., KATAGIRI, F., CHUA, N. H. (1989) An octopine synthase enhancer element directs tissue-specific expression and binds ASF-1, a factor from tobacco nuclear extracts. *Plant Cell* 1: 977-84
- FROMM, H., KATAGIRI, F., CHUA, N. H. (1991) The tobacco transcription activator TGA1a binds to a sequence in the 5' upstream region of a gene encoding a TGA1a-related protein. *Mol Gen Genet* 229: 181-8
- GAFFNEY, T., FRIEDRICH, L., VERNOOIJ, B., NEGROTTO, D., NYE, G., UKNES, S., WARD, E., KESSMANN, H., RYALS, J. (1993) Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261: 754-756
- GATZ, C., KAISER, A., WENDENBURG, R. (1991) Regulation of a modified CaMV 35S promoter by the Tn10-encoded Tet repressor in transgenic tobacco. *Mol Gen Genet* 227: 229-37
- GATZ, C., FROHBERG, C., WENDENBURG, R. (1992) Stringent repression and homogeneous de-repression by tetracycline of a modified CaMV 35S promoter in intact transgenic tobacco plants. *Plant J* 2: 397-404
- GÖRLACH, J., VOLRATH, S., KNAUF BEITER, G., HENGY, G., BECKHOVE, U., KOGEL, K. H., OOSTENDORP, M., STAUB, T., WARD, E., KESSMANN, H., RYALS, J. (1996) Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell* 8: 629-43
- HAMMOND-KOSACK, K. E., JONES, J. D. G. (1996) Resistance gene-dependent plant defense response. *Plant Cell* 8: 1773-1791
- HANAHAH, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-80
- HEEMSKERK, J., DINARDO, S., KOSTRIKEN, R., O'FAARRELL, P. H. (1991) Multiple modes of Engrailed regulation in the progression towards cell fate determination. *Nature* 352: 404-410

- HORSCH, R. B., FRY, J. E., HOFFMANN, D., EICHHOLTZ, D., ROGERS, S. G., FRALEY, R. T. (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229-1231
- HORVATH, D. M., CHUA, N. H. (1996) Identification of an immediate-early salicylic acid-inducible tobacco gene and characterization of induction by other compounds. *Plant Mol Biol* 31: 1061-72
- HORVATH, D. M., HUANG, D. J., CHUA, N. H. (1998) Four classes of salicylate-induced tobacco genes. *Mol Plant Microbe Interact* 11: 895-905
- INOUE, H., NOJIMA, H., OKAYAMA, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-8
- ISH-HORROWICZ, D., BURKE, J. F. (1981) Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res* 9: 2989-2998
- JOHNSON, C., GLOVER, G., ARIAS, J. (2001) Regulation of DNA Binding and trans-Activation by a Xenobiotic Stress-activated Plant Transcription Factor. *J Biol Chem* 276: 172-178
- JUPIN, I., CHUA, N. H. (1996) Activation of the CaMV *as-1 cis*-element by salicylic acid: differential DNA-binding of a factor related to TGA1a. *Embo J* 15: 5679-5689
- KATAGIRI, F., LAM, E., CHUA, N. H. (1989) Two tobacco DNA-binding proteins with homology to the nuclear factor CREB. *Nature* 340: 727-30
- KATAGIRI, F., SEIPEL, K., CHUA, N. H. (1992) Identification of a novel dimer stabilization region in a plant bZIP transcription activator. *Mol Cell Biol* 12: 4809-16
- KAWATA, T., IMADA, T., SHIRAIISHI, H., OKADA, K., SHIMURA, Y., IVABUCHI, M. (1992) A DNA clone encoding an HBP-1b homologue in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res* 20: 1141-1147
- KINKEMA, M., WEIHUA, F., DONG, X. (2000) Nuclear localization of NPR1 is required for activation of *PR* gene expression. *Plant Cell* 12: 2339-2350
- KLESSIG, D. F., MALAMY, J. (1994) The salicylic acid signal in plants. *Plant-molecular-biology* 26: 1439-58
- KÖSTER-TÖPFER, M., FROMMER, W. B., ROCHA SOSA, M., ROSAHL, S., SCHELL, J., WILLMITZER, L. (1989) A class II patatin promoter is under developmental control in both transgenic potato and tobacco plants. *Molecular-and-general-genetics* 219: 390-6
- KOZAK, M. (1989) The scanning model for translation: an update. *The-Journal-of-cell-biology* 108: 229-41
- KRAWCZYK, S. (1999) Charakterisierung der DNA-Bindungseigenschaften des pflanzlichen bZIP-Transkriptionsfaktors TGA2.1 aus *Nicotiana tabacum*. *Diplomarbeit*. Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen

