

**Der bZIP-Transkriptionsfaktor BZI-1 aus *Nicotiana tabacum*:  
Analyse der *in vivo* Funktion durch Modulation der BZI-1-  
Aktivierungseigenschaften in transgenen Pflanzen**

**Dissertation**

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

vorgelegt von

**Thorsten Heinekamp**

aus Hamm

Göttingen, 2002

D 7

Referent: Prof. Dr. C. Gatz

Korreferent: PD Dr. G. Lohaus

Tag der mündlichen Prüfung: 25.04.2002



Douglas Adams:  
"The Hitchhikers Guide to the Galaxy"

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>5</b>
<b>2 Einleitung</b>	<b>6</b>
2.1 BZIP-Transkriptionsfaktoren	6
2.2 Die Regulation von Genen des Phenylpropanstoffwechsels	7
2.3 Der bZIP-Transkriptionsfaktor BZI-1 aus <i>N. tabacum</i>	11
2.4 BZI-1-heterodimerisierende bZIP-Transkriptionsfaktoren	14
2.5 Die Regulation von Transkriptionsfaktoren	16
2.6 Fragestellungen und experimentelle Ansätze dieser Arbeit	18
<b>3 Material</b>	<b>19</b>
3.1 Organismen	19
3.1.1 Bakterien	19
3.1.2 Pflanzen	19
3.2 Nukleinsäuren	20
3.2.1 Plasmide	20
3.2.2 Hybridisierungssonden	21
3.2.3 Oligonukleotide	22
3.2.4 DNA-Längenstandards	22
3.3 Proteine	23
3.3.1 Proteinstandards	23
3.3.2 Antiseren	23
3.4 Nährmedien und Zusätze	23
3.4.1 Pflanzenmedien	23
3.4.2 Bakterienmedien	24
3.4.3 Zusätze	24
3.5 Allgemeine Puffer und Lösungen	24
3.6 Geräte	25
3.7 Verbrauchsmittel	26
3.8 Chemikalien	26
3.9 Radiochemikalien	27
3.10 Kits	27
3.11 Enzyme	27
<b>4 Methoden</b>	<b>28</b>
4.1 Bakterienkulturen	28
4.1.1 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	28
4.1.2 Kultivierung von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	28
4.1.3 Kultivierung von <i>Pseudomonas syringae</i>	28
4.2 Pflanzenkulturen	28
4.2.1 Kultivierung von Tabakpflanzen in Sterilkultur	28
4.2.2 Kultivierung von Tabakpflanzen in Erde und in hydroponischer Nährlösung	28

4.2.3	Pfropfung von Tabakpflanzen	29
4.2.4	Anzucht und Kultivierung von Tabaksuspensionskulturen	29
4.3	Induktion und Infektion von <i>N. tabacum</i>	29
4.3.1	Induktion von Tabakpflanzen in hydroponischer Kultur	29
4.3.2	Induktion von Tabak-Blattscheiben	29
4.3.3	Infiltration von Tabakgewebe	30
4.3.4	Induktion von Tabaksuspensionskulturen mit Tc	30
4.3.5	Infektion von Tabakpflanzen mit dem Tabak-Mosaic-Virus (TMV)	30
4.3.6	Infektion von Tabaksuspensionskulturen mit Pseudomonaden	30
4.4	Molekulargenetische Methoden	31
4.4.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	31
4.4.1.1	Mini-Lyse zur Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	31
4.4.1.2	Modifikation der Mini-Lyse zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Agrobakterien	31
4.4.1.3	Qiaprep	32
4.4.2	Ethanol-fällung von DNA aus wässrigen Lösungen	32
4.4.3	Isolierung von DNA aus Tabak	32
4.4.4	Isolierung von RNA aus Tabak	32
4.4.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	32
4.4.6	Auftrennung von DNA in Agarosegelen	33
4.4.7	Auftrennung von DNA in Polyacrylamidgelen	33
4.4.8	Auftrennung von RNA in denaturierenden Agarosegelen	33
4.4.9	Elution von DNA aus Elektrophoresegelen	34
4.4.10	Restriktionsspaltung von DNA	34
4.4.11	Dephosphorylierung von DNA-Enden	34
4.4.12	"Klenow-fill-in"	34
4.4.13	Hybridisierung von Oligonukleotiden	35
4.4.14	Ligation von DNA-Fragmenten	35
4.4.15	Radioaktive Markierung von DNA	35
4.4.16	Polymerase Kettenreaktion	36
4.4.16.1	PCR zur Charakterisierung rekombinanter Klone	36
4.4.16.2	PCR zur Amplifizierung genomischer DNA	37
4.4.17	Sequenzierung	37
4.4.18	Transformation kompetenter Bakterienzellen	37
4.4.18.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	38
4.4.18.2	Transformation von <i>E. coli</i>	38
4.4.18.3	Blau-Weiß-Selektion	38
4.4.18.4	Herstellung kompetenter Agrobakterien	39
4.4.18.5	Transformation von <i>A. tumefaciens</i>	39
4.4.19	Northern Blot Analyse	39
4.4.19.1	Transfer der RNA auf Nylonmembranen	40
4.4.19.2	Hybridisierung der Northern Blot Membran	40
4.4.19.3	Waschen der Northern Blot Membran	40
4.4.19.4	Rehybridisierung	41
4.5	Transformation von <i>N. tabacum</i>	41
4.5.1	Stabile Transformation von <i>N. tabacum</i>	41
4.5.2	Transiente Transfektion von <i>N. tabacum</i> Mesophyllprotoplasten	41
4.6	Proteinchemische Methoden	42
4.6.1	Western Blot Analyse	42
4.6.1.1	Herstellung denaturierter Gesamtzellproteinextrakte	43
4.6.1.2	Herstellung denaturierter Kernproteinextrakte aus Tabakblättern	43
4.6.1.3	Herstellung denaturierter cytoplasmatischer Proteinextrakte aus Tabakblättern	44

4.6.1.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	44
4.6.1.5	Proteintransfer auf PVDF-Membranen	44
4.6.1.6	Immunodetektion mit dem ECL-System	45
4.6.2	Isolierung von Proteinen aus Tabak-Mesophyllprotoplasten	46
4.6.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten	46
4.6.4	Messung der $\beta$ -Glucuronidase (GUS)-Aktivität	46
4.6.5	Herstellung von Methanolextrakten zur Bestimmung des Auxingehaltes in Tabakblättern	47
4.6.6	Herstellung von Chloroform/Methanolextrakten zur Bestimmung des Zuckergehaltes	48
4.7	Konstruktion der verwendeten Plasmide	48
4.7.1	Klonierung von pUC-5'BZI-1	48
4.7.2	Klonierung von pBZI-1	49
4.7.3	Klonierung von pBin-BZI-1	49
4.7.4	Klonierung von pBin-VP16-BZI-1	49
4.7.5	Klonierung von pHBT	49
4.7.6	Klonierung von pHBT-BZI-1	49
4.7.7	Klonierung von pHBT-BZI-1- $\Delta$ N	50
4.7.8	Klonierung von pHBT-VP16-BZI-1	50
4.7.9	Klonierung der pTT-GUS Reportergenkonstrukte	50
4.8	„Restriction Fragment Differential Display“	50
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>52</b>
5.1	Analyse des bZIP-Transkriptionsfaktors BZI-1	52
5.1.1	Vervollständigung der BZI-1 cDNA Sequenz	52
5.1.2	Analyse der genomischen Struktur von <i>BZI-1</i>	54
5.1.3	Expressionsanalyse von BZI-1 in Tabak	57
5.1.4	Analyse der Aktivierungseigenschaften von BZI-1	58
5.2	Überexpression von BZI-1 und von BZI-1-Derivaten mit veränderten Aktivierungseigenschaften in transgenen Tabakpflanzen	61
5.2.1	Untersuchungen zur Beteiligung von BZI-1 an der Regulation von Genen des Phenylpropanstoffwechsels	66
5.2.1.1	Untersuchungen zur Beteiligung von BZI-1 an der Regulation pathogeninduzierter <i>PAL</i> -Expression	67
5.2.1.2	Untersuchungen zur Beteiligung von BZI-1 an der entwicklungs- und gewebespezifischen Expression von <i>PAL</i> und <i>CHS</i>	69
5.2.2	Etablierung eines Differential Display Verfahrens zur Identifizierung BZI-1 regulierter Zielgene	72
5.3	Analyse transgener Tabakpflanzen, die BZI-1 und BZI-1-Derivate mit veränderter Aktivierungseigenschaft exprimieren	80
5.3.1	Blütenmorphologie	80
5.3.2	Bestimmung der Zuckerkonzentrationen der Blüten transgener Tabakpflanzen	84
5.3.3	Vegetatives Wachstum der transgenen Tabakpflanzen	85
5.3.4	Hormonregulierte Organogenese an Tabakblattscheiben	88
5.3.5	Analyse des Auxingehaltes in BZI-1- $\Delta$ N und BZI-1-Oex Pflanzen	90
5.3.6	Pfropfungsexperimente an Wildtyp- und BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen	91
5.3.7	Northern Blot Analyse auxininduzierbarer Gene in BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen	92
5.3.8	Analyse der auxinabhängigen <i>GH3</i> -Transkription nach Tc-induzierter Expression eines VP16-BZI-1-Fusionsproteins	93

<b>6 Diskussion</b>	<b>97</b>
6.1 BZI-1 ist Mitglied einer Gruppe homologer Transkriptionsfaktoren	97
6.2 BZI-1 wird ubiquitär in der Pflanze exprimiert und die Expressionstärke unterliegt einer Regulation durch Licht und Pathogene	99
6.3 BZI-1 bindet an G- und C-Box <i>cis</i> -Elemente und ist ein transkriptioneller Aktivator <i>in planta</i>	101
6.4 Die zentralen Gene des Phenylpropanstoffwechsels <i>PAL</i> und <i>CHS</i> sind keine von BZI-1-regulierten Zielgene	103
6.5 Die RFDD-PCR ist eine geeignete Methode zur Isolierung von BZI-1 regulierten Genen	105
6.6 BZI-1 ist an der Regulation blütenspezifisch exprimierter Gene beteiligt	109
6.7 BZI-1 ist an der auxinvermittelten Genregulation beteiligt	113
6.8 BZI-1 reguliert in Abhängigkeit von Auxin die Expression des <i>GH3</i> -Gens	115
6.9 Modell	120
<b>7 Literatur</b>	<b>122</b>
<b>8 Anhang</b>	<b>132</b>
8.1 Sequenzen	132
8.1.1 BZI-1	132
8.1.2 pUC-5'BZI-1	133
8.1.3 pBZI-1-ΔN	133
8.1.4 pBZI-1	133
8.1.5 pBin-BZI-ΔN	134
8.1.6 pBin-BZI-1	134
8.1.7 pBin-VP16-BZI-1	135
8.1.8 pHBT-sGFP	135
8.1.9 pHBT	135
8.1.10 pHBT-BZI-1	136
8.1.11 pHBT-BZI-1-ΔN	136
8.1.12 pHBT-VP16-BZI-1	136
8.1.13 pTTL-GUS	136
8.1.14 pGEM-TRX	137
8.1.15 pGEM-SKP1-like	137
8.2 Abkürzungen	138
8.3 Präfixe	139
8.4 Einheiten	140
8.5 Nukleotide	140
8.6 Aminosäuren	141

# 1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Funktion des bZIP-Transkriptionsfaktors BZI-1 aus *Nicotiana tabacum* untersucht. Aufgrund der Aminosäuresequenz, der Konservierung von Proteindomänen und der genomischen Exon-Intron Struktur kann BZI-1 einer Gruppe homologer bZIP-Transkriptionsfaktoren zugeordnet werden, zu denen sowohl Vertreter in monokotylen wie auch in dikotylen Pflanzen zu finden sind. BZI-1 wird ubiquitär in allen Pflanzengewebe exprimiert. Die Expressionsstärke wird dabei von äußeren Faktoren reguliert. Es konnte gezeigt werden, daß die BZI-1 Expression durch Infektion mit bakteriellen und viralen Pathogenen induzierbar ist und einer Tag-Nachtrhythmik unterliegt, mit einer verstärkten Transkription in der Dunkelphase. Für BZI-1 konnte ein Aktivierungspotential *in planta* nachgewiesen werden, welches durch die 72 Aminosäuren der Domäne N vermittelt wird. Da BZI-1 *in vitro* an Promotorelemente der Chalcon-Synthase (*CHS*) und auch *in vivo* an G- und C-Box *cis*-Elemente bindet, wurde eine Regulation von Genen des Phenylpropanstoffwechsels wie *CHS* und *PAL* (Phenylalanin-Ammonium-Lyase) postuliert. Durch Analysen in transgenen Tabakpflanzen, in denen die Menge an funktionellem BZI-1 sowie die BZI-1-Aktivierungseigenschaften verändert waren, konnte jedoch nachgewiesen werden, daß *CHS* und *PAL* keine *in vivo* Zielgene von BZI-1 sind. Vielmehr konnte gezeigt werden, daß BZI-1 an der Vermittlung der Auxinantwort in der Pflanze beteiligt ist. Transgene Tabakpflanzen, die ein dominant negativ wirkendes BZI-1-Derivat exprimieren, dem die N-terminale Aktivierungsdomäne fehlt (BZI-1- $\Delta$ N), zeigen einen auxininsensitiven Phänotyp. BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen wachsen gestaucht und bilden vermehrt Seitensprosse. Auch auf molekularer Ebene wird die Fähigkeit, auf exogenes Auxin zu reagieren, von BZI-1 reguliert. So konnte *GH3* als mögliches BZI-1-Zielgen identifiziert werden, da seine auxinabhängige Expression in BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen reduziert und in VP16-BZI-1-Pflanzen, die ein Fusionsgen aus der VP16-Aktivierungsdomäne und BZI-1 exprimieren, in Abhängigkeit von Auxin verstärkt wird. In einem Differential Display Ansatz konnten weitere mögliche Zielgene von BZI-1 identifiziert werden, die für ein SKP-1 ähnliches Protein und für ein Thioredoxin codieren. Für diese wird eine Rolle bei der Auxinantwort diskutiert. Aufgrund der bei BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen reduzierten Blütengröße und der Entwicklung infertiler Pollen, wird von BZI-1 nicht nur eine Beteiligung an der Auxinantwort, sondern auch an der Regulation blütenspezifisch exprimierter Gene wie der Invertase *NIN88* und des BZI-1 Heterodimerisierungspartners BZI-4 angenommen.



## 2 Einleitung

Organismen müssen fortwährend auf verschiedenste endogene und exogene Stimuli reagieren, z.B. während ihrer Entwicklung oder zur Anpassung an sich verändernde Umweltbedingungen. Auf molekularer Ebene erfolgt diese Anpassung durch eine differenzierte Genexpression. Transkriptionsfaktoren binden dazu an *cis*-Elemente im Promotorbereich von Genen und aktivieren oder reprimieren deren Transkription. Aufgrund ihrer häufig konservierten DNA-Bindedomäne können die meisten eukaryotischen Transkriptionsfaktoren verschiedenen Klassen zugeordnet werden. Es gibt u.a. MYB-like Proteine, MADS-Box Faktoren, Helix Loop Helix Proteine, Zinkfinger Proteine, Homoeobox Proteine und bZIP-Faktoren (zur Übersicht siehe Riechmann et al., 2000).

### 2.1 BZIP-Transkriptionsfaktoren

Die Familie der bZIP-Transkriptionsfaktoren umfaßt in Pflanzen eine große Familie unterschiedlicher Proteine. Allein im Arabidopsisgenom wurden 75 verschiedene bZIP-Proteine identifiziert (Jakoby et al., 2002). Die bZIP-Proteine sind durch einen basischen Bereich (b) und eine sich daran anschließende Leucin-Zipper Domäne (ZIP) charakterisiert. Die basische Domäne vermittelt die Bindung des Proteins an spezifische DNA-*cis*-Elemente. Der Leucin-Zipper besteht aus heptameren Wiederholungen von Leucin bzw. anderen hydrophoben Aminosäuren, wie Phenylalanin, Isoleucin, Valin oder Methionin. Durch Ausbildung einer amphipatischen  $\alpha$ -Helix ermöglicht die ZIP-Domäne die Bildung einer "coiled coil" Konformation (O'Shea et al., 1989) mit der  $\alpha$ -Helix eines zweiten bZIP-Proteins. Damit wird eine Homo- bzw. Heterodimerisierung von bZIP-Transkriptionsfaktoren ermöglicht. Bei der Dimerisierung werden die basischen Domänen der Dimere so ausgerichtet, daß sie in die große Furche der DNA-Doppelhelix reichen (Vinson et al., 1989). Indem die basische Domäne nun ebenfalls eine "coiled coil" Struktur annimmt, wird die DNA-Bindung zusätzlich verstärkt (Krylov et al., 1995). Es wird angenommen, daß die Dimerisierung der bZIP-Proteine der DNA-Bindung vorangeht (Landschulz et al., 1988). Metallo und Schepartz (1997) konnten jedoch zeigen, daß einige bZIP-Proteine auch als Monomer an die DNA binden und erst danach eine Dimerisierung erfolgt.

BZIP-Transkriptionsfaktoren binden in der Regel an *cis*-Elemente mit einem ACGT-Consensus-Motiv. Für eine effiziente DNA-Bindung sind zusätzlich die das Kernmotiv flankierenden Sequenzen von entscheidender Bedeutung (Foster et al., 1994). Im wesentlichen bevorzugen pflanzliche bZIP-Faktoren als Bindemotive palindromische Sequenzen wie die A-Box (TACGTA), die C-Box (GACGTC) oder die G-Box (CACGTG) (Izawa et al., 1993). Es gibt allerdings auch Beispiele für Bindung an nicht palindromische Motive (Choi et al., 2000; Fukazawa et al., 2000). Auch vom ACGT-Kernmotiv abgewandelte Sequenzen werden von einigen bZIP-Faktoren effektiv als DNA-Bindestellen erkannt (de Pater et al., 1994).

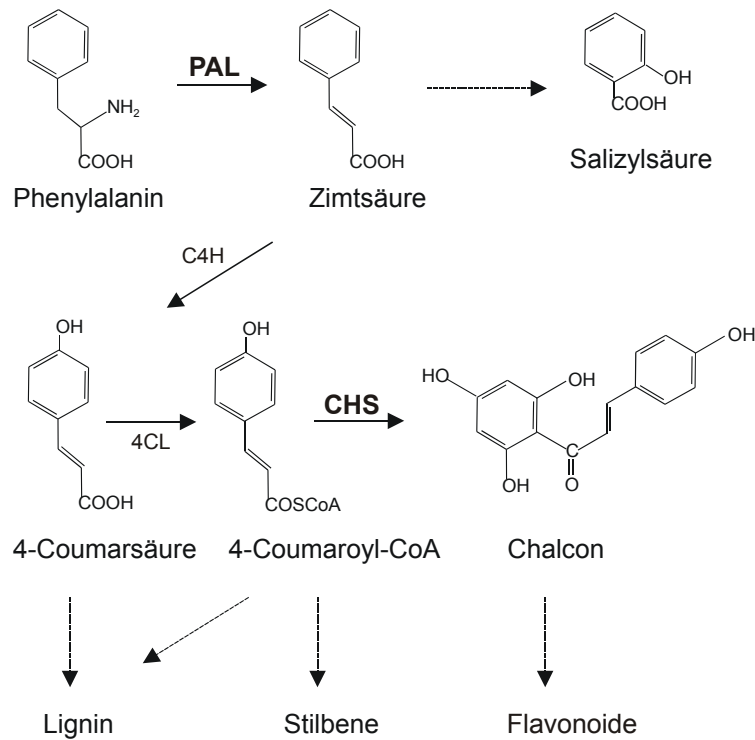
Niu et al. (1999) konnten zeigen, daß für die Spezifität der DNA-Bindung nicht nur die basische Domäne des Transkriptionsfaktors entscheidend ist, sondern daß unabhängig davon auch der kurze Bereich von ca. fünf Aminosäuren zwischen basischer Domäne und Leucin-Zipper eine DNA-Bindenspezifität vermittelt.

In Pflanzen besitzen bZIP-Transkriptionsfaktoren vielfältige Funktionen, z.B. bei der lichtregulierten Genexpression (Oyama et al., 1997), bei der Pathogenabwehr (Zhou et al., 2000), bei der hormonvermittelten Genexpression (Fukazawa et al., 2000) und bei der Regulationen der Expression von Speicherproteingenen im Samen (Schmidt et al., 1992). Darüber hinaus wird ihnen eine Rolle bei der Genexpression als Antwort auf Abscisinsäure, Anaerobiosis, und bei der Verarbeitung von Entwicklungssignalen zugesprochen (Menkens et al., 1995).

## 2.2 Die Regulation von Genen des Phenylpropanstoffwechsels

Über den Phenylpropanstoffwechsel werden Pflanzen mit wichtigen phenolischen Komponenten versorgt. Ausgangspunkt dieses Sekundärstoffwechselweges ist die Aminosäure Phenylalanin, welche zu Coumaroyl-CoA umgesetzt wird. In einem nun weitverzweigten Netzwerk biochemischer Reaktionen werden u.a. Flavonoide, Stilbene und Lignin gebildet. Diese Substanzen besitzen wichtige Funktionen, z.B. bei der Strukturgebung, der Streßantwort nach Pathogenbefall, UV-Bestrahlung oder Verwundung (Dixon et al., 1998). Die Abbildung 2.1 zeigt einen Ausschnitt über Biosynthesewege einiger zentraler Produkte des Phenylpropanstoffwechsels. Wichtige Schlüsselenzyme sind die Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL), welche die Umwandlung von Phenylalanin in Zimtsäure katalysiert und die Chalcon-Synthase (CHS), die die Bildung von Chalcon vermittelt, woraus wiederum die umfangreiche Gruppe der Flavonoide entsteht. Ausgehend von dem PAL-Produkt Zimtsäure wird über einen Zwischenschritt, der nicht

mehr zum eigentlichen Phenylpropanstoffwechsel zählt, auch Salicylsäure (SA) gebildet. SA ist als Signalmolekül an der Ausprägung der "Hypersensitive Response" (HR), sowie der "Systemic Acquired Resistance" (SAR) beteiligt und spielt damit im Zusammenhang der Pflanzenabwehr gegen Pathogene eine wichtige Rolle (zur Übersicht siehe Dempsey et al., 1999).



**Abbildung 2.1 Biosynthesewege einiger Produkte des Phenylpropanstoffwechsels (vereinfacht nach Dixon und Paiva, 1995).**

Der gesamte Phenylpropanstoffwechsel wird durch eine Vielzahl von Signalen auf transkriptioneller und posttranskriptioneller Ebene reguliert (Dixon und Paiva, 1995). Die *de novo* Synthese der Schlüsselenzyme PAL und CHS unterliegt dabei einer vielfältigen Kontrolle der Genexpression durch endogene und exogene Faktoren, wie z.B. Hormone (Moalem-Beno, 1997), Elicitoren (Hahlbrock, 1995) oder UV-Bestrahlung (Christie und Jenkins, 1996).

Die CHS ist als Schlüsselenzym der Flavonoidbiosynthese besonders intensiv analysiert worden. In der Bohne (*Phaseolus vulgaris*) sowie in Soja (*Glycine max*) sind mehrere Mitglieder der *chs*-Genfamilie bekannt (Ryder et al., 1987; Akada und Dube, 1995), deren Expression einer umwelt- bzw. entwicklungspezifischen Regulation unterliegt (Ryder et al., 1987). *GUS*-Fusionskonstrukte der *CHS8*- und *CHS15*-Promotoren aus Bohne in transgenen Tabakpflanzen belegen eine zwischen Bohne und Tabak konservierte

Genaktivierung durch diese Stimuli (Stermer *et al.*, 1990; Faktor *et al.*, 1996; Faktor *et al.*, 1997). So werden *CHS8* und *CHS15* entwicklungspezifisch in den epidermalen Zellen der Petalen, in Wurzeln und im lateralen Wurzelmeristem exprimiert. Während *chs8* eine Induzierbarkeit durch biotische und abiotische Stressfaktoren, wie UV, HgCl<sub>2</sub>, Verwundung, Pilzbefall und bakterielle Infektionen aufweist, ist *chs15* zwar durch UV und HgCl<sub>2</sub>, aber nicht durch Pathogene induzierbar (Stermer *et al.*, 1990).

In den Promotoren der Gene *CHS8* und *CHS15* aus der Bohne wurden durch Deletions- bzw. Mutationsanalysen in transgenem Tabak wichtige *cis*-Elemente identifiziert und charakterisiert (Stermer *et al.*, 1990, Schmidt *et al.*, 1990). Im *CHS15*-Promotor sind in einem DNA-Bereich von 130 bp proximal zur TATA-Box eine G-Box und drei Kopien von "Myb-like"-Elementen, den sogenannten H-Boxen (CCTACC(N)<sub>7</sub>CT) lokalisiert. Der *CHS8*-Promotor enthält ebenfalls eine G-Box sowie eine H-Box. Die G-Box ist ein weit verbreitetes *cis*-Element in Pflanzen und wurde zuerst in lichtregulierten Genen entdeckt (Giuliano *et al.*, 1988). Die G-Box ist essentiell für die streß- bzw. entwicklungspezifisch regulierte Transkription des *CHS*-Gens (Faktor *et al.*, 1996; Faktor *et al.*, 1997).

Im Modellsystem Petersilie (*Petroselinum crispum*) wurde gezeigt, daß die UV-induzierte Aktivierung des *CHS*-Promotors über die "Light responsive unit" (LRU) reguliert wird (Schulze-Lefert *et al.*, 1989; Weisshaar *et al.*, 1991). Die LRU besteht aus zwei konservierten *cis*-Elementen, der G-Box und dem "Myb-like Recognition element" (MRE, Feldbrügge *et al.*, 1994; Feldbrügge *et al.*, 1997). Von Feldbrügge *et al.* (1997) wurde ein MYB-Protein, PcMYB1, mit nur einem MYB-Repeat in der DNA-Bindedomäne isoliert, welches an das MRE bindet. Der Transkriptionsfaktor CPRF1 bindet *in vivo* ebenfalls an den Petersilie-*CHS*-Promotor (Sprenger-Haussels und Weisshaar, 2000). Die Expression von CPRF1 unterdrückt die *CHS* Transkription (Feldbrügge *et al.*, 1996).

Das Enzym PAL wird in der Bohne von einer Genfamilie mit drei Mitgliedern codiert (Cramer *et al.*, 1989). Die Mitglieder der *PAL*-Genfamilie werden in verschiedenen Geweben der Bohne unterschiedlich exprimiert. Man findet beispielsweise *PAL2*-Transkripte in der Sproßspitze, in den Petalen sowie in Licht-behandelten etiolierten Hypokotylen. *PAL3*-Transkripte werden in Pilz-infizierten Hypokotylen gefunden. Beide Transkripte zusammen treten in verwundeten Hypokotylen und in Wurzeln auf (Liang *et al.*, 1989a,b). Dieses unterschiedliche Expressionsmuster führt man auf die unterschiedlichen Promotorbereiche dieser beiden Gene zurück. Eine Charakterisierung der beiden Promotoren in transgenen Tabakpflanzen belegt ein identisches Expressionsmuster auch in diesem heterologen System (Leyva *et al.*, 1992; Shufflebottom

*et al.*, 1993). Bei der Regulation des *PAL2*-Promotors aus der Bohne wurde die Interaktion einer G-Box und eines Myb-like-Elements gezeigt. Ein MYB-Faktor (MYB305) bindet an den *PAL2* Promotor und aktiviert seine Transkription (Sablowski *et al.*, 1994; Sablowski *et al.*, 1995). Für den *PAL2*-Promotor wurden durch *in vitro* footprinting-Studien in Verbindung mit Mutations- und Deletionsexperimenten in transgenen Tabakpflanzen mit einem *GUS*-Reporterkonstrukt vier *cis*-Elemente identifiziert, die an der entwicklungsspezifischen Expression beteiligt sind (Hatton *et al.*, 1995, Hatton *et al.*, 1996). Als regulatorische *cis*-Elemente des *PAL2*-Promotors sind H-Box-ähnliche AC-reiche Elemente sowie eine G-Box vorhanden. Ein H-Box-ähnliches Element, als P-Box bezeichnet, konnte im Petersilie-*PAL*-Gen für die Aktivierung durch Pathogene verantwortlich gemacht werden (Hahlbrock *et al.*, 1995; Lois *et al.*, 1989).

In den Promotorbereichen von Mais-Phenylpropanstoffwechselgenen konnten ein "C1-Motiv" und ein "R-Motiv" identifiziert werden, die wichtig für die Co-Aktivierung durch MYB-like bzw. bHLH (basic region/Helix-Loop-Helix) Transkriptionsfaktoren sind (Bodeau und Walbot, 1996). In vielen Promotorbereichen der Phenylpropanstoffwechselgene sind demnach drei Typen von *cis*-Elementen vermehrt vorhanden: G-Box-ähnliche Elemente als Bindestellen für bZIP-Faktoren, R-Motive als bHLH-Faktor Bindestellen und MYB-Faktor Bindestellen. Eine Interaktion dieser Elemente in verschiedenen Kombinationen bietet so die Möglichkeit einer Promotor- und Stimulus abhängigen Genaktivierung. Allerdings gibt es noch einige Widersprüche zwischen biochemisch erzielten Daten und genetischen Daten. So wurden über genetische Ansätze MYB-like Proteine und bHLH Transkriptionsfaktoren als Regulatoren der Anthocyan Biosynthese identifiziert (zur Übersicht siehe Mol *et al.*, 1996). Über biochemische Ansätze wurden dagegen MYB-like und bZIP-Faktoren identifiziert. Die Beteiligung von MYB-Faktoren gilt damit als gesichert. Dagegen gibt es bislang weder genetische Daten, die eine Beteiligung von bZIP-Faktoren bei der Pigmentsynthese belegen, noch gibt es in diesem Zusammenhang biochemische Hinweise auf eine Beteiligung von bHLH-Proteinen (zur Übersicht siehe Weisshaar und Jenkins, 1998). Eine mögliche Erklärung für diese Widersprüche besteht in der Tatsache, daß die genetischen Analysen sich hauptsächlich auf eine gewebespezifische und entwicklungsspezifische Expression bei der Pigmentsynthese beziehen, die biochemischen Analysen sich jedoch auf eine stimulusabhängige Expression (Licht, Elicitorbehandlung) stützen. So wäre denkbar, daß bZIP-Faktoren spezifisch an der stimulusabhängigen Genexpression beteiligt sind, während bHLH-Faktoren eine Genaktivierung in bestimmten Zelltypen regulieren.

### 2.3 Der bZIP-Transkriptionsfaktor BZI-1 aus *N. tabacum*

Um Transkriptionsfaktoren zu isolieren, die an der transkriptionellen Aktivierung zentraler Gene des Phenylpropanstoffwechsel beteiligt sind, wurde eine Soja (*Glycine max*) cDNA-Bank mittels South Western Hybridisierung durchgemustert. Dabei wurde über seine *in vitro* Bindung an G-Box und H-BoxIII des *CHS15* Promotors der cDNA-Klon *G/HBF-1* als *trans*-Faktor isoliert (Dröge-Laser et al., 1997).

Von A. Eick wurde 1999 das zu *G/HBF-1* orthologe Protein aus einer Tabak (*N. tabacum* cv. SR1) cDNA-Bank isoliert. Dabei stellte sich zwischen beiden Genen eine 97 %ige Identität der DNA-Sequenz heraus. Weitere PCR-Analysen ergaben, daß das Protein *G/HBF-1* ursprünglich nicht aus Soja sondern aus Tabak stammt. Es erfolgte daher eine Neubenennung des Proteins. Das aus Tabak isolierte *G/HBF-1*-Derivat wurde als *N.t.BZI-1* bezeichnet. Die *BZI-1*-cDNA codiert für ein Protein, welches auch in Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSAs) spezifisch mit den beiden *cis*-Elementen G-Box und H-BoxIII interagiert (Dröge-Laser et al., 1997; Kuhlmann, 2002). *BZI-1* weist typische Merkmale eines bZIP-Transkriptionsfaktors auf und läßt sich in Anlehnung einer Einteilung der bZIP-Proteine aus *Arabidopsis* der Subfamilie C zuordnen (Jakoby et al., 2002). Als Basis für diese Klassifizierung wurden alle bekannten *Arabidopsis* bZIP-Faktoren in einem Aminosäuresequenzvergleich zehn verschiedenen Subfamilien zugeordnet. Die Einteilung erfolgte nach Ähnlichkeiten in der bZIP-Region und der Existenz weiterer konservierter Domänen. Die Mitglieder der Subfamilie C zeichnen sich durch einen stark konservierten bZIP-Bereich aus, in dem die Zipper-Domäne jeweils sieben Wiederholungen an Leucin bzw. ähnlichen Aminosäuren enthält. Innerhalb dieser Subfamilie gehört *BZI-1* zu einer Gruppe hochkonservierter Transkriptionsfaktoren, deren Vertreter sowohl in dikotylen wie auch in monokotylen Pflanzenspezies zu finden sind. Dazu zählen *CPRF2* aus Petersilie (*Petroselinum crispum*, Weisshaar et al., 1991), *OHP1* und *OHP2* aus Mais (*Zea mays*, Pysh et al., 1993), *BLZ1* aus Gerste (*Hordeum vulgare*, Vicente-Carbajosa et al., 1998) und *REB* aus Reis (*Oryza sativa*, Nakase et al., 1997). In *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) wurde ebenfalls ein homologes Protein, *AtBZIP63*, identifiziert (Jakoby et al., 2002). Diese Proteine sind alle durch das Vorhandensein konservierter Domänen gekennzeichnet. Neben der bZIP-Domäne sind das die Domänen N, DI, DII, DIII und DIV (Dröge-Laser et al., 1997).

In Abbildung 2.2 ist ein Aminosäuresequenzvergleich von *BZI-1* mit allen homologen Proteinen dargestellt.

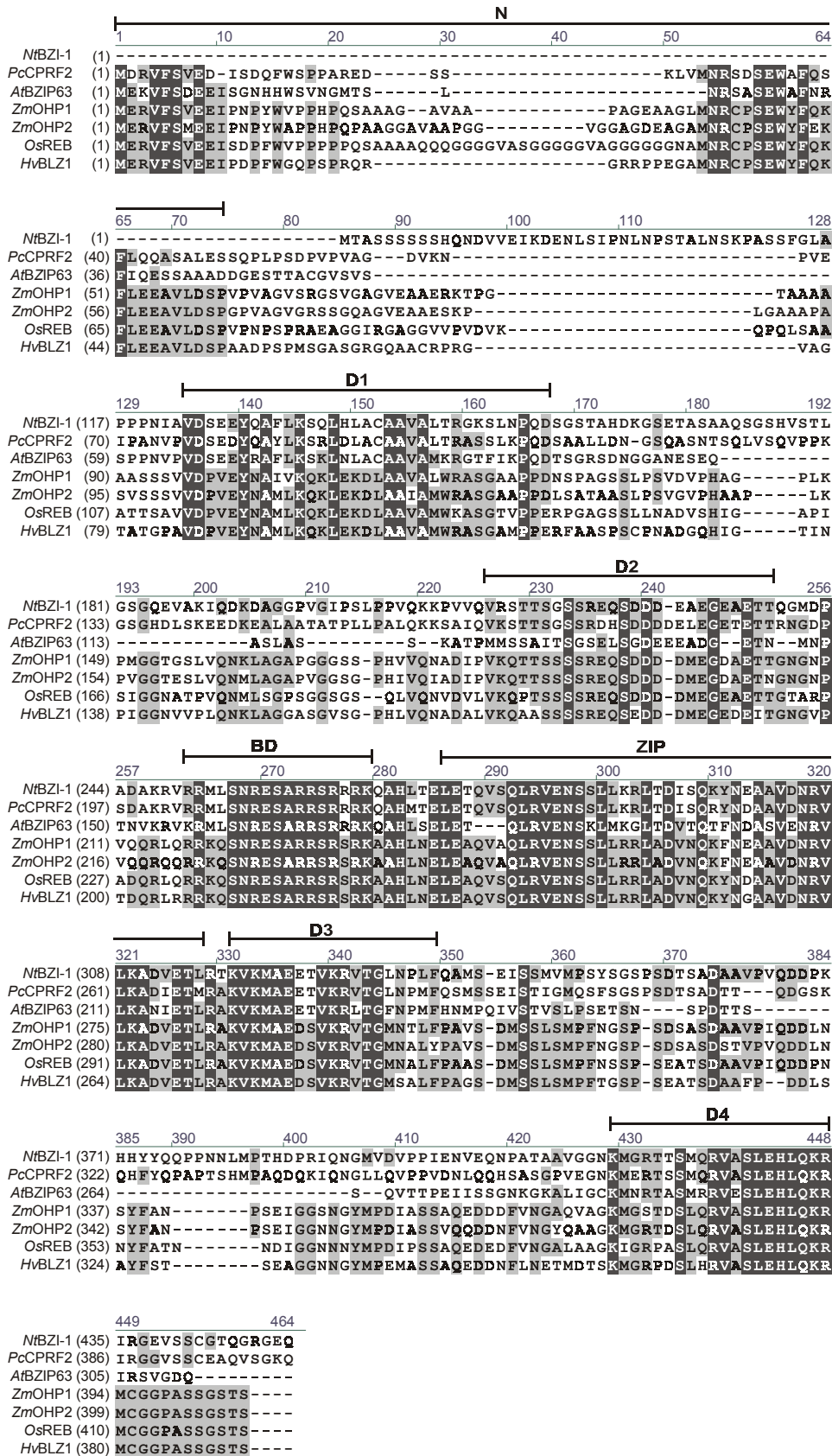


Abbildung 2.2 Aminosäuresequenzvergleich der Proteine *N.t.BZI-1*, *P.c.CPRF2* (Weisshaar et al., 1991), *A.t.BZIP63* (GenBank Accession number AB010697), *Z.m.OHP1/2* (Pysh et al., 1993), *H.v.BLZ1* (Vicente-Carbajosa et al., 1998) und *O.s.REB* (Nakase et al., 1997). Die konservierten Domänen sind durch Balken gekennzeichnet. N, Domäne N; D1, D2, D3, D4, Domänen I-IV; BD, basische Domäne; ZIP, Leucin-Zipper. Sequenzidentitäten von 100 % sind dunkelgrau, von mindestens 50 % sind hellgrau unterlegt.