- KUMAR, D., KLESSIG, D. F. (2000) Differential induction of tobacco MAP kinases by the defense signals nitric oxide, salicylic acid, ethylene, and jasmonic acid. *MPMI* 13: 347-351
- KYHSE-ANDERSEN, J. (1984) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* 10: 203-209
- LAEMMLI, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- LAM, E., KATAGIRI, F., CHUA, N. H. (1990) Plant nuclear factor ASF-1 binds to an essential region of the nopaline synthase promoter. *J Biol Chem* 265: 9909-13
- LAM, E., LAM, Y. K. (1995) Binding site requirements and differential representation of TGF factors in nuclear ASF-1 activity. *Nucleic Acids Res* 23: 3778-85
- LANDSCHULZ, W. H., JOHNSON, P. F., MCKNIGHT, S. L. (1988) The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240: 1759-64
- LAWTON, K. A., FRIEDRICH, L., HUNT, M., WEYMANN, K., DELANEY, T., KESSMANN, H., STAUB, T., RYALS, J. (1996) Benzothiadiazole induces disease resistance in Arabidopsis by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *Plant J* 10: 71-82
- LEBEL, E., HEIFETZ, P., THORNE, L., UKNES, S., RYALS, J., WARD, E. (1998) Functional analysis of regulatory sequences controlling PR-1 gene expression in Arabidopsis. *The Plant Journal* 16: 223-233
- MALAMY, J., CARR, J., KLESSIG, D. F., RASKIN, I. (1990) Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* 250: 1002-1004
- MALAMY, J., HENNIG, J., KLESSIG, D. F. (1992) Temperature dependent induction of salicylic acid and its conjugates during the resistance response to tobacco mosaic virus infection. *Plant Cell* 4
- MALECK, K., LEVINE, A., EULGEM, T., MORGAN, A., SCHMID, J., LAWTON, K. A., DANGL, J. L., DIETRICH, R. A. (2000) The transcriptome of Arabidopsis thaliana during systemic acquired resistance. *Nat Genet* 26: 403-10
- MARCHUK, D., DRUMM, M., SAULINO, A., COLLINS, F. S. (1990) Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res* 19: 1154
- MIAO, Z. H., LIU, X., LAM, E. (1994) TGA3 is a distinct member of the TGA family of bZIP transcription factors in Arabidopsis thaliana. *Plant Mol Biol* 25: 1-11
- MIAO, Z. H., LAM, E. (1995) Construction of a trans-dominant inhibitor for members of the TGA family of transcription factors conserved in higher plants. *Plant J* 7: 887-96

- MIZOGUCHI, T., HAYASHIDA, N., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., KAMADA, H., SHINOZAKI, K. (1995) Two genes that encode ribosomal protein S6-kinase homologs are induced by cold or salinity stress in *Arabidopsis thaliana*. *Febs Letters* 358: 199-204
- MIZOGUCHI, T., IRIE, K., HIRAYAMA, T., HAYASHIDA, N., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., MATSUMOTA, K., SHINOZAKI, K. (1996) A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 765-769
- MULLIS, K. B., FALOONA, F. A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350
- NEUHAUS, G., NEUHAUS-URL, G., KATAGIRI, F., SEIPEL, K., CHUA, N. H. (1994) Tissue-specific expression of *as-1* in transgenic tobacco. *Plant Cell* 6: 827-834
- NIGGEWEG, R., GATZ, C. (1997) Isolation of TGA2.1 (Accession No. U90214), a member of a new subclass of the TGA-family of bZIP-transcription-factors in *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiol* 113: 1464
- NIGGEWEG, R. (1999) Salizylsäure- und Auxin-induzierte Genexpression in *Nicotiana tabacum*: Funktionelle Bedeutung der TGA-Faktoren der Subklasse II. *Doktorarbeit*. Universität Bielefeld, Bielefeld
- NIGGEWEG, R., THUROW, C., KEGLER, C., GATZ, C. (2000a) Tobacco transcription factor TGA2.2 is the main component of *as-1*-binding factor ASF-1 and is involved in salicylic acid- and auxin-inducible expression of *as-1*-containing target promoters. *J Biol Chem* 275: 19897-905
- NIGGEWEG, R., THUROW, C., WEIGEL, R., PFITZNER, U., GATZ, C. (2000b) Tobacco TGA factors differ with respect to interaction with NPR1, activation potential and DNA-binding properties. *Plant Mol Biol* 42: 775-88
- ODELL, J. T., NAGY, F., CHUA, N. H. (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313: 810-2
- OLMSTED, J. B. (1981) Affinity purification of antibodies from diazotized paper blots of heterogeneous protein samples. *J Biol Chem* 256: 11955-11957
- PASCUZZI, P., HAMILTON, D., BODILY, K., ARIAS, J. (1998) Auxin-induced stress potentiates trans-activation by a conserved plant basic/leucine-zipper factor. *J Biol Chem* 273: 26631-7
- PERLMAN, D., CHIKARMANE, H., HALVORSON, H. (1987) Improved resolution of DNA fragments in polysaccharide-supplemented. *Anal Biochem* 163: 247-54
- PETERSON, M., BRODERSEN, P., NAESTED, H., ANDREASSON, E., LINDHART, U., JOHANSEN, B., NIELSEN, H. B., LACY, M., AUSTIN, M. J., PARKER, J. E., SHARMA, S. B., KLESSIG, D. F., MARTIENSSON, R., MATTSSON, O., JENSEN, A. B., MUNDY, J. (2000) *Arabidopsis* MAP Kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* 103: 1111-1120