Die abgeleitete Peptidsequenz der Domäne I weist auf die Konformation einer  $\alpha$ -Helix hin. Diese könnte für Proteininteraktionen verantwortlich sein. So gibt es für CPRF2 Hinweise auf eine Rolle der Domänen I und II bei der Retention des Proteins im Cytoplasma (Kircher et al., 1999). Für BZI-1 konnte eine Proteininteraktion, die über die Domäne I und Teile der Domäne II vermittelt wird, von Horvay (2000) gezeigt werden. In einem Hefe "Two-Hybrid"-System wurde eine cDNA identifiziert, die für das Protein *N.t.*ANK-1 (*Nicotiana tabacum* Ankyrinprotein-1) codiert, welches ein Ankyrinmotiv in vierfacher Wiederholung beinhaltet. Die Interaktion von BZI-1 mit ANK-1 erfolgt innerhalb des Bereichs, der die Aminosäuren 73-218 von BZI-1 beinhaltet. Eine mögliche regulatorische Funktion dieser Proteininteraktion für den Kernimport konnte allerdings nicht bestätigt werden (Kuhlmann, 2002). Die Domäne II besteht aus überwiegend sauren Aminosäuren. Deshalb könnte diese Domäne an der Aktivierung der Transkription beteiligt sein (Ma und Ptashne, 1987). Die in der Domäne II vorhandenen Serine könnten mögliche Phosphorylierungsstellen darstellen (Hunter und Karin, 1992). Die Domäne III könnte eine Rolle bei der Dimerstabilisierung spielen (Armstrong et al., 1992). In der Domäne IV gibt es sowohl für BZI-1 wie auch für CPRF2 Hinweise auf eine weitere mögliche Phosphorylierungsstelle (Kuhlmann, 2002; Wellmer et al., 1999).

CPRF2 wurde ebenso wie G/HBF-1 über seine *in vitro* Bindung an die G-Box im *CHS* Promotor isoliert. Eine *in vivo* Beteiligung an der Regulation der *CHS* konnte bislang allerdings nicht gezeigt werden. CPRF2 wird lichtabhängig phosphoryliert (Wellmer et al., 1999). Es erfolgt eine phytochromabhängige Translokation in den Kern (Kircher et al., 1999). CPRF2 wird deshalb eine Rolle in der lichtregulierten Genexpression zugeschrieben. Allerdings wird die Lichtinduktion der *CHS* in Petersilie durch UV-Rezeptoren gesteuert. Darüberhinaus konnte für CPRF2 in Analysen an transient transformierten Petersilieprotoplasten nur eine schwache *in vivo* Bindung an die LRU des *CHS*-Promotors gezeigt werden (Sprenger-Haussels und Weisshaar, 2000). Daher ist es fraglich, ob *CHS* ein *in vivo* Zielgen von CPRF2 darstellt.

Die Proteine OHP1 und OHP2 wurden als Heterodimerisierungspartner von O2, einem G-Box bindenden Faktor aus Mais, isoliert (Pysh et al., 1993). BLZ1-Transkripte wurden in Gerste außer im Endosperm auch in Wurzeln und Blättern nachgewiesen. BLZ1 heterodimersiert mit BLZ2 (Onate et al., 1999). BLZ2 und O2 sind zwei bZIP-Transkriptionsfaktoren, deren Funktion in der Regulation von Speicherproteingenen belegt werden konnte. Dagegen ließ sich die Funktion von BLZ1 und OHP1 bislang nicht eindeutig klären. O2 und BLZ2 werden spezifisch im Endosperm exprimiert, ihre



Heterodimerisierungspartner OHP1/2 bzw. BLZ1 werden dagegen ubiquitär exprimiert. Es ist also zu vermuten, daß diese Transkriptionsfaktoren zusätzliche Funktionen außerhalb des Samens ausüben.

## **2.4 BZI-1-heterodimerisierende bZIP-Transkriptionsfaktoren**

Die Aktivität von Transkriptionsfaktoren wird durch die Interaktion mit anderen Proteinen beeinflusst (Lamb und McKnight, 1991). Die Dimerisierung erhöht die Anzahl möglicher Transkriptionsfaktorkomplexe um ein Vielfaches und kann einen positiven oder negativen Einfluß auf die DNA-Bindungseigenschaften, auf das Aktivierungspotential und auf die Kernlokalisierung ausüben. Die Dimerisierungsprozesse werden über die Verfügbarkeit der jeweiligen Heterodimerisierungspartner, über deren Affinität zueinander sowie der Affinität des Dimers zu anderen Komponenten, wie z.B. DNA, gesteuert (zur Übersicht siehe Schwechheimer und Bevan, 1998).

Heterodimerisierung ist auch bei bZIP-Transkriptionsfaktoren ein typischer Mechanismus zur Regulation ihrer Funktion. Ausführlich beschrieben wurde die Heterodimerisierung der Säugetier-bZIP-Transkriptionsfaktoren c-JUN und c-FOS (Halazonetis et al., 1988). Als Beispiel bei den pflanzlichen bZIP-Transkriptionsfaktoren ist die Heterodimerisierung der GBF-Proteine gezeigt. Die GBF-Proteine zeigen dabei ein sehr differenziertes Bindeverhalten. GBF1, GBF2 und GBF3 bilden sowohl Homodimere als auch wechselseitig Heterodimere (Schindler et al., 1992a). GBF4 homodimerisiert nicht, bildet aber Heterodimere mit GBF2 und GBF3 (Menkens und Cashmore, 1994). Es ist denkbar, daß durch die selektive Ausbildung verschiedener Dimere und damit einer spezifischen DNA-Bindfähigkeit diese komplexen Auswirkungen auf die Zielgene der Transkriptionsfaktoren gesteuert werden. Auch die bZIP-Transkriptionsfaktoren CPRF1, CPRF2 und CPRF3 bilden bevorzugt Heterodimere (Armstrong et al., 1992). Der Faktor CPRF4a zeigt ein selektives Dimerisierungsverhalten. Er bildet sowohl Homodimere als auch Heterodimere mit CPRF1. Dagegen dimerisiert er nicht mit CPRF2 (Kircher et al., 1998). Als spezifisch mit CPRF2 interagierende Proteine konnten kürzlich die bZIP Transkriptionsfaktoren CPRF6 und CPRF7 aus *Petersilie* identifiziert werden (Rügner et al. (2001).

Von Strathmann et al. (2001) wurden mehrere Heterodimerisierungspartner von BZI-1 mittels eines Hefe "Two-Hybrid" Systems isoliert. Als BZI-1-Interaktionspartner sind dabei unter anderem drei bZIP-Transkriptionsfaktoren, BZI-2, BZI-3 und BZI-4, gefunden worden, die in Anlehnung an die Klassifizierung der bZIP-Proteine in *Arabidopsis*, alle zur

Subfamilie S der bZIP-Proteine zählen (Jakoby et al., 2002). Die Proteine zeichnen sich durch ein geringes Molekulargewicht von weniger als 20 kD aus. Sie besitzen einen relativ kurzen N-Terminus, einen langen Leucin-Zipper Bereich mit neun Leucin-Wiederholungen und einen wiederum kurzen C-terminalen Bereich. Die Protein-Protein-Interaktion mit BZI-1 wird über die bZIP-Domäne vermittelt. Die Bildung von Heterodimeren ist gegenüber der BZI-1-Homodimerisierung deutlich bevorzugt. Die Interaktion ist spezifisch, da eine Dimerisierung mit anderen bZIP-Proteinen, wie z.B. den TGA-Faktoren der Subfamilie D der *Arabidopsis* bZIP-Proteine (Jakoby et al., 2002), nicht stattfindet.

BZI-2 ist homolog zu ATB2 einem Transkriptionsfaktor aus *Arabidopsis* (Rook et al., 1998a; Rook et al., 1998b). Für ATB2 ist bekannt, daß er spezifisch in "sink"- Geweben, wie z.B. den Blüten und dem Stengel, exprimiert wird. Seine Transkription wird durch Licht reguliert, so ist die *ATB2* Expression in dunkeladaptierten Keimlingen reprimiert, kann aber durch Licht induziert werden. In den photomorphogenetischen Mutanten COP1 und DET1 ist die Repression von *ATB2* im Dunkeln aufgehoben.

*ATB2* besitzt einen ca. 600 bp langen 5'-untranslatierten Bereich (untranslated region, UTR) mit vier offenen Leserahmen (upstream open reading frames, uORFs). Solche uORFs werden häufig in den 5'-UTR-Sequenzen von Transkriptionsfaktoren gefunden und vermitteln, wie es z.B. für *O2* gezeigt werden konnte (Lohmer et al., 1993), wahrscheinlich eine Funktion bei der Translationskontrolle (zur Übersicht siehe Geballe und Morris, 1994). In *ATB2* erfolgt über die uORFs eine posttranskriptionelle Repression durch Saccharose. Daher wird eine Beteiligung von ATB2 an der Kohlenhydratregulation postuliert (Rook et al., 1998b). Vermutlich üben BZI-2 und ATB2 ähnliche Funktionen aus, da auch für BZI-2 inzwischen ein vergleichbares Expressionsmuster nachgewiesen werden konnte (Strathmann et al., 2001).

Kürzlich wurde das Gen *TBZF* (tobacco bZIP factor in flowers) aus Tabak isoliert (Yang et al., 2001). *TBZF* ist identisch mit *BZI-3*. *TBZF* Transkript wurde überwiegend in Blüten und in seneszenten Blättern nachgewiesen. Für *TBZF* und für *BZI-3* konnte eine Induzierbarkeit der Transkription durch Kälte gezeigt werden. *TBZF* ist darüber hinaus auch durch Hormone wie Ethylen, Jasmonsäure und Auxin induzierbar. Durch Expression eines GFP-TBZF-Fusionsproteins konnte gezeigt werden, daß das TBZF-Genprodukt im Kern lokalisiert ist. Als bevorzugte Bindemotive wurden eine A/G-Hybrid Box (TACGTG) und eine C/G-Hybrid Box (GACGTG) durch EMSAs identifiziert. Durch

transiente Analysen in BY-2 Zellen konnte TBZF ein Aktivierungspotential zugewiesen werden (Yang et al., 2001).

Die Expression von *BZI-4* ist auf einige Blütenorgane beschränkt. Die höchsten Transkriptmengen sind in den Stamina nachweisbar, darüberhinaus wird *BZI-4* auch noch in den Petalen und im Pistill exprimiert. Die Proteinsequenz und das blütenspezifische Expressionsmuster sind den Proteinen BZIP910 und BZIP911 aus dem Löwenmäulchen (*Antirrhinum majus*) ähnlich (Martinez-Garcia et al., 1998). Diese Proteine binden als Homodimere bevorzugt an eine G/C-Hybrid Box, wie durch "*in vitro* binding site selection" gezeigt werden konnte. Transgene Tabakpflanzen, die *BZI-4* unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors ektopisch exprimieren, bilden verkürzte Internodien und kleinere Blüten (Strathmann, unveröffentlicht).

BZI-1 zeigt, wie auch andere bZIP-Proteine der Subfamilie C, ein relaxiertes Bindevverhalten (Dröge-Laser et al., 1997; Armstrong et al., 1992; Izawa et al., 1994). Daher ist es denkbar, daß eine Spezifität für die Bindung an bestimmte *cis*-Elemente erst durch Interaktion mit einem Heterodimerisierungspartner erreicht wird.

## 2.5 Die Regulation von Transkriptionsfaktoren

Neben der Interaktion mit anderen bZIP-Transkriptionsfaktoren über Dimerisierung ist auch eine Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren denkbar, die an benachbarte *cis*-Elemente binden. So konnte für O2 eine Interaktion mit dem 20 bp entfernt bindenden Zink-Finger Transkriptionsfaktor PBF belegt werden (Vicente-Carbajosa et al., 1997). Über diese Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren könnte die Spezifität für Zielgene, die in ihren Promotoren spezifische Erkennungssequenzen für verschiedene Transkriptionsfaktoren enthalten, erreicht werden.

Eine weitere Regulationsmöglichkeit für BZI-1 besteht über eine stimulusinduzierte Phosphorylierung. *In vitro* und *in vivo* konnte gezeigt werden, daß BZI-1 nach Pathogenbefall serinspezifisch durch eine cytosolische Kinase phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung erfolgt dabei innerhalb weniger Minuten, ist transient und verstärkt die *in vitro* DNA-Bindung. (Dröge-Laser et al., 1997). Für den bZIP-Transkriptionsfaktor O2 konnte ebenfalls eine Phosphorylierung nachgewiesen werden, die seine DNA-Bindung beeinflusst. Die Phosphorylierung von O2 wird dabei diurnal gesteuert (Ciceri et al., 1997). Darüberhinaus könnte auch ein gesteuerter Kerntransport von BZI-1 seine Funktion regulieren. Sowohl Phosphorylierung wie auch geregelter Kerntransport wurden z.B. bei CPRF2 gefunden (Wellmer et al., 1999; Kircher et al., 1999). Hierbei ist ein ähnlicher

Mechanismus denkbar, wie er für NF- $\kappa$ B gezeigt wurde. NF- $\kappa$ B liegt im Cytoplasma als Komplex mit I $\kappa$ B vor. Diffusion von freiem NF- $\kappa$ B in den Kern ist nur möglich, wenn I $\kappa$ B nach induzierter Phosphorylierung von diesem Komplex dissoziiert. Im Kern bindet NF- $\kappa$ B dann an die *cis*-Elemente verschiedener Zielgene (Thanos und Maniatis, 1995).

Der Kernimport von bZIP-Transkriptionsfaktoren wird häufig über eine Kernlokalisierungssequenz (NLS) reguliert. Für den bZIP-Faktor O2 wurde gezeigt, daß die basische Domäne sowohl den Kerntransport wie auch die DNA-Bindung ermöglicht (Varagona et al. 1994). DNA-Bindung und Kernlokalisierung sind voneinander unabhängig. Kuhlmann (2002) konnte für BZI-1 die Existenz einer NLS in der basischen Domäne nachweisen. In transient transformierten Tabakprotoplasten war ein Fusionsprotein aus GFP und einem BZI-1-Derivat mit deletierter basischer Domäne überwiegend im Cytoplasma lokalisiert. Im Gegensatz dazu sind GFP-BZI-1-Derivate, die eine basische Domäne beinhalten, hauptsächlich im Kern lokalisiert (Kuhlmann, 2002).

## 2.6 Fragestellungen und experimentelle Ansätze dieser Arbeit

Diese Arbeit konzentriert sich auf die Aufklärung der Funktion des Transkriptionsfaktors BZI-1 aus *Nicotiana tabacum*.

Durch Vergleich mit homologen Proteinen aus anderen Pflanzenspezies wurde vermutet, daß die bisher vorliegende cDNA-Sequenz von BZI-1 unvollständig ist. Daher war es ein erstes Ziel dieser Arbeit, den fehlenden 5'-Bereich des BZI-1-Gens aus Tabak zu isolieren. Ein weiteres Ziel bestand in der Aufklärung der Exon-Intron Struktur des vollständigen BZI-1-Gens.

Daran anschließend sollte die *in vivo* Funktion des Proteins näher charakterisiert werden. Es war zu klären, ob BZI-1 *in planta* ein Aktivator oder ein Repressor der Genexpression ist. Dazu sollten Tabakmesophyllprotoplasten transient mit verschiedenen BZI-1-Derivaten transformiert werden. Im Einzelnen sollte der Einfluß der Expression von BZI-1, eines BZI-1-Deletionsderivates mit verkürztem N-Terminus, sowie eines Fusionsproteins aus BZI-1 mit der VP16-Aktivierungsdomäne auf die Expressionsstärke von Promotor-*GUS*-Reportergenkonstrukten analysiert werden.

Für weitere Analysen der Funktion von BZI-1 sollten transgene Tabakpflanzen hergestellt werden, die die in den transienten Analysen getesteten BZI-1-Derivate ektopisch exprimieren. So sollte zum einen die Menge an BZI-1 in den Pflanzen gesteigert werden und zum anderen die BZI-1-Aktivierungseigenschaft verändert werden.