- POOLE, S. J., KAUVAR, L. M., DREES, B., KORNBERG, T. (1985) The engrailed locus of *Drosophila*: structural analysis of an embryonic transcript. *Cell* 40: 37-43
- PRAT, S., WILLMITZER, L., SÁNCHEZ-SERRANO, J. J. (1989) Nuclear proteins binding to a cauliflower mosaic virus 35S truncated promoter. *Mol. Gen. Genet.* 217: 209-214
- QIN, X. F., HOLUIGUE, L., HORVATH, D. M., CHUA, N. H. (1994) Immediate early transcription activation by salicylic acid via the cauliflower mosaic virus as-1 element. *Plant Cell* 6: 863-74
- RIEPING, M., FRITZ, M., PRAT, S., GATZ, C. (1994) A dominant negative mutant of PG13 suppresses transcription from a cauliflower mosaic virus 35S truncated promoter in transgenic tobacco plants. *Plant Cell* 6: 1087-98
- ROMEIS, T., PIEDRAS, P., ZHANG, S., KLESSIG, D. F., HIRT, H., JONES, J. D. (1999) Rapid Avr9- and Cf9 -dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. *The-Plant-cell* 11: 273-87
- ROSS, A. F. (1961) Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology* 14: 340-358
- ROXAS, V. P., LODHI, S. A., GARRETT, D. K., MAHAN, J. R., ALLEN, R. D. (2000) Stress tolerance in transgenic tobacco seedlings that overexpress glutathione S-transferase/glutathione peroxidase. *Plant Cell Physiol* 4: 1229-1234
- SAKAI, T., TAKAHASHI, Y., NAGATA, T. (1998) The identification of DNA binding factors specific for as-1-like sequences in auxin-responsive regions of parA, parB and parC. *Plant Cell Physiol* 39: 731-9
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, New York, USA
- SCHENK, P. M., KAZAN, K., WILSON, I., ANDERSON, J. P., RICHMOND, T., SOMERVILLE, S. C., MANNERS, J. M. (2000) Coordinated plant defense responses in arabidopsis revealed by microarray analysis [In Process Citation]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 11655-60
- SCHINDLER, U., BECKMANN, H., CASHMORE, A. R. (1992) TGA1 and G-box binding factors: two distinct classes of Arabidopsis leucine zipper proteins compete for the G-box-like element TGACGTGG. *Plant Cell* 4: 1309-1319
- SERRANO, N., MASCHAT, F. (1998) Molecular mechanism of *polyhomeotic* activation by Engrailed. *Embo J* 17: 3704-3713
- SHAH, J., KACHROO, P., KLESSIG, D. F. (1999) The Arabidopsis *ss11* mutation restores pathogenesis-related gene expression in *npr1* plants and renders defensin gene expression salicylic acid dependent. *Plant Cell* 11: 191-206
- STANGE, C., RAMIREZ, I., GOMEZ, I., JORDANA, X., HOLUIGUE, L. (1997) Phosphorylation of nuclear proteins directs binding to salicylic acid-responsive elements. *Plant J* 11: 1315-24

- STRATHMANN, A. (1999) Identifizierung von Protein-Interaktionspartnern des bZIP-Transkriptionsfaktors G/HBF-1 mit Hilfe des Hefe-"Two-Hybrid"-Systems. *Diplomarbeit*. Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen
- STROMPEN, G., GRUNER, R., PFITZNER, U. M. (1998) An *as-1*-like motif controls the level of expression of the gene for the pathogenesis-related protein 1a from tobacco. *Plant-molecular-biology* 37: 871-83
- TAKAHASHI, Y., KURODA, H., TANAKA, T., MACHIDA, Y., TAKEBE, I., NAGATA, T. (1989) Isolation of an auxin-regulated gene cDNA expressed during the transition from G0 to S phase in tobacco mesophyll protoplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 9279-83
- TAKAHASHI, Y., NIWA, Y., MACHIDA, Y., NAGATA, T. (1990) Location of the cis-acting auxin-responsive region in the promoter of the *par* gene from tobacco mesophyll protoplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 8013-6
- TAKAHASHI, Y., HASEZAWA, S., KUSABA, M., NAGATA, T. (1995a) Expression of the auxin-regulated *parA* gene in transgenic tobacco and nuclear localization of its gene products. *Planta* 196: 111-7
- TAKAHASHI, Y., SAKAI, T., ISHIDA, S., NAGATA, T. (1995b) Identification of auxin-responsive elements of *parB* and their expression in apices of shoot and root. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 6359-63
- TANOUE, T., ADACHI, M., MORIGUCHI, T., NISHIDA, E. (2000) A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nature Cell Biology* 2: 110-116
- UKNES, S., DINCHER, S., FRIEDRICH, L., NEGROTTO, D., WILLIAMS, S., THOMPSON TAYLOR, H., POTTER, S., WARD, E., RYALS, J. (1993) Regulation of pathogenesis-related protein-1a gene expression in tobacco. *Plant Cell* 5: 159-69
- ULMASOV, T., HAGEN, G., GUILFOYLE, T. (1994) The *ocs* element in the soybean GH2/4 promoter is activated by both active and inactive auxin and salicylic acid analogues. *Plant Mol Biol* 26: 1055-64
- VAN DER ZAAL, B. J., DROOG, F. N., PIETERSE, F. J., HOOYKAAS, P. J. (1996) Auxin-sensitive elements from promoters of tobacco GST genes and a consensus *as-1*-like element differ only in relative strength. *Plant Physiol* 110: 79-88
- VAN DER ZAAL, E. J., MEMELINK, J., MENNES, A. M., QUINT, A., LIBBENGA, K. R. (1987) Auxin-induced mRNA species in tobacco cell cultures. *Plant Mol Biol* 10: 145-157
- VAN DER ZAAL, E. J., DROOG, F. N., BOOT, C. J., HENSGENS, L. A., HOGE, J. H., SCHILPEROORT, R. A., LIBBENGA, K. R. (1991) Promoters of auxin-induced genes from tobacco can lead to auxin-inducible and root tip-specific expression. *Plant Mol Biol* 16: 983-98
- VINSON, C. R., SIGLER, P. B., MCKNIGHT, S. L. (1989) Scissors grip model for DNA recognition by a family of zipper proteins. *Science* 246: 911-916

- WEINMANN, P., GOSSEN, M., HILLEN, W., BUJARD, H., GATZ, C. (1994) A chimeric transactivator allows tetracycline-responsive gene expression in whole plants. *Plant J* 5: 559-69
- WENDEHENNE, D., DURNER, J., CHEN, Z., KLESSIG, D. (1998) Benzothiadiazole, an inducer of plant defenses, inhibits catalase and ascorbate peroxidase. *Phytochemistry* 47: 651-657
- WESSEL, D., FLÜGGE, U. I. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* 138: 141-3
- XIANG, C., MIAO, Z. H., LAM, E. (1996) Coordinated activation of as-1-type elements and a tobacco glutathione S-transferase gene by auxins, salicylic acid, methyl-jasmonate and hydrogen peroxide. *Plant Mol Biol* 32: 415-26
- XIANG, C., MIAO, Z., LAM, E. (1997) DNA-binding properties, genomic organization and expression pattern of TGA6, a new member of the TGA family of bZIP transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 34: 403-15
- YANISCH-PERRON, C., VIEIRA, J., MESSING, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp 18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119
- ZHANG, B., FOLEY, R. C., SINGH, K. B. (1993) Isolation and characterization of two related *Arabidopsis ocs*-element bZIP binding proteins. *Plant J* 4: 711-6
- ZHANG, B., SINGH, K. B. (1994) *ocs* element promoter sequences are activated by auxin and salicylic acid in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 2507-2511
- ZHANG, S., KLESSIG, D. F. (1997) Salicylic acid activates a 48 kD MAP kinase in tobacco. *Plant Cell* 9: 809-824
- ZHANG, S., DU, H., KLESSIG, D. F. (1998) Activation of the tobacco SIP kinase by both a cell wall-derived carbohydrate elicitor and purified proteinaceous elicitors from *Phytophthora* spp. *Plant Cell* 10: 435-50
- ZHANG, S., KLESSIG, D. F. (1998) The tobacco wounding-activated mitogen-activated protein kinase is encoded by *SIPK*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 7225-7230
- ZHANG, Y., FAN, W., KINKEMA, M., LI, X., DONG, X. (1999) Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the PR-1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 6523-8
- ZHOU, J. M., TRIFA, Y., SILVA, H., PONTIER, D., LAM, E., SHAH, J., KLESSIG, D. F. (2000) NPR1 differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the PR-1 gene required for induction by salicylic acid. *Mol Plant Microbe Interact* 13: 191-202

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
2.1	TGA2.1 aus <i>N. tabacum</i>
2.2	TGA2.2 aus <i>N. tabacum</i>
³² P	Phosphorisotop der relativen Masse 32
35S	35S Promotor aus Cauliflower Mosaic Virus
³⁵ S	Schwefelisotop der relativen Masse 35
6-BAP	6-Benzylaminopurin
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Amp ^r	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
<i>as-1</i>	Activating sequence 1
<i>as-103</i>	<i>as-1</i> -ähnliches Element des <i>Nt103</i> -Promotors aus <i>N. tabacum</i>
ASF-1	Activating sequence factor 1
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
bZIP	basische Region / Leucin-Zipper-Domäne
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus (Blumenkohlmosaikvirus)
cDNA	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
CHX	Cycloheximid
C-Terminus / terminal	Carboxy-Terminus / terminal
CTP	Cytidintriphosphat
cv.	Kultivar
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddT	Didesoxythymidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTPs	Desoxyribonucleotidtriphosphate
ds	Double stranded (doppelsträngig)
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylenediamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMSA	Electromobility shift assay
ENG	ENGRAILED-Silencerdomäne aus <i>D. melanogaster</i>