Durch die Identifizierung von Zielgenen, die durch BZI-1 reguliert werden, könnten sich Hinweise darauf ergeben, welche biologischen Prozesse von BZI-1 gesteuert werden. Ausgehend von den bisher vorliegenden Ergebnissen wurde postuliert, daß BZI-1 an der pathogeninduzierten transkriptionellen Aktivierung von Genen des Phenylpropanstoffwechsels beteiligt sein könnte. Zur Überprüfung dieser These sollte in Wildtyp- und transgenen Tabakpflanzen das entwicklungs- und gewebespezifische Expressionsmuster der zentralen Gene des Phenylpropanstoffwechsels *CHS* und *PAL* in Abhängigkeit von der BZI-1-Expression untersucht werden. Zur Isolierung weiterer möglicher Zielgene sollten transgene Tabakpflanzen, die BZI-1-Derivate unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors exprimieren, hergestellt werden. Mittels eines zu etablierenden Differential Display Verfahrens könnten diese Pflanzen nach Induktion der Expression des BZI-1-Derivates auf eine veränderte Genexpression untersucht werden.

Die Analyse auftretender phänotypischer Veränderungen in Pflanzen, die BZI-1-Derivate exprimieren, bietet eine weitere Möglichkeit, daraus den funktionellen Kontext von BZI-1 abzuleiten.

### 3 Material

#### 3.1 Organismen

##### 3.1.1 Bakterien

Stamm	Eigenschaften	Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	recA1 relA1 thi-1 $\Delta$ lacU169 $\phi$ 80 (lacZ $\Delta$ M15) hsdR17( $r_k$ - $m_k$ +)	Hanahan, 1983
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA 4404	pAL4404, Sm <sup>r</sup>	Hoekema et al., 1983
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. pisi	inkompatible Reaktion	Rudolph, Universität Göttingen

##### 3.1.2 Pflanzen

Als Wildtyppflanzen wurden die Kultivare Xanthi und Samsun NN (SNN) von *Nicotiana tabacum* (*N. tabacum*) verwendet. Die eingesetzten transgenen Pflanzen sind in der nachfolgenden Übersicht aufgelistet.

Pflanze	Kultivar	Eigenschaften	Referenz
CHS8-GUS	Xanthi	pchs8::gus; Km <sup>r</sup>	Schmidt et al. (1990)
Bin	Xanthi	Ausgangspflanze: CHS8-GUS Tx::-; Km <sup>r</sup> , Hyg <sup>r</sup>	diese Arbeit
BZI-1-Oex	Xanthi	Ausgangspflanze: CHS8-GUS Tx::BZI-1; Km <sup>r</sup> , Hyg <sup>r</sup>	diese Arbeit
BZI-1-HA $\Delta$ N	Xanthi	Ausgangspflanze: CHS8-GUS Tx::HA-BZI-1- $\Delta$ N; Km <sup>r</sup> , Hyg <sup>r</sup>	diese Arbeit
BZI-1- $\Delta$ N	Xanthi	Ausgangspflanze: CHS8-GUS Tx::BZI-1- $\Delta$ N; Km <sup>r</sup> , Hyg <sup>r</sup>	diese Arbeit
VP16-BZI-1	Xanthi	Ausgangspflanze: CHS8-GUS Tx::VP16-BZI-1; Km <sup>r</sup> , Hyg <sup>r</sup>	diese Arbeit
Hö20.20	SNN	CaMV 35S::TetR; Km <sup>r</sup>	Höfgen, unveröffentlicht
HöBin	SNN	CaMV 35S::TetR; Tx::mcs; Km <sup>r</sup> , Hyg <sup>r</sup>	diese Arbeit
HöBZI-1	SNN	Ausgangspflanze: Hö20.20 TX::BZI-1; Km <sup>r</sup> , Hyg <sup>r</sup>	diese Arbeit
HöBZI-1- $\Delta$ N	SNN	Ausgangspflanze: Hö20.20 Tx::BZI-1- $\Delta$ N; Km <sup>r</sup> , Hyg <sup>r</sup>	diese Arbeit
HöVP16-BZI-1	SNN	Ausgangspflanze: Hö20.20 Tx::VP16-BZI-1; Km <sup>r</sup> , Hyg <sup>r</sup>	diese Arbeit
HöVP16-BZI-1 $\Delta$ ATG	SNN	Ausgangspflanze: Hö20.20 Tx::VP16-BZI-1 $\Delta$ ATG; Km <sup>r</sup> , Hyg <sup>r</sup>	diese Arbeit

## 3.2 Nukleinsäuren

### 3.2.1 Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
p16BZI-1	pET28-Derivat, enthält das <i>BZI-1</i> -Gen; Amp <sup>r</sup>	Kuhlmann, 2002
pBIN-BZI-1	pBinHygTx-Derivat, enthält das <i>BZI-1</i> -Gen unter Kontrolle des Tx-Promotors	diese Arbeit
pBIN-BZI-1-ΔN	pBinHygTx-Derivat, enthält das <i>BZI-1-ΔN</i> -Gen unter Kontrolle des Tx-Promotors	Dröge-Laser, unveröffentlicht
pBIN-BZI-1-HAΔN	pBinHygTx-Derivat, enthält das <i>BZI-1-ΔN</i> -Gen mit Codiersequenz für den HA-Epitoptag unter Kontrolle des Tx-Promotors	Heinekamp, 1997
pBinHygTx	pBINHyg-Derivat, enthält den Tx-Promotor und den Terminator <i>pA-NOS</i> , binärer Pflanzentransformationsvektor; Km <sup>r</sup>	Rieping et al., 1994
pBIN-VP16-BZI-1	pBinHygTx-Derivat, enthält das <i>VP16-BZI-1-ΔN</i> -Gen unter Kontrolle des Tx-Promotors	diese Arbeit
pBZI-1-ΔN	pUC18-Derivat, enthält das <i>BZI-1-ΔN</i> -Gen unter Kontrolle des Tx-Promotors; <i>pANOS</i>	Dröge-Laser, unveröffentlicht
pGEM-SKP1-like	pGEM-T-Derivat, enthält das im RFDD unter Verwendung der Primer Eu35 und RFDD-0 amplifizierte PCR-Produkt	diese Arbeit
pGEM-T	pGEM-5Zf(+)-Derivat, mit <i>EcoRV</i> linearisiert und ddT-Überhängen an den 3'-Enden versehen, Klonier- und Sequenziervektor für PCR-Produkte; Amp <sup>r</sup> , <i>lacZα</i>	Promega
pGEM-TRX	pGEM-T-Derivat, enthält das im RFDD unter Verwendung der Primer Eu29 und RFDD-0 amplifizierte PCR-Produkt	diese Arbeit
pHBT	pHBT-sGFP-Derivat, Entfernen des <i>sGFP</i> Gens durch <i>NcoI</i> / <i>NotI</i> -Verdau, Klenow-fill-in und Religation	diese Arbeit
pHBT-BZI-1	pHBT-Derivat, enthält das <i>BZI-1</i> -Gen	diese Arbeit
pHBT-BZI-1-ΔN	pHBT-Derivat, enthält das <i>BZI-1-ΔN</i> -Gen	diese Arbeit
pHBT-sGFP	pHBT-sGFP-Derivat (Sheen, unveröffentlicht), enthält das <i>sGFP-S65T</i> -Gen zwischen dem HBT-Promotor und dem <i>NOS</i> -Terminator, zusätzliche <i>KpnI</i> und <i>EcoRI</i> Schnittstellen vor der <i>BamHI</i> Schnittstelle; Amp <sup>r</sup>	Nickolov, unveröffentlicht
pHBT-VP16-BZI-1	pHBT-Derivat, enthält das <i>VP16-BZI-1</i> -Fusionsgen	diese Arbeit
pKVPL	pUC57-T-Derivat, enthält Sequenz, die für die VP16 Aktivierungsdomäne mit vorangestellter Kozaksequenz und anschließender Peptidlinkersequenz codiert	Lenk, 2001
pTTC-GUS	pTTL-GUS-Derivat, enthält C-Box im Promotorbereich	diese Arbeit
pTTCM-GUS	pTTL-GUS-Derivat, enthält mutierte C-Box im Promotorbereich	diese Arbeit

pTTG-GUS	pTTL-GUS-Derivat, enthält G-Box im Promotorbereich	diese Arbeit
pTTGM-GUS	pTTL-GUS-Derivat, enthält mutierte G-Box im Promotorbereich	diese Arbeit
pTTL-GUS	enthält ein Minimalpromotor-GUS-Reportergenkonstrukt; Amp <sup>r</sup>	Krawczyk et al., 2002
pUC5'BZI-1	pUC57-T-Derivat, enthält ein 279 bp PCR-Fragment, das für den N-Terminus von BZI-1 codiert	diese Arbeit
pUC57-T	pUC57-Derivat, mit <i>EcoRV</i> linearisiert und ddT-Überhängen an den 3'-Enden versehen. Klonier- und Sequenziervektor für PCR-Produkte; lacZ $\alpha$ , Amp <sup>r</sup>	MBI Fermentas

### 3.2.2 Hybridisierungssonden

Alle hier aufgelisteten Fragmente stammen aus *N. tabacum*.

Sonde	Eigenschaften	Referenz
<i>ACTIN</i>	0,8 kb Fragment der <i>ACTIN</i> -cDNA	Thangavelu et al., 1993
<i>ARCA</i>	1 kb PCR-Fragment des <i>ARCA</i> -Gens unter Verwendung der Primer <i>ARCA</i> upper und <i>ARCA</i> lower	Ishida et al., 1993
<i>BZI-1</i>	0,5 kb <i>XhoI</i> / <i>PstI</i> Fragment der <i>BZI-1</i> -cDNA	diese Arbeit
<i>BZI-4</i>	<i>XbaI</i> / <i>Acc65I</i> Fragment der <i>BZI-4</i> -cDNA	Strathmann et al., 2001
<i>CHS</i>	1 kb <i>XbaI</i> / <i>PstI</i> Fragment des <i>CS2</i> -Gens	Drews et al., 1992
<i>DEF</i>	1 kb <i>EcoRI</i> Fragment der <i>DEF</i> -cDNA	Davies et al., 1996
<i>GH3</i>	0,9 kb PCR-Fragment des <i>GH3</i> -Gens unter Verwendung der Primer <i>N.t.GH3</i> upper und <i>N.t.GH3</i> lower	Roux und Perrot-Rechenmann, 1997
<i>HIB</i>	1,3 kb <i>EcoRI</i> Fragment der <i>HIB</i> -cDNA	Szekeres et al., 1995
<i>HIC</i>	0,9 kb <i>BamHI</i> / <i>KpnI</i> Fragment der <i>HIC</i> -cDNA	Prymakowska-Bosak et al., 1999
<i>HPT</i>	1 kb <i>BglIII</i> / <i>BamHI</i> Fragment aus dem Plasmid pBinHygTx	Rieping et al., 1994
<i>NIN88</i>	0,5 kb <i>MunI</i> Fragment der <i>Nin88</i> -cDNA	Goetz et al., 2001
<i>NPT</i>	1 kb <i>Bsp119I</i> / <i>NheI</i> Fragment aus dem Plasmid pBin19	Becker, 1990
<i>PAL</i>	2,4 kb PCR-Fragment des <i>PAL2</i> -Gens	Pellegrini et al., 1994
<i>PARA</i>	0,7 kb PCR-Fragment des <i>PARA</i> -Gens unter Verwendung der Primer <i>PARA</i> upper und <i>PARA</i> lower	Takahashi et al., 1989
<i>PARC</i>	0,7 kb PCR-Fragment des <i>PARC</i> -Gens unter Verwendung der Primer <i>PARC</i> upper und <i>PARC</i> lower	Takahashi et al., 1992
<i>PR-1a</i>	0,5 kb <i>EcoRI</i> / <i>BamHI</i> Fragment der <i>PR-1a</i> cDNA	Cutt et al., 1988



### 3.2.3 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden nach Vorgabe der Basensequenz synthetisiert und in lyophilisierter Form geliefert.

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'
ARCA lower	TTC ATC CTA ATA ACG GTC AAT ACC CCA CAC TC
ARCA upper	GAG TGT GGG GTA TTG ACC GTT ATT AGG ATG AA
BZI-1-ZIP-for	GGT TTC TCA ACT CAG AGT AG
BZI-1-ZIP-rev	CTA CTC TGA GTT GAG AAA CC
C-box for	AAT TCT CCC TTA TCT GAC GTC AGC ATC CGG A
C-box rev	CTA GTC CGG ATG CTG ACG TCA GAT AAG GGA G
C-mut for	AAT TCT CCC TTA TCT GAC TGT AGC ATC CGG A
C-mut rev	CTA GTC CGG ATG CTA CAG TCA GAT AAG GGA G
G-box for	AAT TCT CCC TTA TTC CAC GTG GCC ATC CGG A
G-box rev	CTA GTC CGG ATG GCC ACG TGG AAT AAG GGA G
G-mut for	AAT TCT CCC TTA TTC CAC TGT GCC ATC CGG A
G-mut rev	CTA GTC CGG ATG GCA CAG TGG AAT AAG GGA G
GUS	TCG CGA TCC AGA CTG AAT GCC CAC
M13 reverse	GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG
M13 universal	AGG GTT TTC CCA GTC ACG ACG TT
N.t.GH3 lower	CAA AAT AAC CCA TGT TTG GCA TG
N.t.GH3 upper	CCT CAC TAG CTC TGG AAC GTC AG
P40	GCC GGT ACC TCC ACT TCA TCT C
P45	CAT TCT CCT TAC ACG TTT TGC ATC AGC TG
P47	GAT TCT CAT CCT TGA TCT CCA CGA CGT C
P48	CTC TGA TCC TTT GTC GTG AGC TGT AGA G
P49	CTC TAC AGC TCA CGA CAA AGG ATC AGA G
P50	CAA CCA GTG GTT CAT CTA GAG AGC AAT CTG
P51	ATG GAK MGS GTM TTC TCM RTG GAS GA
P57	AGA TGC TCC AAG CTA GCA ACC CGC TGC
PARA lower	CTG CAG TAG GTA AGA AGT GTT TCT TGT TCA AGC AAG
PARA upper	CTT GCT TGA ACA AGA AAC ACT TCT TAC CTA CTG CAG
PARC lower	AGA TCT TTA CTC AAG TCC AAA CTT CTG CC
PARC upper	GAT ATC ATG GCG AAC GAA GAG GTG ATT CTG

### 3.2.4 DNA-Längenstandards

Als Fragmentlängenstandard wurden bei der Gelelektrophorese folgende DNA-Größenmarker verwendet:

- $\lambda$ PstI
- MBI Fermentas Generuler™ 100 bp Ladder Plus
- MBI Fermentas Generuler™ 1 kb Ladder

### 3.3 Proteine

#### 3.3.1 Proteinstandards

Zur Ermittlung des Molekulargewichts von Proteinen wurde die "BENCHMARK™ Prestained Protein Ladder" (GIBCO BRL) verwendet.

#### 3.3.2 Antiseren

Bezeichnung	Spezifität	Eigenschaft	Verdünnung	Referenz
$\alpha$ HA	HA-Epitoptag (AS:YPYDVPDYA)	monoklonal, aus Maus	1 : 800	Santa Cruz
anti mouse Ig	Maus-Immunglobulin	polyklonal, aus Esel, Peroxidase gekoppelt	1 : 5000	Amersham
anti rabbit Ig	Kaninchen- Immunglobulin	polyklonal, aus Esel, Peroxidase gekoppelt	1 : 10000	Amersham
$\alpha$ BZI-1	BZI-1	polyklonal, aus Kaninchen	1 : 2000	Kuhlmann, 2002
$\alpha$ HMG	High Mobility Group (HMG) Proteine	polyklonal, aus Kaninchen	1 : 1000	Schulze, Göttingen

### 3.4 Nährmedien und Zusätze

#### 3.4.1 Pflanzenmedien

- **MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962):** 4,59 g/l Murashige und Skoog Medium, 20 g/l Saccharose, 7 g/l Select-Agar; pH 5,7 mit KOH
- **B5-Infektionsmedium:** 3,5 g/l Gamborgs B5 Medium, 30 g/l Saccharose, 3,15 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 2,35 mM Mes; pH 5,7 mit KOH
- **SHI-Medium:** 4,59 g/l Murashige und Skoog Medium, 16 g/l Glucose, 7 g/l Select-Agar; pH 5,7 mit KOH; nach dem Autoklavieren steril hinzufügen: 1 mg/l 6-BAP, 0,2 g/l NAA, 0,5 g/l Cefotaxim sowie das entsprechende Selektionsantibiotikum
- **Kallusinduktionsmedium:** 4,59 g/l Murashige und Skoog Medium, 30 g/l Saccharose, 7 g/l Select-Agar; pH 5,7 mit KOH; nach dem Autoklavieren Zugabe von Kinetin (Endkonzentration 0,1 mg/l) und NAA (Endkonzentration 0,5 mg/l)
- **Suspensionskulturmedium:** 4,59 g/l Murashige und Skoog Medium, 30 g/l Saccharose, 0,9 g/l Myo-Inositol, 0,9 g/l Thiamin; pH 5,7 mit KOH

- **Hydroponische Nährlösung:** 2 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 3 mM  $\text{KNO}_3$ , 1 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 mM  $\text{Na}_2\text{-Fe-EDTA}$ , Trace-Elemente (Randall und Bourma, 1973)

### 3.4.2 Bakterienmedien

- **dYT:** 20 g/l Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl; pH 7,0 mit NaOH
- **LB:** 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl; pH 7,0 mit NaOH
- **YEB:** 10 g/l Beefextrakt, 2 g/l Hefeextrakt, 5 g/l Pepton, 5 g/l Saccharose, 2 mM  $\text{MgSO}_4$ ; pH 7,0 mit NaOH
- **King's B:** 20 g/l Peptose Peptone #3, 1% (v/v) Glycerol, 8 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 6 mM  $\text{MgSO}_4$ ; pH 7,2 mit KOH