<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
g	Erdbeschleunigung
GST	Glutathion <i>S</i> -Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
GUS	β -Glucuronidase
HEC	Hydroxyethyl-Cellulose
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]-piperazin-N'-[2-Ethansulfonsäure]
HR	Hypersensitive response
HSP	Heringsperma-DNA
INA	2,6-Dichloroisonicotinsäure
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
JA	Jasmonic acid (Jasmonsäure)
Kam ^r	Kanamycin-Resistenz
kb	kilo Basenpaare
LB	Luria Bertani
MAP	Mitogen activated protein
mcs	Multiple cloning site
MOPS	3-N-Morpholino-Propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotina tabacum</i>
NAA	α -Naphthalinessigsäure
NPR1	Nonexpresser of <i>PR</i> genes 1
nt	Nucleotid(e)
N-Terminus / terminal	Amino-Terminus / terminal
pA	Polyadenylierungssignal
PAA	Polyacrylamid
<i>pas-a</i>	<i>as-1</i> -ähnliches Element aus <i>parA</i> -Promotor aus <i>N. tabacum</i>
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglycol
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluoride
PR	Pathogenesis related
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
ROS	Reactive oxygen species (Reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SA	Salicylsäure
SABP(2)	Salicylic acid binding protein(2)
SAI	Salicylic acid inhibitor
SAR	Systemic acquired resistance
SARP	Salicylic acid response protein
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunden
SIPK	Salicylic acid induced protein kinase
SNN	Samsun NN, Tabakkultivar
SSC	Standard Saline Citrat Puffer

<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tc	Tetracyclin
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'- Tetramethylethyldiamin
TetR	Tetracyclin Repressor von <i>Tn10</i>
T_m	Schmelztemperatur
TMV	Tabak Mosaic Virus
Tris	Tris-(hydroxymethyl-) aminomethan
U	definierte Einheit der Enzymaktivität (unit)
u. a.	unter anderem
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolettes Licht
v/v	Volume per volume (Volumenprozent)
Vol.	Volumen
VP16	Virales Protein 16 aus <i>Herpes simplex</i> oder dessen Aktivierungsdomäne
w/v	weight per volume (Gewichtsprozent)
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
z. B.	zum Beispiel
ZIP	Leucin-Zipper-Domäne
α	Antiserum
λ	Bakteriophage Lambda

8.2 Sequenzen verwendeter Nucleinsäuren

Im folgenden sind Sequenzen und Sequenzübergänge wichtiger verwendeter bzw. hergestellter Nucleinsäuren mit für diese Arbeit und zur Orientierung relevanten Restriktionsschnittstellen aufgeführt.

8.2.1 pSK-VP16 (NIGGEWEG, unveröffentlicht)

Restsequenz: pSK

```

      Asp718      Ppu10I XbaI      M T K N N Y G
1  GGTACCTCGC GAATGCATCT AGATTCATAT GACGAAAAAC AATTACGGGT

      S T I E G L L D L P D D D A P E E
51 CTACCATCGA GGGCTGCTC GATCTCCCGG ACGACGACGC CCCCGAAGAG

      A G L A A P R L S F L P A G H T
101 GCGGGGCTGG CGGCTCCGCG CCTGTCCTTT CTCCCCGGCG GACACACGCG

      SalI                      SacI
      R L S T A P P T D V S L G D E L
151 CAGACTGTCG ACGGCCCCC CGACCGATGT CAGCCTGGGG GACGAGCTCC

      H L D G E D V A M A H A D A L D D
201 ACTTAGACGG CGAGGACGTG GCGATGGCGC ATGCCGACGC GCTAGACGAT

      F D L D M L G D G D S P G P G F
      SmaI
251 TTCGATCTGG ACATGTTGGG GGACGGGGAT TCCCCGGGTC CGGGATTTAC

      P H D S A P Y G A L D M A D F E
301 CCCCACGAC TCCGCCCCCT ACGGCGCTCT GGATATGGCC GACTTCGAGT

      F E Q M F T D A L G I D E Y G G -
351 TTGACGAGAT GTTTACCGAT GCCCTTGAA TTGACGAGTA CGGTGGGTAG

      BamHI
401 GGGGCGCGAG GATCCAGACA TGATAAGATA CATTGATGAG TTTGGACAAA

      BamHI SmaI      SalI PstI SmaI
451 CCACAACACTAG AATGCAAATC GGATCCCGGG CCCGTCTGACT GCAGCCCCGGG

      BamHI      XbaI NotI      SacI
501 GGATCCACTA GTCTTAGAGC GGCCGCCACC GCGGTGGAGC TC

```

8.2.2 pENGRAILED (WERR, unveröffentlicht)