Festmedium: Zufügen von 15 g Bacteriological Agar je Liter Flüssigmedium

### 3.4.3 Zusätze

Substanz	Endkonzentration	Stammlösung
Ampicillin	100 mg/l	100 mg/ml $\text{H}_2\text{O}$
Kanamycin	50 mg/l	50 mg/ml $\text{H}_2\text{O}$
2,4 D	versuchabhängig	1,1 mg/ml 70 % Ethanol
NAA	versuchabhängig	1,0 mg/ml DMSO
6-BAP	versuchabhängig	1,0 mg/ml 70 % Ethanol
Kinetin	versuchabhängig	1,0 mg/ml 70 % Ethanol
IPTG	50 mg/l	23,8 mg/ml $\text{H}_2\text{O}$
X-Gal	40 mg/l	20 mg/ml DMF
Chlortetracyclin	10 mg/l	1 mg/ml $\text{H}_2\text{O}$
Cefotaxim	500 mg/l	250 mg/ml $\text{H}_2\text{O}$
Hygromycin B	40 mg/l	50 mg/ml Methanol

### 3.5 Allgemeine Puffer und Lösungen

- **SSC (20 x):** 2 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat; pH 7,0 mit HCl
- **TAE (20 x):** 0,8 M Tris, 2,3 % (v/v) Essigsäure, 20 mM EDTA
- **TBE (10 x):** 1 M Tris, 1 M Borsäure, 20 mM EDTA
- **TBS:** 50 mM Tris, 150 mM NaCl; pH 7,6 mit HCl
- **TBS-T:** TBS, 0,1% (v/v) Tween20
- **TE:** 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8,0 mit HCl

### 3.6 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller/Lieferant
Autoklav	3870 ELV	Tuttnauer
Bioimager (Phosphoimager)	BAS-1000	Fuji
Elektroporationsgerät	Gene Pulser II	BIORAD
Feinwaage	1207 MP2	Sartorius
Fluorometer	Cytofluor™ II	Perseptive
Geldokumentationsstation		MWG Biotech
Gelelektrophoresekammer, horizontal		Werkstatt der Universität
Gelelektrophoresekammer, vertikal	Joey™ JGC-4,	AGS
Gelelektrophoresekammer, Sequenziergel	CastAway	Stratagene
Geltrockner	Phero-Temp	Biotec-Fischer
Heizblock		Boekel Scientific
Heizrührer	RCT-Basic	IKA Labortechnik
Hybridisierungsschrank	Hy-St-1	Bachofer
Hybridisierungswasserbad	Belly Dancer	Stovall
Inkubationsschrank		WTC Binder
Klimaschrank		Percival Scientific
Kühlzentrifuge / Rotor	Sorvall RC 5BPlus / SS34	DuPont
Netzgeräte	EC 250-90, EC 105	EC Apparatus Corp.
PCR-Gerät	MiniCycler™PTC-150	MJ Research
Peristaltikpumpe	Cyclo 1	Roth
pH-Meter	HI 9321	Hanna Instruments
Photometer	720 LC	Kontron
RNA-/DNA-Calculator	GenQuant II	Pharmacia
Semi-Dry-Blot-Apparatur		Werkstatt der Universität
Sequenzanalysegerät	ABI Prism 310	Perkin-Elmer
Speed vac	SK 100	Sarvant
Spektralphotometer für Microtiterplatten	MRX Dynex Plate Reader	Dynex
Sterilbank	Microflow Laminar	Nunc
Tischzentrifuge	Biofuge pico	Heraeus
Tischzentrifuge, kühlbar	5403	Eppendorf
UV-Transilluminator	FLX-20 M	Vilber Lourmat
Vakuumpumpe		Brand
Vortex	L46	Labinco BV
Waagen	SPO51, SAC62	Scaltec
Wasseraufbereitungsanlage	Option 4, Maxima	ELGA
Zentrifuge, Ausschwingrotor	Universal 16A	Hettich

### 3.7 Verbrauchsmittel

Produkt	Hersteller/Lieferant
Elektroporationsküvetten	BioRad
Filter Cellulose-Nitrat (Porengröße 0,2 µm)	Sartorius
Fließpapier 3MM	Schleicher & Schuell
Gläser zur sterilen Pflanzenanzucht	Weck
Glasmaterialien	Brand, Schott
Kunststoff-Einwegmaterial	Eppendorf, Greiner, Sarstedt
Micro Spin™ G25 Column	Pharmacia
Microtiterplatten	Nunc, Roth
Nylon-Membran Hybond™-N	Amersham Life Science
Parafilm N	American National Can
PVDF-Transfer-Membran Immobilon™-P	Millipore
Röntgenfilme Cronex	DuPont

### 3.8 Chemikalien

Produkt	Hersteller
α-Naphthalinessigsäure (NAA)	Sigma
2,4 Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D)	Sigma
4-Methylumbelliferyl (4-MU)	Sigma
4-Methylumbelliferyl-β-D-Glucuronid (4-MUG)	Roth; Duchefa
6-Benzylaminopurin (6-BAP)	Sigma
Agar Bacteriological	GIBCO BRL Life Technol.
Agarose SeaKem LE	Biozym
Ampicillin	AGS
BioRad-Protein-Assay	BioRad
BSA (Bovine Serum Albumine)	Roth
Cefotaxim	Duchefa
Chlortetracyclin	Sigma
dNTPs	Roth, MBI Fermentas
Ethidiumbromidlösung 1%	Roth
Gamborg's B5-Medium	Sigma
Hygromycin	Duchefa
Kanamycin	Sigma
Milchpulver	Glücksklee
Murashige & Skoog-Medium	Duchefa
Pepton	Roth
Röntgenfilm Entwickler LX24	Kodak
Röntgenfilm Fixierer AL4	Kodak
Select Agar	GIBCO BRL Life Technol.
Sephadex G-50	Pharmacia
Triton X-100	Roth
TWEEN 20	Sigma

Nicht aufgeführte Standardchemikalien wurden von den Firmen Merck, Roth, Boehringer, Fluka oder Sigma bezogen.

### 3.9 Radiochemikalien

Für die in dieser Arbeit dargestellten Experimente wurde [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dATP mit der spezifischen Aktivität von 800 Ci/mmol, sowie [ $\gamma$ - $^{33}$ P] ATP mit der spezifischen Aktivität von 3000 Ci/mmol verwendet.

### 3.10 Kits

Kit	Hersteller
BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin-Elmer
displayPROFILE™ -BASIC Kit	Display Systems Biotech/ Q-BIOGENE
displayPROFILE™ -PROBE Kit	Display Systems Biotech/ Q-BIOGENE
Eu1-16, Eu17-32, Eu33-48	Q-BIOGENE
DNeasy Mini Kit	Qiagen
Enhanced Chemiluminescence Kit ECL™	Amersham
Oligotex™	Qiagen
pGEM® -T Vector System	Promega
Plasmid-Preparation Kit (Midi, Maxi)	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
RNeasy Plant Mini Kit	Qiagen
T-cloning Kit	MBI Fermentas

### 3.11 Enzyme

Enzym	Hersteller
Cellulase „Onozuka R-10“	Serva
Alkalische Phosphatase (CIAP)	MBI Fermentas
Klenow-DNA-Polymerase (exo <sup>-</sup> )	MBI Fermentas
Lysozym	Serva
Macerozym R-10	Serva
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, NEB
RNase A (DNase frei)	Qiagen
Taq-Polymerase	Q-BIOGENE
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas

## **4 Methoden**

### **4.1 Bakterienkulturen**

#### **4.1.1 Kultivierung von *Escherichia coli***

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in LB- oder dYT-Medium bei 37 °C über Nacht.

#### **4.1.2 Kultivierung von *Agrobacterium tumefaciens***

Die Anzucht von *A. tumefaciens* erfolgte in YEB-Medium bei 28 °C für 2 Tage.

#### **4.1.3 Kultivierung von *Pseudomonas syringae***

Die Anzucht von *P. syringae* erfolgte in King's B Medium bei 28 °C für 1-2 Tage.

### **4.2 Pflanzenkulturen**

#### **4.2.1 Kultivierung von Tabakpflanzen in Sterilkultur**

Steril in Anzuchtgläsern gewachsene Tabakpflanzen wurden vegetativ vermehrt, indem unter sterilen Bedingungen die Sproßspitze mit einem Skalpell abgetrennt und auf MS-Festmedium überführt wurde. Die Anzucht erfolgte im Pflanzenklimaraum oder Pflanzenklimaschrank bei 24 °C unter Langtagbedingungen, d. h. 16 h Tag, 8 h Nacht.

#### **4.2.2 Kultivierung von Tabakpflanzen in Erde und in hydroponischer Nährlösung**

Pflanzen aus Sterilkulturen wurden nach vorsichtigem Abwaschen des Nährmediums in Pikiererde mit einem hohen Sandanteil gesetzt und im Pflanzenklimaraum angezogen. Regelmäßiges Umtopfen erfolgte dann in normaler Anzucherde.

Tabakpflanzen wurden auch in hydroponischer Lösung kultiviert. Die Wurzeln der Pflanzen wurden dabei mit Nährlösung und Luft umspült. Die Nährlösung wurde wöchentlich ausgetauscht, um eine Veralgung zu verhindern.

### **4.2.3 Pfropfung von Tabakpflanzen**

Tabakpflanzen wurden gepfropft, indem der Stengel junger Tabakpflanzen mit einer Skalpellklinge diagonal durchtrennt wurde und auf der Schnittfläche der obere Sproßteil einer anderen ebenso durchtrennten Tabakpflanze fixiert wurde. Nach einigen Tagen Kultivierung bei hoher Luftfeuchtigkeit, um ein Austrocknen der Schnittflächen zu verhindern, sind die beiden Pflanzenteile miteinander verwachsen.

### **4.2.4 Anzucht und Kultivierung von Tabaksuspensionskulturen**

Tabaksuspensionskulturen wurden gewonnen, indem sterile Blattscheiben auf Kallusinduktionsmedium ausgelegt wurden. Die Blattscheiben wurden drei bis sechs Wochen im Dunkeln bei 24 °C inkubiert. Das gebildete Kallusgewebe wurde steril mit einer Pinzette zerkleinert und in Erlenmeyerkolben mit Suspensionskulturmedium überführt. Die Kultivierung erfolgte auf einem Schüttler mit ca. 110 rpm im Dunkeln bei 24 °C. Die Suspensionskulturen wurden wöchentlich subkultiviert, indem 1:50 Volumen in frisches Suspensionskulturmedium überführt wurde.

## **4.3 Induktion und Infektion von *N. tabacum***

### **4.3.1 Induktion von Tabakpflanzen in hydroponischer Kultur**

In Hydroponik angezogene Tabakpflanzen wurden durch Zugabe von Chlortetracyclin (Tc) aus einer Stammlösung (1 mg/ml in H<sub>2</sub>O) zu einer Endkonzentration von 10 mg/l induziert. Die Tc-Aufnahme erfolgte dabei über die Wurzeln. Die Tc-haltige Nährlösung wurde alle zwei Tage ausgetauscht, um eine Veralgung der Wurzeln zu verhindern.

### **4.3.2 Induktion von Tabak-Blattscheiben**

Zur Induktion der Genexpression im Tabakblattgewebe wurden ca. 4-6 Wochen alte in Erde oder hydroponischer Nährlösung kultivierte Tabakpflanzen verwendet. Für die Induktionsversuche wurden Blattscheiben (Ø 2.6 cm) mit einem Korkbohrer ausgestochen. Alle Induktionssubstanzen waren in 50 mM Kaliumphosphat bei einem pH-Wert von 5,8 gepuffert. Die Induktionschemikalien wurden unmittelbar vor dem Start des Versuches zugesetzt. Die Induktion des Blattgewebes erfolgte in Petrischalen und wurde durch Zugabe des Puffers mit der Induktionssubstanz gestartet. Die entnommenen Proben



wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

#### **4.3.3 Infiltration von Tabakgewebe**

Um eine möglichst schnelle und gleichmäßige Tc-Induktion in verschiedenen Tabakgeweben zu erreichen, wurde das Gewebe unter Vakuum für 2 min in Tc-haltigem Kaliumphosphatpuffer (10 mg/l Tc in 50 mM KPO<sub>4</sub>, pH 5,8) infiltriert, belüftet und über den Versuchszeitraum im Puffer belassen.

#### **4.3.4 Induktion von Tabaksuspensionskulturen mit Tc**

Drei Tage nach Subkultivierung der Suspensionskultur wurde Tc aus einer Stammlösung (1 mg/ml in H<sub>2</sub>O) zu einer Endkonzentration von 10 mg/l zum Suspensionskulturmedium gegeben.

#### **4.3.5 Infektion von Tabakpflanzen mit dem Tabak-Mosaic-Virus (TMV)**

Die Infektion von Tabakpflanzen mit dem Tabak-Mosaic-Virus erfolgte im Pflanzenklimaschrank an 6-8 Wochen alten Tabakpflanzen, die in Erde kultiviert wurden. Zur Infektion wurden pro Blatt 5 mg TMV, gelöst in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7, mit Carborundum und Wattepadps vorsichtig auf der Blattoberseite aufgerieben (Yalpani et al. 1991). Um in TMV-resistenten Tabakkultivaren eine induzierte HR auszulösen, wurden die Pflanzen vor der Infektion für zwei Tage bei 32 °C vorinkubiert. Bei dieser Temperatur ist die Erkennung des Virus in der Pflanze nicht möglich. Nach der Infektion erfolgte dann die Ausbreitung des Virus für vier weitere Tage ebenfalls bei 32 °C. Durch Herabsenken der Temperatur auf 24 °C erfolgte dann das Auslösen der HR in allen Pflanzengeweben, in denen sich das Virus verbreitet hatte (Malamy, et al., 1992).

#### **4.3.6 Infektion von Tabaksuspensionskulturen mit Pseudomonaden**

Tabaksuspensionskulturen wurden 3 Tage nach Subkultivierung für bakterielle Infektionen mit  $5 \times 10^7$  c.f.u./ml einer Übernachtskultur von *P. syringae* pv. *pisi* versetzt.

## 4.4 Molekulargenetische Methoden

### 4.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

#### 4.4.1.1 Mini-Lyse zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Bei der Mini-Lyse handelt es sich um eine schnelle Methode zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen. Die Methode folgt den Protokollen von Le Gouill et al. (1994) und Sambrook et al. (1989). Hierzu wurden die plasmidtragenden Zellen über Nacht in 5 ml selektivem dYT-Medium angezogen. Nach Zentrifugation (13000 rpm, 1 min, RT) wurden die Zellen in 100 µl Lösung I (50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris/HCl, pH 8,0) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 200 µl Lösung II (0,2 M NaOH, 1 % (w/v) SDS) und 200 µl Chloroform lysiert. Durch sofortiges vorsichtiges Schwenken erfolgte die Vermischung der Zusätze und die vollständige Lyse der gesamten Zellsuspension. Direkt danach wurden 150 µl eiskalte Lösung III (3 M Kaliumacetat, 5 % (v/v) Ameisensäure) hinzugefügt. Durch sofortiges Schwenken wurde eine schlagartige Neutralisierung der Suspension erzielt, die der effizienten Fällung chromosomaler DNA diene. Nach Zentrifugation (13000 rpm, 2 min, RT) wurde der Überstand mit 450 µl PCI-Mix versetzt und extrahiert. Zur Abtrennung der proteinhaltigen organischen Phase wurde 3 min zentrifugiert (13000 rpm, RT). Der wässrige Überstand mit der Plasmid-DNA wurde mit 900 µl 96 % Ethanol gefällt und mittels Zentrifugation (10 min, 13000 rpm, RT) pelletiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und nach kurzem Trocknen bei RT in 50 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert.

#### 4.4.1.2 Modifikation der Mini-Lyse zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Agrobakterien

Zur Isolierung der binären Vektoren aus *A. tumefaciens* wurden 10 ml einer stationären Kultur eingesetzt. Da Agrobakterien von einer Schleimhülle umgeben sind, muß diese vor Beginn der Plasmidisolierung entfernt werden. Dies geschah durch Behandlung des Bakterienpellets mit 100 µl einer 0,2 %igen Sarcosyllösung (0,2 % (v/v) N-Laurylsarcosine in H<sub>2</sub>O) und erneutem Zentrifugieren. Das weitere Vorgehen folgte dem Mini-Lyse-Protokoll, in Abwandlung dazu erfolgte die Phenol-Chloroform-Extraktion zweimal und das Pellet wurde abschließend in 20 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert.

#### **4.4.1.3 Qiaprep**

Zur schnellen Isolierung kleiner und sauberer Mengen DNA aus Bakterien wurde auch das Qiaprep Spin Miniprep Kit verwendet. Zur Gewinnung von Plasmid-DNA in größeren Mengen wurde das Qiagen Plasmid Midi oder Maxi Kit verwendet. Die Isolierung erfolgte jeweils nach den Vorschriften des Herstellers.

#### **4.4.2 Ethanolfällung von DNA aus wässrigen Lösungen**

Um DNA aus wässrigen Lösungen von Salzen zu reinigen und um eine definierte Konzentration zu erreichen, wurde sie einer Ethanolfällung unterzogen. Dabei wurde der DNA-Lösung 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5,2 zugegeben und mit zwei Volumen 100 % Ethanol gemischt. Die DNA fällt aus, während Salze und Verunreinigungen gelöst bleiben. Die Fällung erfolgte bei -20 °C für mindestens zwei Stunden. Danach wurde die DNA für 20 Minuten bei 13.000 rpm pelletiert, mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in einem definierten Volumen H<sub>2</sub>O gelöst.

#### **4.4.3 Isolierung von DNA aus Tabak**

Zur Isolierung von DNA aus Tabak wurde das Qiagen DNeasy Mini Kit verwendet. Dabei wurde die DNA aus 200 mg Blattmaterial unsteril gewachsener Tabakpflanzen nach Herstellerangaben extrahiert.

#### **4.4.4 Isolierung von RNA aus Tabak**

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Tabak wurde das RNeasy Mini-Kit der Firma Qiagen verwendet. Zur Gewinnung von polyA<sup>+</sup> mRNA wurde Gesamt-RNA im Qiagen Oligotex Mini Kit eingesetzt. Die Isolierung folgte jeweils den Herstellerangaben.

#### **4.4.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA in wässriger Lösung erfolgte photometrisch am GeneQuant II. Eine OD<sub>260</sub> von 1 entspricht einer Nukleinsäurekonzentration von 50 µg/ml dsDNA bzw. 40 µg/ml RNA oder ssDNA. Das Absorptionsmaximum der aromatischen Seitenketten von Proteinen wird bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Der Quotient der beiden Werte OD<sub>260</sub> : OD<sub>280</sub>, stellt ein Maß für den Reinheitsgrad der Nukleinsäure dar. Zur Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA wurden 1:100 Verdünnungen gegen H<sub>2</sub>O gemessen.

#### 4.4.6 Auftrennung von DNA in Agarosegelen

DNA-Moleküle sind aufgrund ihres Phosphatrückgrates negativ geladen. In einem elektrischen Feld wandern sie demnach zur Anode. In einer Agarosematrix können sie so unter Anlegen einer Spannung (ca. 100 V) nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Als 10 x DNA-Probenpuffer wurde 67 % (w/v) Saccharose, 50 mM EDTA, 0,42 % (w/v) Bromphenolblau, 0,42 % (w/v) Xylencyanol verwendet. Nach Beendigung des Gellaufs wurden die DNA-Moleküle durch 5 min Färben in einer Ethidiumbromidlösung (0,1 % (w/v)) und 5 min Wässern sichtbar gemacht. Dabei lagert sich Ethidiumbromid als interkalierendes Agens in die DNA ein. Die fluoreszierenden DNA-Fragmente können so auf dem Transilluminator unter kurzwelligem UV-Licht ( $\lambda = 302 \text{ nm}$ ) betrachtet und fotografisch dokumentiert werden. Zur Verbesserung der Auflösung von kleinen DNA-Fragmenten (80-400 bp) wurde der 1 %igen Agarose-TAE-Lösung 0,7% (w/v) Hydroxyethylcellulose (HEC) zugesetzt.

#### 4.4.7 Auftrennung von DNA in Polyacrylamidgelen

Kleine DNA-Fragmente (bis ca. 200 bp) und Oligonukleotide wurden zur Analyse in einem nativen Polyacrylamidgel aus 5 % (w/v) Acrylamid:BIS (19:1), 10 % (v/v) Glycerin, 1 x TBE, 0,04 % (v/v) TEMED und 0,06 % (w/v) APS aufgetrennt. Nach Beendigung des Gellaufs wurden die DNA-Moleküle durch 5 min Färben in einer 0,1 %igen (w/v) Ethidiumbromidlösung und 5 min Wässern sichtbar gemacht.

#### 4.4.8 Auftrennung von RNA in denaturierenden Agarosegelen

RNA-Moleküle können durch Rückfaltung ihr Laufverhalten im Agarosegel erheblich verändern. Um eine größenabhängige Auftrennung zu gewährleisten, unterzieht man sie einer denaturierenden Agarosegelelektrophorese unter Verwendung von Formaldehyd und Formamid. Ein denaturierendes RNA-Gel wird hergestellt, indem man 1,4 g Agarose in 105 ml H<sub>2</sub>O aufkocht und unter Rühren auf ca. 60 °C abkühlen läßt. Dann gibt man 14 ml 10 x MEN-Puffer (200 mM MOPS, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA; pH 7,0 mit NaOH) und 21 ml 37 % Formaldehyd hinzu. Der Laufpuffer besteht aus 1 x MEN. Die RNA-Proben wurden in Eppendorfgefäßen mit H<sub>2</sub>O auf gleiche Konzentration zu einem Endvolumen von 30 µl aufgefüllt und mit 30 µl 2 x Denaturierungspuffer (20 % (v/v) MEN, 8 % (v/v) Glycerin, 56,7 % (v/v) Formamid, 5 % (v/v) Formaldehyd, 0,001 % (w/v) Bromphenolblau, 0,1 % (w/v) Ethidiumbromid, 4 mM EDTA pH 7,5) versetzt. Das

Denaturieren der RNA-Proben erfolgte für 15 min bei 65 °C, bis zum Auftragen wurden diese auf Eis gelagert.

#### **4.4.9 Elution von DNA aus Elektrophoresegelen**

Die Elution von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit dem Qiagen Gel-Extraction Kit nach Herstellerangaben.

Die Elution von DNA aus Polyacrylamidgelen erfolgte nach Färbung im Ethidiumbromidbad durch Ausschneiden des Fragments und Lösen in 50-100 µl TE-Puffer durch Inkubation bei 37 °C über Nacht.

#### **4.4.10 Restriktionsspaltung von DNA**

Restriktionsendonukleasen vom Typ II spalten doppelsträngige DNA innerhalb spezifischer Erkennungssequenzen. Je nach Enzym entstehen dabei glatte („blunt“) oder überstehende (sticky) Enden. Die für die verschiedenen Restriktionsenzyme optimalen Reaktionsbedingungen wurden mit dem Puffersystem der Firma MBI Fermentas eingestellt. Die Aktivität der Restriktionsendonukleasen wird in „Units“ U angegeben, wobei mit 1 U die Enzymmenge definiert ist, die 1 µg λ-DNA (48,5 kb) innerhalb von 1 h unter optimalen Bedingungen vollständig spaltet. Die DNA wurde in der Regel in einer Endkonzentration von 0,1 µg/µl mit 2 U Enzym/µg DNA für 1-2 h inkubiert.

#### **4.4.11 Dephosphorylierung von DNA-Enden**

Um Religationen von restriktionsgespaltenen Vektoren zu vermeiden, wurde der Reaktionsansatz im Anschluß an die Spaltung mit alkalischer Phosphatase (CIAP) entsprechend den Herstellerangaben behandelt. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch 10 minütige Inkubation bei 75 °C.

#### **4.4.12 "Klenow-fill-in"**

Das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I besitzt eine 5'-3'-Polymerase und eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität. Es kann bei Vorhandensein eines DNA-Matrizenstranges die komplementäre Polymerisation von Nukleotiden an eine freie 3'-OH-Gruppe katalysieren. Diese Reaktion wurde verwendet, um nach Restriktionsspaltungen überstehende 5'-DNA-Enden aufzufüllen. Für eine „Klenow-fill-in“-Reaktion wurden 2 µg gespaltenes Plasmid,

1,5 mM dNTP-Mix und 2 U Klenow-DNA-Polymerase eingesetzt, der Ansatz wurde für 15 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch 10 min Erhitzen auf 75 °C abgestoppt.

#### **4.4.13 Hybridisierung von Oligonukleotiden**

Um bei Klonierungen gezielte Veränderungen auf DNA-Ebene vornehmen zu können, ist es möglich, durch den Einsatz von Oligonukleotiden gewünschte Basensequenzen einzufügen. Die Oligonukleotide wurden nach Angabe der Basensequenz von der Firma MWG synthetisiert und in lyophilisierter Form geliefert. Vor Verwendung wurden die Oligonukleotide in H<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 10 pmol/μl gelöst und die beiden komplementären Stränge danach hybridisiert. Das geschah durch Denaturieren des Ansatzes für 10 min bei 100 °C. Das Annealing der Oligonukleotide erfolgte durch schrittweises Abkühlen des Ansatzes für 15 min auf 65 °C, für 15 min auf 37 °C und abschließend für 15 min auf RT.

#### **4.4.14 Ligation von DNA-Fragmenten**

Das Enzym T4-DNA-Ligase ist in der Lage, DNA-Fragmente mit überstehenden komplementären bzw. glatten Enden miteinander kovalent zu verknüpfen, sofern eines der beiden Fragmente eine endständige 5'-Phosphatgruppe trägt. Als Cosubstrat muß ATP in geeigneter Konzentration im Puffermedium vorliegen. Das zu inserierende DNA-Fragment wurde in 10-fachem (bei Oligonukleotiden bis 100-fachem) molarem Überschuß zu der gespaltenen Vektor-DNA (ca. 50 fmol) zugegeben. Die Ligation erfolgte im Ligationspuffer mit 3 Units T4-DNA-Ligase. Bei „blunt-end“ Ligationen wurde zusätzlich 5 % (w/v) PEG 4000 in den Reaktionsansatz gegeben. Die Ligationensätze mit einem Endvolumen von 15 μl wurden für mindestens 1 h bei RT inkubiert.

#### **4.4.15 Radioaktive Markierung von DNA**

Die Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden erfolgte nach der „Random-Prime- Labelling Methode“ (Feinberg und Vogelstein, 1982). Ausgehend von Hexanukleotidprimern mit einer zufälligen Sequenz erfolgt dabei die Gegenstrangsynthese an der Sondenmatrize durch die Klenow-DNA-Polymerase. Dabei wird neben nicht radioaktiv markierten Nukleotiden auch [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dNTP eingebaut. Ein Reaktionsansatz wurde wie folgt hergestellt:

25 – 50 ng Sonden-DNA und 2,5 µg Randomprimer (Gibco) wurden mit H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 25 µl aufgefüllt und für 5 min bei 100 °C denaturiert. Nach Abkühlen auf RT wurden Klenow-Polymerase-Puffer und je 50 µM dCTP, dTTP, dGTP sowie 25 µCi [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dATP zugefügt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 U Klenow-Polymerase (exo<sup>-</sup>) gestartet. Nach zweistündiger Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl H<sub>2</sub>O gestoppt. Nicht eingebaute Nukleotide und Primer wurden durch Gelfiltration über eine Sephadex G50-Säule abgetrennt. Als Säule diente eine 1 ml Einwegspitze, die mit einem Fließpapierkügelchen verschlossen und dann mit dem Säulenmaterial beladen wurde. Das Packen der Säule sowie die Elution der Sonde erfolgte jeweils durch Zentrifugation bei 1500 rpm für 5 min in der Hettichzentrifuge mit Ausschwingrotor. Die gereinigte Sonde wurde in einem verschraubbaren Eppendorfgefäß aufgefangen.

#### **4.4.16 Polymerase Kettenreaktion**

Mithilfe der Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) können unter Verwendung zweier gegenläufiger Primer spezifische Sequenzen eines DNA-Templates amplifiziert werden. Die als Matrize dienende Template-DNA wird zunächst denaturiert. Nach Anlagerung der Primer an die komplementären Sequenzen der DNA-Einzelstränge synthetisiert eine DNA-Polymerase komplementäre DNA-Stränge an der Matrizen-DNA. Dieser Zyklus aus Denaturieren, Primeranlagerung und DNA-Synthese wird mehrfach wiederholt.

Die Schmelztemperatur  $T_m$  eines Oligonukleotides berechnet sich nach einer empirischen Formel, die sowohl den relativen molaren GC-Gehalt (% GC), als auch die Länge der Oligonukleotide (n) berücksichtigt (Bolton und McCarthy, 1962):

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = 69,3 + 0,41 \times (\% \text{ GC}) - (650/n)$$

##### **4.4.16.1 PCR zur Charakterisierung rekombinanter Klone**

Zur Charakterisierung rekombinanter Klone wurde das DNA-Insert mit Hilfe geeigneter Primer amplifiziert. Die PCR-Reaktion erfolgte in einem Volumen von 25 µl in 1 x Taq-Puffer mit jeweils 10 pmol Primer, 0,2 mM dNTPs und 1,5 U Taq Polymerase. Als DNA-Template wurde 1,0 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Zum Analysieren vieler Bakterienklone wurden die zu testenden Kolonien jeweils in ein Eppendorfgefäß überführt, in 100 µl H<sub>2</sub>O suspendiert und dann für 5 min durch Erhitzen auf 100 °C aufgebrochen. Nach Abzentrifugieren (1 min 13000 rpm) wurden dann 2 µl des Überstandes für die PCR als

Template eingesetzt. Bei der PCR-Reaktion wurden im Thermocycler 30 Zyklen mit den Temperaturschritten 1) Denaturieren 94 °C für 30 s 2) Primeranlagerung bei  $T_m$  der Primer für 30 s, 3) Elongation für 30 s / 500 bp, 72 °C durchlaufen.

#### **4.4.16.2 PCR zur Amplifizierung genomischer DNA**

Die PCR-Ansätze zur Amplifizierung genomischer DNA enthielt neben den Standardkomponenten als Template 50 ng genomische Tabak-DNA (Kultivar Xhanti). Als erster Denaturierungsschritt wurden 94 °C für 2 min gewählt, dann folgten 35 Zyklen mit folgenden Temperaturschritten, 92 °C für 30 sec, 55 °C für 30 sec, 70 °C für 2 min.

#### **4.4.17 Sequenzierung**

Die DNA-Sequenzierung wurde am Sequenziergerät ABI PRISM 310 von Perkin Elmer nach der Didesoxymethode mit fluoresceinmarkierten Terminatoren durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte mit Hilfe des BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits. Für einen 10 µl Sequenzieransatz wurden 500 ng der zu sequenzierenden Plasmid-DNA mit 2 µl Ready Reaction Mix und 5 pmol Primer eingesetzt. Im Thermocycler wurden dann 25 Zyklen folgender Temperaturschritte durchlaufen: Denaturierung bei 94 °C für 5 sec, Primeranlagerung und Elongation bei 60 °C für 1 min. Anschließend wurde der Ansatz einer Ethanol-fällung unterzogen, um nicht verbrauchte fluoresceinmarkierte Terminatoren zu entfernen. Der Ansatz wurde mit 9,5 µl H<sub>2</sub>O und 30,5 µl 100 % Ethanol versetzt und 15 min bei RT inkubiert. Danach wurde die gefällte DNA für 15 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 50 µl 70 % Ethanol gewaschen und nach nochmaligem Abzentrifugieren 1 min bei 90 °C getrocknet, in 20 µl Template Suppression Reagenz gelöst, 3 min bei 95 °C denaturiert und auf Eis bis zur Sequenzierung aufbewahrt.

#### **4.4.18 Transformation kompetenter Bakterienzellen**

Da weder *E. coli* noch *A. tumefaciens* über ein natürliches System zur Aufnahme nackter DNA aus dem umgebenden Medium verfügen, müssen die Bakterienzellen mit geeigneten Verfahren kompetent gemacht werden.



#### 4.4.18.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Herstellung kompetenter Zellen nach einer modifizierten Methode von Inoue et al. (1990) wurden Bakterien des *E. coli*-Stammes DH5 $\alpha$  verwendet. 0,8 ml einer Übernachtskultur wurden in 40 ml LB-Medium überimpft. Die Anzucht der Kultur erfolgte bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5. Jeweils 10 ml der Kultur wurden in Greiner-Röhrchen überführt und abzentrifugiert (5 min, 6000 x g, 4 °C). Das Pellet wurde in 5 ml 50 mM CaCl<sub>2</sub> (4 °C) resuspendiert, für 30 min auf Eis inkubiert und abzentrifugiert (5 min, 6000 x g, 4 °C). Die Zellen wurden in 2 ml 50 mM CaCl<sub>2</sub> (4 °C) und 0,4 ml 87 % Glycerin aufgenommen und nach Aliquotieren (je 200  $\mu$ l) in Eppendorfgläsern in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aufbewahrung erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C.

#### 4.4.18.2 Transformation von *E. coli*

Kompetente *E. coli*-Zellen sind in der Lage nackte DNA aus dem Umgebungsmedium aufzunehmen. Mit Hilfe der nachfolgenden Methode (Hanahan, 1983) wurden *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA transformiert. Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, dann erfolgte die Zugabe der Plasmid-DNA und Inkubation für 10 min auf Eis (Anheftung der DNA an die Zellen). Durch einen Hitzeschock der Zellen für 2 min bei 42 °C erfolgte die Aufnahme der DNA. Eine Regeneration der Zellen schloß sich nach Zugabe von 0,8 ml LB-Medium für 40 min bei 37 °C an. Danach wurde der Transformationsansatz auf LB-Selektionsmedium ausplattiert.

#### 4.4.18.3 Blau-Weiß-Selektion

Eine wesentliche Erleichterung zur Identifizierung von *E. coli*-Kolonien, welche nach Transformation ein rekombinantes Plasmid tragen, bietet die Blau-Weiß-Selektion. Sie wird z. B. bei der Klonierung von PCR-Produkten mit den Vektoren pUC57-T oder pGEM-T eingesetzt. Das Verfahren beruht auf der  $\alpha$ -Komplementation des Enzyms  $\beta$ -Galaktosidase. Die ersten 146 N-terminalen Aminosäuren ( $\alpha$ -Peptid) können zusammen mit einem inaktiven Enzym, dem die Aminosäuren 11-41 fehlen, eine funktionierende  $\beta$ -Galaktosidase bilden. Das aktive Enzym hydrolysiert z.B. das Substrat X-Gal, das daraufhin durch Luftoxidation eine blaue Färbung zeigt. Bakterienstämme mit dem inaktiven Enzym können durch Aufnahme eines Plasmids, das die für das  $\alpha$ -Peptid codierende DNA trägt, X-Gal umsetzen. Als Induktor der Genexpression wurde IPTG

eingesetzt. Die zur Blau-Weiß-Selektion eingesetzten Agarplatten wurden kurz vor Gebrauch mit jeweils 50 µl der X-Gal und der IPTG-Stammlösungen beschichtet. Wird die das  $\alpha$ -Peptid codierende Sequenz durch Einbau von fremder DNA unterbrochen, so bleiben die Bakterienkolonien weiß. Bakterienklone, die kein rekombinantes Plasmid aufgenommen haben und somit das  $\alpha$ -Peptid synthetisieren, sind an ihrer Blaufärbung zu erkennen.

#### **4.4.18.4 Herstellung kompetenter Agrobakterien**

Für die Herstellung kompetenter Zellen wurden Agrobakterien des Stammes LBA 4404 verwendet. 5 ml einer Agrobakterienflüssigkultur wurden abzentrifugiert (5 min, 5000 rpm, RT) und dreimal durch Resuspendieren und erneutes Abzentrifugieren in sterilem Wasser gewaschen. Das Pellet wurde in 500 µl sterilem Wasser aufgenommen und in 100 µl Aliquots in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren.

#### **4.4.18.5 Transformation von *A. tumefaciens***

Durch Erzeugen kurzer Spannungspulse wird die Membran kompetenter Bakterienzellen permeabilisiert. Dadurch wird die Aufnahme von freier DNA aus dem Medium in die Zelle ermöglicht. Nach der Zugabe der zu transformierenden DNA zu den kompetenten Zellen wurde der Transformationsansatz in sterile Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand: 2 mm) überführt. Die Elektroporation erfolgte am GenePulser mit 2,5 kV, 25 µF, 400 Ω. Der Transformationsansatz wurde anschließend in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 1 ml LB-Medium aufgefüllt. Die Regeneration der Agrobakterien erfolgte für 2 h bei 28 °C, danach wurden sie auf YEB-Selektionsmedium ausplattiert.