Restsequenz: pUC

```

                                PstI
1  GGC GCGCCAG CTTGCATGCC TGCAGGTCAA CATGGTGGAG CACGACACTC
51 TCGTCTACTC CAAGAATATC AAAGATACAG TCTCAGAAGA CCAGAGGGCT
101 ATTGAGACTT TTCAACAAAG GGTAATATCG GGAAACCTCC TCGGATTCCA
151 TTGCCCAGCT ATCTGTCACT TCATCGAAAG GACAGTAGAA AAGGAAGATG
201 GCTTCTACAA ATGCCATCAT TGCGATAAAG GAAAGGCTAT CGTTC AAGAA
251 TGCCTCTACC GACAGTGGTC CCAAAGATGG ACCCCACCC ACGAGGAACA
301 TCGTGGAAAA AGAAGACGTT CCAACCACGT CTTCAAAGCA AGTGGATTGA

                                EcoRV
351 TGTGATATCT CCACTGACGT AAGGGATGAC GCACAATCCC ACTATCCTTC
401 GCAAGACCCT TCCTCTATAT AAGGAAGTTC ATTTTCATTTG GAGAGGACCT

                                XhoI
451 CGAGAGCCTTT ATTTTTACAA CAATTACCAA CAATAACAAA CAACAAACAA
501 CATTACAATT ACTATTTTACA ATTACAGTCG AGCGGCCTTA AGCGAGTTGC

                                PstI
                                M A L E D R C S P
551 GATTTAGCAT CAAGTCGAAA CCAATGGCCC TGGAGGATCG CTGCAGCCCA

                                Q S A P S P I T L Q M Q H L H H Q
601 CAGTCAGCGC CCAGCCCCAT TACCCTACAA ATGCAGCATC TTCACCACCA

                                Q Q Q Q Q Q Q Q Q M Q H L H Q
651 GCAACAGCAG CAGCAGCAAC AGCAGCAGCA AATGCAGCAC CTCCACCAGC

                                PstI PstI
701 TGCAGCAACT GCAGCAGTG CACCAACAGC AACTGGCCG CCGTGTCTTC

                                PstI PstI
751 H H P A M A F D A A A A A A A A A A
CACCATCCGG CAATGGCCTT CGATGCCGCT GCAGCCGCG CTGCTGCAGC

                                PstI
801 A A A A A H A H A A A L Q Q R L
TGCTGTGCG GCCGCCACG CTCATGTCTG TGCACTGCAG CAGCGCCTCA

                                S G S G S P A S C S T P A S S T P
851 GTGGCAGTGG ATCGCCGCA TCCTGTCTCA CGCCCGCCTC GTCCACGCCG

                                L T I K E E E S D S V I G D M S F
901 CTGACCATCA AGGAGGAGGA AAGCGACTCC GTGATCGGTG ACATGAGTTT

                                H N Q T H T T N E E E E A E E D
951 CCACAATCAG ACGCACACCA CCAACGAGGA GGAGGAGGCG GAGGAGGATG

                                D D I D V D V D D T S A G G R L P
1001 ACGACATTGA TGTGGATGTG GATGATACGT CGGCGGGCGG ACGCCTGCCA

                                SalI
1051 P P A H Q Q Q S T A K P S L A F S
CCACCCGCCC ACCAGCAGCA GTCGACGGCC AAGCCCTCGC TGGCCTTTTC

                                I S N I L S D R F G D V Q K P G
1101 CATCTCCAAC ATCCTGAGCG ATCGTTTCGG AGATGTCCAG AAGCCTGGCA

                                K S I E N Q A S I F R P F E A N R
1151 AGTCGATTGA GAACCAGGCC AGCATATTCC GCCCCTTCGA GGCGAATCGC

                                S Q T A T P S A F T R V D L L E F
1201 TCCCAGACTG CCACGCCCTC CGCCTTTACA AGAGTGGATC TGCTGGAGTT

```

```

      S R Q Q Q A A A A A A T A A M M
1251 TAGCCGGCAA CAGCAAGCTG CCGCCGAGC CGCTACTGCG GCCATGATGC

      L E R A N F L N C F N P A A Y P R
1301 TGGAACGGGC CAACTTCCTT AACTGCTTCA ATCCGGCTGC CTATCCCAGG

      I H E E I V Q S R L R R S A A N A
1351 ATACACGAGG AAATCGTGCA GAGTCGCCTG CGCAGGAGTG CAGCCAATGC

      SacI
      V I P P P M S S K M S D A N P E
1401 CGTCATCCCG CCGCCCATGA GCTCCAAGAT GAGCGATGCC AATCCAGAGA

      BamHI XbaI
      K S A L G S S R V R K S P V S L Y
1451 AATCTGCTCT GGATCCTCT AGAGTCCGCA AATCACCAGT CTCTCTCTAC

      K S I S L Y F L Q N N V -
1501 AAATCTATCT CTCTCTATTT TCTCCAGAAT AATGTGTGAG TAGTTCACAG
1551 ATAAGGGAAT TAGGGTTCTT ATAGGGTTTC GCTCATGTGT TGAGCATATA
1601 AGAAACCTT AGTATGTATT TGTATTTGTA AAATACTTCT ATCAATAAAA

      PstI
1651 TTTCTAATTC CTAAAACCAA AATCCAGTGA CCTGCAGGCA TGCAAGCTGG
1701 CGCGCC