#### **4.4.19 Northern Blot Analyse**

Im Northern Blot Verfahren (Sambrock *et al.*, 1989) wird die zu analysierende RNA durch eine denaturierende Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und mittels Kapillar-Blot auf eine Nylonmembran transferiert. Bei allen in dieser Arbeit gezeigten Northern Blot Analysen wurden jeweils 10-15 µg RNA eingesetzt. Die auf der Membran immobilisierte RNA kann nun durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden analysiert werden.

#### **4.4.19.1 Transfer der RNA auf Nylonmembranen**

Mittels Kapillar-Blot wurde die durch eine denaturierende Agarosegelelektrophorese aufgetrennte RNA auf eine Nylonmembran transferiert. Dazu wurden zwei Lagen Fließpapier mit 10 x SSC äquilibriert und so auf einer ebenen Glasplatte aufgebracht, daß die Enden in ein 10 x SSC-Pufferreservoir tauchen. Das RNA-Gel wurde luftblasenfrei mit der Oberseite nach unten auf das Fließpapier gelegt. Die Kanten und Taschen des Gels wurden mit Haushaltsfolie abgedeckt. Die Nylonmembran wurde luftblasenfrei auf das Gel aufgelegt, mit zwei Lagen Fließpapier und Papiertüchern bedeckt und mit einem Gewicht (ca. 500 g) gleichmäßig beschwert. Der Kapillarblot erfolgte für mindestens 14 h. Die RNA wurde durch kurze UV-Bestrahlung auf dem Transilluminator und durch zweistündige Inkubation bei 80 °C auf der Filteroberfläche fixiert.

#### **4.4.19.2 Hybridisierung der Northern Blot Membran**

Die Hybridisierung erfolgte in modifizierter Form nach der Methode von Church und Gilbert (1984). Alle Inkubationen erfolgten bei 65 °C im Rotations-Hybridisierungssofen. Die zu hybridisierende Membran wurde in Hybridisierungsröhren überführt und 45 min in 15 ml Church-Lösung (1 mM EDTA, 7 % (w/v) SDS, 0,5 M NaHPO<sub>4</sub>; pH 7,2) vorhybridisiert. Die radioaktive Sonde wurde nach 5 minütiger Denaturierung bei 100 °C im Wasserbad zugegeben. Die Inkubation erfolgte für mindestens 14 h.

#### **4.4.19.3 Waschen der Northern Blot Membran**

Nach Hybridisierung wurde die Membran standardmäßig zweimal für 15 min mit Waschlösung I aus 2 x SSC und 0,1 % (w/v) SDS und zweimal mit Waschlösung II aus 1 x SSC und 0,1 % (w/v) SDS im Hybridisierungsschüttler bei 65 °C gewaschen. Durch Waschschrte unter Verwendung von Waschlösungen unterschiedlicher Salzkonzentration werden unspezifisch bindende Sondenmoleküle entfernt. Bei hohen Salzkonzentrationen ist die Stabilität unspezifischer DNA-RNA-Hybride größer als bei geringen Salzkonzentrationen.

Nach dem Waschen wurde der Filter feucht in Haushaltsfolie eingeschweißt und in einer Expositionscassette mit einem Bioimager-Screen für einige Stunden oder Tage exponiert. Die Auswertung des Screens erfolgte am Bioimager mit dem Programm PCBAS 2.0.

#### **4.4.19.4 Rehybridisierung**

Die auf der Filteroberfläche fixierte RNA kann nacheinander mit mehreren verschiedenen Sonden hybridisiert werden. Dazu müssen die auf dem Filter befindlichen radioaktiven Sonden aus der vorhergehenden Hybridisierung durch Denaturierung der RNA-DNA-Hybride in Waschlösungen mit geringer Salzkonzentration bei hoher Temperatur abgelöst werden. Die Membran wurde durch Zugabe kochendheißer 0,1 %iger SDS-Lösung für 1 h bei 65 °C gewaschen. Danach war der Filter für eine erneute Hybridisierung einsetzbar.

### **4.5 Transformation von *N. tabacum***

#### **4.5.1 Stabile Transformation von *N. tabacum***

Die Transformation wurde nach der Methode von Horsch et al. (1985) in modifizierter Form durchgeführt. Alle Arbeitsschritte erfolgten dabei unter sterilen Bedingungen. Blätter sterilgewachsener Tabakpflanzen wurden mit Hilfe eines Skalpells in ca. 2 cm<sup>2</sup> große Stücke geschnitten und in B5-Infektionsmedium überführt. Dann erfolgte die Zugabe von 500 µl der entsprechenden Agrobakterienkultur. Der Ansatz wurde für drei Tage bei RT im Dunkeln inkubiert. Dann erfolgte ein möglichst vollständiges Abwaschen der Agrobakterien von den Blattstücken mit sterilem H<sub>2</sub>O und anschließendes Trockentupfen der Blattstücke auf sterilem Filterpapier. Die Blattstücke wurden auf antibiotika- und hormonhaltiges MS-Medium überführt und für mehrere Wochen im Pflanzenklimaschrank kultiviert. Nach Bildung von Sprossen aus einzelnen transformierten Zellen erfolgte die Regeneration ganzer Pflanzen durch Abschneiden und Umsetzen der Sprosse auf antibiotikahaltiges aber hormonfreies MS-Medium. Regenerierte transgene Pflanzen wurden dann noch zweimal durch Abschneiden der Sproßspitze vegetativ in antibiotikahaltigem Medium vermehrt. Danach wurde auf den Zusatz der Antibiotika verzichtet.

#### **4.5.2 Transiente Transfektion von *N. tabacum* Mesophyllprotoplasten**

Eine schnelle Analyse von DNA-Konstrukten kann mit Hilfe transienter Expressionstudien erfolgen, bei denen Plasmid-DNA über Elektroporation in Tabakmesophyllprotoplasten eingebracht wird (nach Leborgne-Castel et al., 1999). Als Ausgangsmaterial für die Gewinnung von Mesophyllprotoplasten dienten sterilgewachsene Tabakblätter des Kultivars SNN. Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Blattunterseite wurde nach Entfernen der Mittelrippe mit einem Skalpell in einem Abstand

von 1-2 mm eingeschnitten, ohne die Cuticula auf der Blattobenseite mit einzuschneiden. Die Blatthälften wurden mit der Unterseite auf eine Enzymlösung aus 0,2 % Macerozyme R-10 und 0,4 % Cellulase R-10 gelöst in TEX-Puffer (3,1 g/l Gamborgs B5-Medium; 0,5 g/l MES 0,75 g/l CaCl<sub>2</sub>; 0,25 g/l NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; 0,4 M Saccharose; pH 5,7 mit KOH) in eine Petrischale gelegt. Die Protoplastierung der Blätter durch die Enzymaktivität erfolgte durch Inkubation für 14 h bei 25 °C im Dunkeln. Um die Protoplasten von der Cuticula und nicht verdauten Zelltrümmern zu lösen, wurden die Ansätze vorsichtig geschüttelt und für mindestens 1 h weiter inkubiert. Danach wurden die Ansätze über ein Drahtsieb (Maschengröße 0,125 mm) gefiltert und in 50 ml Greinerröhrchen überführt. Durch Zentrifugation in einer Standzentrifuge mit Ausschwingrotor bei 60 g für 20 min wurden alle toten Zellen sedimentiert. Lebende Zellen schwimmen aufgrund ihrer geringeren Dichte in diesem Medium oben. Das Absaugen des Unterstandes und der Zelltrümmer erfolgte mit Hilfe einer Peristaltikpumpe und einer Pasteurpipette. Die Protoplasten wurden dann dreimal mit je 25 ml Elektroporationspuffer (2,4 g/l Hepes; 6 g/l KCl; 0,6 g/l CaCl<sub>2</sub>; 0,4 M Saccharose; pH 7,2 mit KOH) gewaschen, indem sie jeweils bei 100 g für 10 min zentrifugiert wurden und jedesmal der Unterstand wie oben beschrieben entfernt wurde. Vor der letzten Zentrifugation wurde die Anzahl der Protoplasten in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer ermittelt, um die Protoplasten anschließend mit Elektroporationspuffer auf eine Konzentration von 2 - 4 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml zu resuspendieren. Für die Elektroporation wurden jeweils 500 µl Protoplasten-Suspension in eine 1 ml Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 4 mm) pipettiert. 20 – 50 µg Plasmid-DNA (mit Elektroporationspuffer auf 100 µl aufgefüllt) wurden vorsichtig untergemischt und die Ansätze für 5 min inkubiert. Die Elektroporation erfolgte dann nach neuerlichem Durchmischen bei 900 µF und 160 V. Zur Regeneration wurden die Zellen nach der Elektroporation noch für 30 min in den Küvetten belassen. Danach wurden sie in kleine Petrischalen (Durchmesser 3,5 cm) zusammen mit 2 ml Tex-Puffer überführt und für 14 h im Dunkeln bei 25 °C inkubiert.

## **4.6 Proteinchemische Methoden**

### **4.6.1 Western Blot Analyse**

In Western Blot Analysen werden Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen ihrer Größe nach aufgetrennt, auf eine Nylonmembran geblotet und mit spezifischen Antikörpern immunologisch nachgewiesen.

#### **4.6.1.1 Herstellung denaturierter Gesamtzellproteinextrakte**

100 bis 300 µg Blattmaterial wurden unter flüssigem Stickstoff gemörsert und in ein Eppendorfgemäß überführt. Zu dem Zellmaterial wurden 3 Volumen (w/v) Harnstoffpuffer (4 M Harnstoff, 16,6 % (v/v) Glycerin, 5 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol, 5 % (w/v) SDS, 0,5 % (w/v) Bromphenolblau) gegeben und der Ansatz für 15 min bei 65 °C inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (13000 rpm, 10 min) zur Abtrennung nicht gelöster Zelltrümmer. Ein Aliquot der Proteinlösung im Überstand konnte direkt in der SDS-PAGE (4.6.1.4) eingesetzt werden.

#### **4.6.1.2 Herstellung denaturierter Kernproteinextrakte aus Tabakblättern**

Das Protokoll folgt einem modifizierten Protokoll von Niggeweg (1999). Unter flüssigem Stickstoff wurden 6-10 g Blattmaterial mit einem elektrischen Schermixer zu feinem Pulver zermahlen und in 40 ml 1 x Puffer A (1 M Hexylenglykol, 0,25 M Saccharose, 20 mM TAPES (pH 8,5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,15 mM Spermin, 0,5 mM Spermidin, 0,6 % (v/v) Nonidet P-40, 80 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) aufgenommen. Die anschließende Filtration durch zwei Lagen Miracloth trennte größere Zelltrümmer von der Suspension mit den Organellen ab. Im folgenden Zentrifugationsschritt (Rotor SS34, 1000 rpm, 4 °C, 2 min 40 sec) wurden kleinere Zelltrümmer und Stärke von den in der Lösung verbliebenen Organellen separiert. Die Suspension wurde einer weiteren Zentrifugation zur Pelletierung der Zellkerne unterzogen (Rotor SS34, 2000 rpm, 4 °C, 3 min 30 sec). Der Überstand enthält die im Cytoplasma lokalisierten Proteine. Diese wurden, wie unter 4.6.1.3 beschrieben, aufgearbeitet. Zur Entfernung von Chloroplasten wurden das Pellet abschließend dreimal gewaschen, indem es zunächst mit Hilfe eines feinen Haarpinsels in 8 ml 0,5 x Puffer A (enthält 0,5 M Hexylenglykol, restliche Zusammensetzung wie 1 x Puffer A) resuspendiert und anschließend wie zuvor zentrifugiert wurde. Das erhaltene Pellet wurde in 500 µl denaturierendem Harnstoffpuffer (4.6.1.1) aufgenommen und 10 min bei 65 °C inkubiert. Durch eine anschließende Ultraschallbehandlung wurde die DNA fragmentiert. Nach einer abschließenden Zentrifugation (Tischzentrifuge, 10 min, 13000 rpm) konnte ein Aliquot des Überstandes direkt in der SDS-PAGE (4.6.1.4) eingesetzt werden.

#### **4.6.1.3 Herstellung denaturierter cytoplasmatischer Proteinextrakte aus Tabakblättern**

Tabakblätter wurden wie im vorangehenden Abschnitt beschrieben aufgearbeitet. Der nach Abzentrifugieren der Kerne erhaltene Überstand enthält die im Cytoplasma der Zellen lokalisierten Proteine. Die Proteinkonzentration in den Extrakten war sehr gering, daher wurden die Proteine aus der Pufferlösung gefällt und aufkonzentriert. Ein Aliquot der Proteinlösung wurde dazu mit dem vierfachen Volumen Methanol und dem einfachen Volumen Chloroform versetzt, gut gemischt und für 2 min bei 13000 rpm in der Eppendorffzentrifuge zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde verworfen, die untere organische Phase wurde mit dem dreifachen Volumen Methanol versetzt, gemischt und erneut zentrifugiert. Das entstehende Pellet konnte durch 20 minütige Inkubation bei 65 °C in denaturierendem Harnstoffpuffer gelöst und direkt für eine SDS-PAGE (4.6.1.4) eingesetzt werden.

#### **4.6.1.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE, Laemmli, 1970) dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekularmasse. Die Polyacrylamidmatrix wird durch Polymerisation von Acrylamid mit dem Quervernetzer N,N'-Methylenbisacrylamid (BIS) hergestellt. Die Porengröße im Gel kann durch die Wahl der Acrylamidkonzentration sowie des Verhältnisses Acrylamid/BIS verändert werden. Die Polymerisation wird durch Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) durch Erzeugung freier Radikale gestartet. Als Katalysator wird N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) zugefügt. In dieser Arbeit wurden SDS-Gele verwendet, die sich aus einem Trenngel aus 10 % (w/v) Acrylamid/Bis (19:1), 0,4 M Tris/HCl pH 8,8, 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % (v/v) TEMED, 0,1 % (w/v) APS sowie einem Sammelgel aus 5 % (w/v) Acrylamid/Bis (19:1), 125 mM Tris/HCl pH 6,8, 0,1 % (w/v) SDS, 0,2 % (v/v) TEMED, 0,1 % (w/v) APS zusammensetzen. Nach Beladen der Taschen des Gels mit je 10 µl Proteinextrakt aus denaturierten Harnstoffextrakten erfolgte der Gellauf bei 20 mA für 2 h. Als Laufpuffer diente 25 mM Tris, 190 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS.

#### **4.6.1.5 Proteintransfer auf PVDF-Membranen**

Der Transfer der im SDS-Gel aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte mittels der „Semi-Dry-Blotting“-Methode (Kyhse-Andersen, 1984). Dazu wurden drei

Lagen Fließpapier in Transferpuffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris, 20 % (v/v) Methanol, 0,01 % (w/v) SDS) angefeuchtet und auf die Blottingapparatur aufgelegt. Die PVDF-Membran wurde in Methanol aktiviert, mit Transferpuffer äquilibriert und luftblasenfrei auf die Schicht Fließpapier gelegt. Das PAA-Gel wurde auf dem Filter positioniert und mit drei Lagen in Transferpuffer äquilibriertem Fließpapier bedeckt. Der Elektrotransfer lief für 45 min bei 5 mA/cm<sup>2</sup> Filterfläche. Nach dem Transfer wurde der Filter kurz in TBS gewaschen und zwischen zwei Lagen Fließpapier getrocknet. Die Membran wurde vor der Weiterbehandlung wieder mit Methanol aktiviert.

#### **4.6.1.6 Immunodetektion mit dem ECL-System**

Bei der hier angewendeten indirekten Nachweismethode werden die auf der Membran immobilisierten Proteine zuerst mit einem Primärantikörper immunodetektiert. Dieser Antikörper ist spezifisch gegen ein Epitop des nachzuweisenden Proteins gerichtet. Unter Verwendung eines Peroxidase-gekoppelten zweiten Antikörpers wird der Primärantikörper erkannt. Der Nachweis erfolgt mit Hilfe des ECL-Kits der Firma Amersham. Nach Inkubation des Filters mit einem Substrat-Mix kann die bei der Peroxidase-katalysierten Oxidation des Substrates Luminol entstehende Chemilumineszenz durch Exposition eines Röntgenfilms nachgewiesen werden. Das Absättigen freier Stellen auf der Membran (Blocken) erfolgte durch 1 h Inkubation mit 5 % Milchpulver in TBST. Danach erfolgte für 2 h die Inkubation mit 5 % Milchpulver in TBST und Primärantikörper. Die Membran wurde 3 x 10 min mit 1 x TBST zum Entfernen von nicht gebundenem Antikörper gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte in 5 % Milchpulver in TBST für 1 h. Nichtgebundener Antikörper wurde wieder entfernt durch 5 x 5 min Waschen mit 1 x TBS. Das ECL-Substratmix wurde frisch aus den Lösungen 1 und 2 im Verhältnis 1:1 angesetzt, für eine Membran (9,5 x 6,5 cm) wurden 3 ml Substratmix benötigt. Die Membran wurde mit der Proteinseite nach oben auf ein Stück Haushaltsfolie gelegt, und mit dem Substratmix 1 min inkubiert. Überschüssiger Substratmix wurde abgeschüttet und die Membran in Haushaltsfolie eingeschlagen. Die Detektion der Chemilumineszenzsignale erfolgte durch Exposition eines Röntgenfilms, je nach Signalstärke für 15 s bis 10 min. Der Autoradiographiefilm wurde dann für 1-5 min entwickelt, kurz gewässert und 3 min fixiert.



#### 4.6.2 Isolierung von Proteinen aus Tabak-Mesophyllprotoplasten

Die Tabakmesophyllprotoplasten wurden nach erfolgter Transformation und Inkubation in TEX Puffer in 12 ml Greinerröhrchen überführt, mit 5 Volumen 250 mM NaCl gewaschen und 5 min bei 60 g abzentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde vollständig mit einer Pasteurpipette entfernt. Die Protoplasten wurden dann in 300 µl GUS-Extraktionspuffer (10 mM EDTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 0,1 % (v/v) Sarcosyl, 0,05 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol, 50 mM NaHPO<sub>4</sub>; pH 7,0) durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren aufgebrochen, in Eppendorfgefäße überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dann wurden sie kurz bei 37 °C aufgetaut, gevortext und die Zelltrümmer für 15 min bei 15000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde für Proteinbestimmungen und Reporteranalysen eingesetzt.