```

8.2.3 pKVPL

Restsequenz: pUC57

```

      EcoRI      Asp718 M T K N N Y G
1 GAATTCGAGC TCGGTACCAT GACGAAAAAC AATTACGGGT//---VP16--

      L G I D E Y G G G G G S
-----//CTCGGAATG ACGAGTACGG TGGGGGAGGA GGTGGTTCAG

      BamHI
      G G G G S PstI StuI HindIII
404 GTGGAGGTGG ATCCCGGGCC CGTCGACTGC AGAGGCCTGC ATGCAAGCTT

```

8.2.4 pKENGL

Restsequenz: pUC57

```

      EcoRI      Asp718      Ppu10I XbaI      Asp718      M NcoI
1 GAATTCGAGC TCGGTACCTC GCGAATGCAT CTAGATTGGT ACCAACCATG

      A L E D R C S
51 GCCCTGGAGG ATCGCTGCAGC//-----ENGRAILED-----//

      K M S D A N P E K S A L G S G G G
901 AGATGAGCGA TGCCAACCCA GAGAAATCTG CTCTGGGATC AGGAGGAGGT

      BamHI
      G S G G G S BamHI SmaI
951 GGTTCAGGTG GAGGTGGATC CAATCGGATC CCGGGCCCGT CGACTGCAGA

      StuI SphI HindIII
1001 GGCCTGCATG CAAGCTT

```

8.2.5 pK2.1L

Restsequenz: pUC57

```

      EcoRI      Asp718      M A S K I G T A G N R S G
1  GAATTCGAGC TCGGTACCAA CCATGGCTAG TAAGATTGGT ACAGCAGGCA ATAGAAGTGG

      R A L S S L W L A R P R E
//-----TGA2.1-----//CGAGCTCT CAGCTCTCTC TGGCTTGCCA GACCACGAGA

      BamHI
      Q L V G G G G S G G G G S      BamHI SmaI SalI
1381 GCAGTTAGTA GGAGGAGGTG GTTTCAGGTGG AGGTGGATCC AATCGGATCC CGGGCCCCGTC

      PstI StuI SphI HindIII
1441 GACTGCAGAG GCCTGCATGC AAGCTT

```

8.2.6 pK2.2L

Restsequenz: pSK

```

      EcoRV
      Asp718      M A D I S P S
1  GGTACCAACC ATGGCTGATA TCAGTCCTAG//-----TGA2.2-----

      SmaI
      L W L A R P R E G G G G S
-----//TCTCTGGCTT GCTCGCCCC GGAAGGAGG AGGAGGTTCA

      BamHI
      G G G G S SpeI XbaI NotI SacII
1001 GGTGGTGGTG GATCCACTAG TTCTAGAGCG GCCGCCACCG CGG

```

8.2.7 pLVPs

Restsequenz: pUC57

```

      BamHI
      EcoRI SmaI Asp718 Ppu10I XbaI G S G G
1  GAATTCGAGC TCGGTACCTC GCGAATGCAT CTAGATAGGA TCCGGAGGAG

      G G S I H M T K N N
51 GTGGTTCAAT TCATATGACG AAAAACAAT//-----VP16-----

      SunI
      G I D E Y G G R T W S H P Q F E
--//GGAATTGA CGAGTACGGT GGGCGTACGT GGAGTCATCC GCAGTTCGAA

      K - BamHI SmaI SalI PstI HindIII
461 AAGTAGGATC CCGGCCCCGT CGACTGCAGA GGCCTGCATG CAAGCTT

```

8.2.8 pLENGs

Restsequenz: pUC57

```

                                     BamHI
      EcoRI      Asp718      Ppu10I      G S G G
1  GAATTCGAGC TCGGTACCTC NTNAATGCAT CTACATTGGA TCCGGAGGAG

      G G S M A L E D R C S
51 GTGGTTCAAT GGCCCTGGAG GATCGCTGCA GC//---ENGRAILED-----

                                     A N P E K S A L G
901 -----//TGCCAATCC AGAGAAATCT GCTCTGGGAT

      SunI
      S R T W S H P Q F E K - BamHI SmaI
951 CACGTACGTG GAGTCATCCG CAGTTCGAAA AGTAGGATCC CGGGCCCGTC

                                     SphI
1001 GACTGCAGAG GCCTGCATGC AAGCTT

```

8.2.9 pL2.1s

Restsequenz: pUC57

```

                                     BamHI
      EcoRI      Asp718      G S G G
1  GAATTCGAGC TCGGTACCTC GCGAATGCAT CTAGATAGGA TCCGGAGGTG

      G G S M A S K I G T
51 GTGGTTCTAT GGCTAGTAAG ATTGGTACA//-----TGA2.1-----//

                                     SunI
1401 L A R P R E Q L V R T W S H P Q F
      TTGCCAGACC ACGAGAGCAG TTAGTACGTA CGTGGAGTCA TCCGCAGTTC

      E K - BamHI SmaI Sali PstI StuI SphI
1451 GAAAAGTAGG ATCCCGGGCC CGTCGACTGC AGAGGCCTGC ATGCAAGCTT

```

8.2.10 pUC57 2.1-57s

Restvektor: pUC57

```

      EcoRI      Asp718      M S A S G T H H E
1  GAATTCGAGC TCGGTACCAA CCATGTCAGC ATCAGGCACT CATCATGAGA

                                     W L A R P R E Q L V
      //-----TGA2.1-----//TGGCTTGCC AGACCACGAG AGCAGTTAGT

      SunI
      R T W S H P Q F E K - BamHI SmaI Sali
1051 ACGTACGTGG AGTCATCCGC AGTTCGAAAA GTAGGATCCC GGGCCCGTCG

      PstI StuI SphI
1101 ACTGCAGAGG CCTGCATGC

```

8.2.11 pUC57 parA

Restvektor: pUC57

```

          SacI  Asp718          Ppu10I XbaI  EcoRV  M  E  S
1  GAATTCGAGC TCGGTACCTC GCGAATGCAT CTAGATGATA TCATGGAGAG
                                     HindIII
      N  N  V  V                               K  H  K  L  G  L
CAACAACGTG GTT//-----parA-----//AAGCACAAG CTGGTCTTG

A  -                                           BamHI SmaI
701 CTTGAACAAG AAACACTTCT TACCTAAGAT CTATCGGATC CCGGCCCCGT

          Sali PstI  StuI  SphI HindIII
751 CACTGCAGA GGCCTGCATG CAAGCTT

```

Danksagung

Allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich herzlich danken:

Frau Prof. Dr. C. Gatz danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, ihre Diskussionsbereitschaft und die hilfreichen Anregungen.

Herrn PD Dr. G. Hinz, der sich freundlicherweise bereiterklärt hat, das Korreferat zu übernehmen, möchte ich ebenfalls danken.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Gatz ein herzliches Dankeschön für das gute Miteinander der letzten Jahre. Der ständig wechselnden Besetzung von Raum 338 gilt ein besonderer Dank:

An erster Stelle den beiden „Felsen in der Brandung“: Carsten und Andreas, für die ausgezeichnete Zusammenarbeit, Verlässlichkeit, Hilfs- und Diskussionsbereitschaft über die gesamte Zeit hinweg, und für die belebende Atmosphäre, die Ihr verbreitet habt, indem Ihr mich immer wieder mit neuen, sorgfältig ausgewählten Tonträgern aus Eurer Sammlung überrascht habt, die den Arbeitsalltag nie langweilig werden ließen.

Alex T., die mir besonders zu Anfang der Promotionszeit sehr geholfen hat, Ricarda, ohne die es dieses Thema ja gar nicht gegeben hätte, Alex F. für ihre exzellente Unterstützung, Carmen, Alex und Anke für ihre Geduld und die freundschaftliche Zusammenarbeit, und nicht zuletzt Annette für ihre Hilfe in der Endphase meiner Laborarbeit.

Auch Wolfgang und seinem Team sei herzlich gedankt, dass Ihr die alltäglichen Freuden und Sorgen mit mir geteilt habt.

All meinen Freunden ein besonderer Dank, für die schöne Zeit neben der Arbeit: Steffi und Thorsten, Alex und Markus, Anke und Thomas. Ich konnte mich immer auf Euch verlassen. Danke auch meiner ganzen Familie, die zu jeder auch noch so schweren und turbulenten Zeit hinter mir gestanden hat. Ein besonderer Dank gilt meiner Mutter, die sicher stolz auf mich wäre.

Mein allergrößter Dank aber gilt Andrea und Frederik, die mein Leben unendlich bereichern, und mich – jeder nach seinen Fähigkeiten – unterstützen. Auch wenn, oder *gerade weil* Ihr nicht immer ein „ruhender Pol“ seid, könnte ich mir mein Leben ohne Euch nicht mehr vorstellen. Danke.

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass die Dissertation mit dem Thema

„Analyse der *in-vivo* Funktion der Transkriptionsfaktoren TGA2.1 und TGA2.2 aus Tabak nach Fusion mit einer konstitutiven Aktivierungsdomäne“

selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt wurde.

Göttingen, 21.03.2001

Curriculum vitae

Ingo Lenk
Geboren am 17.12.1970 in Herford
deutsche Staatsangehörigkeit

08/81 – 06/90

Gymnasium im Schulzentrum Aspe, Bad Salzuflen
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

10/91 – 08/97

Biologiestudium an der Universität Bielefeld

Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für
Pflanzenphysiologie der Georg-August-Universität Göttingen
(Prof. Dr. C. Gatz)

„Konstruktion und Charakterisierung eines tetracyclin-
abhängigen Pflanzenpromotors“

Abschluß: Diplom

09/97 – 05/01

Anfertigung der vorliegenden Dissertation am
Albrecht-von Haller-Institut für Pflanzenwissenschaften,
Abteilung „allgemeine und Entwicklungsphysiologie der
Pflanze“ (Prof. Dr. C. Gatz)