#### 4.6.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten

Zum Abgleich der Proteinkonzentrationen erfolgte die Bestimmung der Gesamtproteinmenge nach einer modifizierten Methode von Bradford (1979). Die Methode beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G250 von 465 nm nach 595 nm, hervorgerufen durch eine koordinative Bindung des Farbstoffs an Proteine. Die Reaktion wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt, die Messung der Absorption erfolgte mit dem Photometer MRX der Firma Dynex. Zur Eichung des Geräts wurde jeweils eine Standardkonzentrationsreihe mit BSA gemessen. Eine definierte Menge des Proteinextrakts (1 - 5 µl) wurde in eine Mikrotiterplatte pipettiert, 200 µl Reaktionslösung zugegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 595 nm. Anhand der erstellten Eichgerade wurde die Proteinkonzentration der einzelnen Proben berechnet.

#### 4.6.4 Messung der $\beta$ -Glucuronidase (GUS)-Aktivität

Der Nachweis der *GUS*-Reporteraktivität erfolgte durch einen modifizierten GUS-Assay (Jefferson et al., 1987). Der GUS-Assay erlaubt die Quantifizierung der Aktivität des Enzyms  $\beta$ -Glucuronidase als Produkt des *GUS*-Reportergens. Auf diese Weise läßt sich indirekt die Aktivität des mit dem *GUS*-Gen fusionierten Promotors bestimmen. Neben natürlichen Substraten akzeptiert die  $\beta$ -Glucuronidase auch künstliche Substrate. Verwendet man 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -Glucuronid (4-MUG), so wird nach Hydrolyse

das fluoreszierende Produkt 4-Methylumbelliferyl (4-MU) freigesetzt, welches sich in einem Fluorimeter quantitativ bestimmen läßt.

Die Reaktion wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt. 100 µl Proteinextrakt wurden in jeweils ein Well einer Mikrotiterplatte geben und je 100 µl 4 mM 4-MUG (gelöst in GUS-Ex-Puffer) zugefügt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C im Dunkeln. Nach 15 min (die Enzymreaktion verläuft jetzt im linearen Bereich) wurde der Ansatz halbiert und die Enzymreaktion eines Halbandsatzes durch Zugabe von 100 µl 0,2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> gestoppt. Die abgestoppten Ansätze dienten als t<sub>0</sub>-Wert der Reaktion. Der restliche Reaktionsansatz wurde bei 37 °C für 60 min inkubiert und danach ebenfalls durch Zugabe von 0,2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> abgestopp (t<sub>60</sub> Wert). Die Mikrotiterplatte mit den Ansätzen wurde bis zur weiteren Auswertung bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt. Die Messung der Fluoreszenzwerte erfolgte automatisch mit dem Fluoreszenzmeßgerät Cytofluor der Firma Perseptive. Zur Eichung des Gerätes wurde bei jeder Messung ein Fluoreszenzstandard aus 10<sup>-6</sup>-10<sup>-4</sup> Verdünnungen einer 100 mM 4-MU-Lösung in GUS-Stop-Puffer mitgemessen. Dabei wird in der Probenlösung enthaltenes 4-MU bei einer Wellenlänge von 360 nm zur Fluoreszenz angeregt, die ihr Maximum bei 460 nm erreicht. Die relative Strahlungsintensität bei dieser Wellenlänge wird vom Fluorimeter gemessen. Die GUS-Aktivität A wird in pmol 4-MU min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> Protein angegeben. Die Berechnung erfolgte nach der Formel:

$$A = \frac{\Delta F_{(t_{60}-t_0)}}{m_{\text{Protein}} \times t}$$

A = GUS-Aktivität [pmol 4-MU min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> Protein]

t = Zeit [min]

m<sub>Protein</sub> = eingesetzte Proteinmenge [mg] im halbierten Ansatz

ΔF = Fluoreszenz (t<sub>60</sub>-t<sub>0</sub>) des gebildeten 4-MU [pmol]

Wurden hohe GUS-Aktivitäten erwartet, so wurde mit Verdünnungen der Proteinextrakte gearbeitet, um zu jedem Zeitpunkt der Reaktion eine Substratsättigung zu gewährleisten. Dies ist die Voraussetzung dafür, daß das Enzym β-Glucuronidase immer mit maximaler Reaktionsgeschwindigkeit arbeitet und eine Abnahme der Substratmenge sich nicht begrenzend auf die zu bestimmende GUS-Aktivität auswirkt.

#### **4.6.5 Herstellung von Methanolextrakten zur Bestimmung des Auxingehaltes in Tabakblättern**

Die Bestimmung des Auxingehaltes von Tabakblättern folgte im Wesentlichen der Methode nach Gaedeke et al. (2001). Dazu wurden Pflanzen in Erdkultur für 6 Wochen

angezogen. Jeweils 2 Blattscheiben (200 mg Blattmaterial) vergleichbarer Blätter wurden mit einem Skalpell in 2 mm breite Streifen geschnitten und in ein Eppendorfgefäß mit 1 ml siedendem Methanol gegeben. Durch Zugabe von 10 pmol eines [<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]IAA-Standards ist eine spätere Quantifizierung möglich. Die Extraktion erfolgte dann für mindestens 2 h bei RT unter ständigem Schütteln. Danach wurde die Methanolphase in ein neues Eppendorfgefäß überführt und in der Speedvac bis zur Trocknung eingedampft. Die mit Stickstoff überschichteten Proben wurden dann von A. Müller (Universität Bochum) analysiert.

#### **4.6.6 Herstellung von Chloroform/Methanolextrakten zur Bestimmung des Zuckergehaltes**

300 mg Pflanzenmaterial wurden unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zermörsert. Das Pulver wurde in ein 12 ml Greinerröhrchen mit 5 ml Chloroform/Methanol (1,5 : 3,5) gegeben. Nach gründlichem Schütteln erfolgte für 30 min eine Inkubation auf Eis. Danach wurden 4 ml HPLC-Wasser zugegeben, 2 min geschüttelt und 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde mit einer Transferpipette in einen auf Eis gekühlten Rotationskolben gegeben. Die organische Phase wurde nochmals mit 3 ml HPLC-Wasser ausgeschüttelt, wieder zentrifugiert und die abgetrennte wäßrige Phase wieder in den Rotationskolben überführt. Die Probe wurde am Rotationsverdampfer bei 34 °C im Wasserbad bis zur Trocknung eingengt. Die getrockneten Proben wurden mit 1,5 ml HPLC Wasser gelöst, über eine Nitrocellulosemembran gefiltert und in einem Eppendorfgefäß aufgefangen. Nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff erfolgte die Lagerung bei -80 °C. Die Messung erfolgte durch G. Lohaus (Universität Göttingen).

### **4.7 Konstruktion der verwendeten Plasmide**

#### **4.7.1 Klonierung von pUC-5'BZI-1**

Das aus der PCR mit genomischer Tabak-DNA und den Primern P51 und P47 resultierende 279 bp Fragment wurde in den Vektor pUC57-T kloniert. Der resultierende Vektor wurde als pUC-5'BZI-1 bezeichnet.

#### 4.7.2 Klonierung von pBZI-1

Das *SmaI* / *KpnI* Fragment aus dem Vektor pUC-5'BZI-1 wurde in den *HpaI* / *KpnI* geöffneten Vektor pBZI-1-ΔN eingefügt. *SmaI* und *HpaI* sind beides Restriktionsenzyme, die blunt-ends produzieren. Bei der Ligation dieser Enden gehen die Erkennungssequenzen für beide Enzyme verloren. Das resultierende Plasmid enthält damit die vollständige für BZI-1 codierende Sequenz.

#### 4.7.3 Klonierung von pBin-BZI-1

Aus dem Vektor pUC5'-BZI-1 wurde das *SmaI* / *KpnI* Fragment, das den N-Terminus von BZI-1 codiert, in den *HpaI* / *KpnI* geöffneten Vektor pBIN-BZI-1-ΔN inseriert.

#### 4.7.4 Klonierung von pBin-VP16-BZI-1

Die Klonierung erfolgte in zwei Schritten. In den mit *BamHI* geöffneten Vektor pKVPL wurde das 5'-Ende des *BZI-1*-Gens als *BamHI* Fragment aus dem Vektor pBZI-1 kloniert. Dann wurde aus dem so entstandenen Zwischenvektor das Fusionsgen aus der VP16-Domäne und dem 5'-Bereich des *BZI-1*-Gens über Restriktionsverdau mit *KpnI* herausgeschnitten und über die *KpnI*-Schnittstelle in das Plasmid pBin-BZI-1-ΔN eingebracht.

#### 4.7.5 Klonierung von pHBT

Das Entfernen des sGFP-Gens aus dem Vektor pHBTL-sGFP erfolgte durch Restriktionsspaltung des Plasmids pHBTL-sGFP mit *NotI* und *NcoI*. Danach folgte eine Klenow-fill-in Auffüllreaktion der entstandenen Enden und eine Religation zum Vektor pHBT.

#### 4.7.6 Klonierung von pHBT-BZI-1

Zuerst erfolgte eine Restriktionsspaltung des Plasmids p16BZI-1 mit dem Enzym *NotI*. Danach erfolgte ein partieller Verdau von p16BZI-1 mit *BamHI*, und die Ligation des BZI-Fragments in den mit *NotI* und *BamHI* gespaltenen Vektor pHBTL-GFP. Im Ergebnis wurde so die GFP-Sequenz durch die BZI-1-Sequenz im pHBTL ersetzt.

#### 4.7.7 Klonierung von pHBT-BZI-1- $\Delta$ N

Durch *KpnI*-Verdau von pHBT-BZI-1 und Religation des Restvektors wurde das 5'-Ende von BZI-1 herausgespalten.

#### 4.7.8 Klonierung von pHBT-VP16-BZI-1

Die Klonierung erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurde das 3'-Ende des BZI-1-Gens als *BamHI*-Fragment aus dem Plasmid pBZI-1 in den Vektor pHBT kloniert. Dann wurde das 5'-Ende des VP16-BZI-1-Fusionsgens aus dem Vektor pBin-VP16-BZI-1 als *KpnI*-Fragment in den zuvor hergestellten Zwischenvektor kloniert. Das *KpnI*-Fragment aus dem Plasmid pBIN-VP16-BZI-1 wurde in den *KpnI* geöffneten pHBT-BZI-1- $\Delta$ N inseriert.

#### 4.7.9 Klonierung der pTT-GUS Reporterengenkonstrukte

In das Plasmid pTTL-GUS wurden die nach Hybridisierung doppelsträngigen Oligonukleotide, welche die C-Box, CM-Box, G-Box bzw. GM-Box beinhalten, über ihre *EcoRI* und *SpeI*-Überhänge kloniert.

### 4.8 „Restriction Fragment Differential Display“

Zur Identifikation differentiell exprimierter Gene wurde das displayPROFILE™-Kit der Firma Display Systems Biotech benutzt. Es beruht auf dem Prinzip der „Restriction Fragment Differential Display PCR“ (RFDD-PCR). Im Gegensatz zur Standard Differential Display PCR, bei der direkt die Erststrang cDNA amplifiziert wird, werden bei der RFDD-PCR nach reverser Transkription und Spaltung mit dem Restriktionsenzym *TaqI* Adapter an die cDNA-Enden ligiert. Aus den in den verschiedenen Differential Display Ansätzen eingesetzten Geweben wurde jeweils die RNA isoliert. Von der gewonnenen RNA wurden jeweils 50  $\mu$ g zur mRNA-Isolierung mit dem Qiagen Oligotex-Kit eingesetzt. Die weiteren Reaktionen wurden nach den Angaben des Handbuchs (Kit manual version 2.1) durchgeführt. Zur Erststrang cDNA-Synthese wurden jeweils 0,5  $\mu$ g mRNA eingesetzt. Nach der cDNA-Synthese erfolgte eine Spaltung mit dem Restriktionsenzym *TaqI* und die Adapterligation an beide Fragmentenden. Ein Adapter trägt am 3'-Ende eine Schutzgruppe, die bei einer PCR eine Extension verhindert, wenn dieser Adapter an beide cDNA-Enden ligiert wurde. Der zweite Adapter trägt diese Schutzgruppe nicht. Bei der sich anschließenden PCR-Reaktion zur Amplifizierung der mit

den Adaptern versehenen Fragmente kommt jeweils ein Primer zum Einsatz, der zu dem Adapter mit der Schutzgruppe komplementär ist (0-Extension-Primer) und ein zweiter spezifischer Primer (displayPROBE-Primer), der zu dem zweiten Adapter komplementär ist. Drei Basen des spezifischen displayPROBE-Primers reichen in die cDNA-Sequenz hinein. Diese drei Basen sind dafür verantwortlich, daß der displayPROBE-Primers für eine cDNA-Sequenz spezifisch ist. Zusätzlich verhindern sie die Amplifikation von cDNA-Fragmenten, an deren beiden Enden der Standardadapter ligiert wurde, da diese Fragmente an beiden Enden die identischen drei Basen besitzen müßten, um amplifiziert zu werden. Um alle möglichen Variationen amplifizieren zu können, wäre ein Satz von  $4^3 = 64$  displayPROBE-Primern notwendig. In dieser Arbeit wurden die displayPROBE-Primer Eu1-Eu48 für die PCR eingesetzt. Der 0-Extension-Primer wurde nach der radioaktiven Markierung mit  $[\gamma^{33}\text{P}]\text{-ATP}$  von nicht eingebauten Nukleotiden gereinigt, indem der Ansatz mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf das 4-fache Volumen aufgefüllt wurde und dann über MicroSpin™ G25 Säulen zentrifugiert wurde. Für die RFDD-PCR wurde dementsprechend das 4-fache Volumen radioaktiven 0-Extension-Primers eingesetzt.

Nach der PCR wurden die Ansätze mit 15 µl Ladepuffer (95 % Formamid, 20 mM EDTA, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 0,05 % (w/v) Xylencyanol FF) versetzt, 10 min bei 85 °C denaturiert und dann auf Eis gelagert. 5 µl wurden in einem 6 %igen Sequenziergel aufgetrennt. Zur Herstellung des Sequenziergels (60 ml) wurden 25,2 g Harnstoff in 25 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst. Nach Zugabe von 3,6 ml 10 x TBE und 9 ml 40 % PAA-Mix (19:1 Acrylamid/BIS) wurde der Ansatz für 15 min unter Vakuum entgast. Dann erfolgte die Zugabe von 50 µl TEMED und 200 µl 10 % APS. Es wurde das CastAway™ Gelsystem der Firma Stratagene verwendet. Als Elektrophoresepuffer diente 0,6 x TBE. Nach 30 minütigem Vorlauf bei 50 Watt erfolgte der eigentliche Gellauf. Dieser wurde gestoppt, sobald die Bromphenolblaubande das untere Ende des Gels erreicht hatte. Das Gel wurde auf Fließpapier im Vakuumgeltrockner für 2 h bei 80 °C getrocknet und dann in einer Expositionscassette mit einem Bioimager-Screen für einige Stunden exponiert.

Unterschiedlich exprimierte cDNA-Signale wurden mit Hilfe einer Skalpellklinge aus dem Gel ausgeschnitten und mit 50 µl Wasser in einem Eppendorfgefäß für 15 min bei 95 °C gelöst. Durch eine erneute PCR unter Verwendung des in diesem Fall nicht radioaktiv markierten 0-Extension Primers sowie des displayPROBE Primers, mit dem das ursprüngliche Signal erhalten worden war, wurde das Fragment aus dem Eluat amplifiziert. Das Amplifikat wurde mit Hilfe des pGEM-T Kloning Kits in den Vektor pGEM-T kloniert und sequenziert.

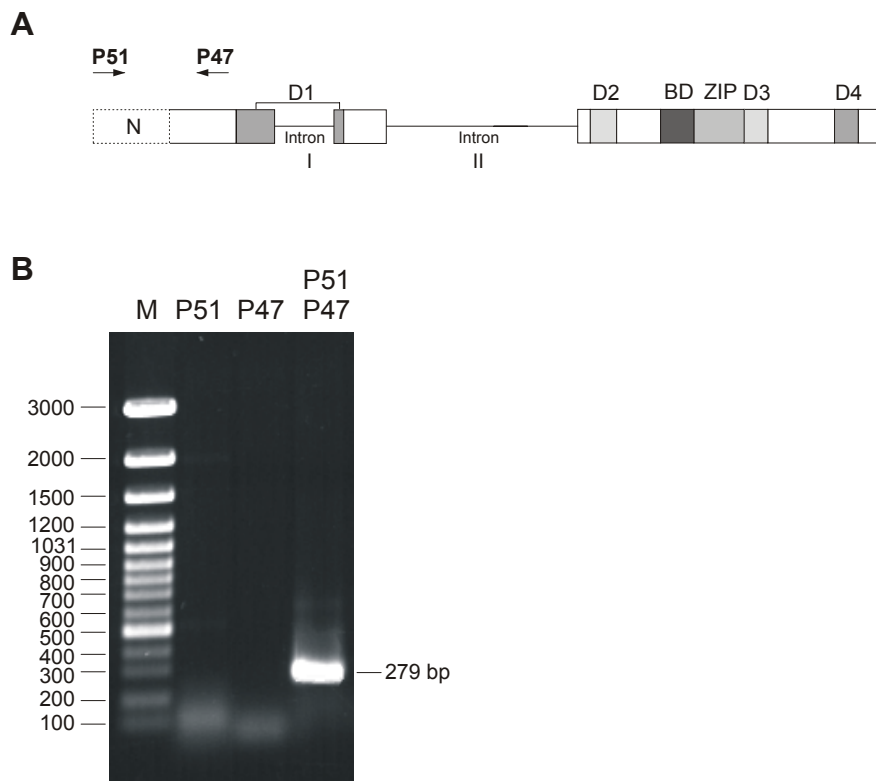
## 5 Ergebnisse

### 5.1 Analyse des bZIP-Transkriptionsfaktors BZI-1

Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung der Funktion des bZIP-Transkriptionsfaktors BZI-1 aus *Nicotiana tabacum*. Dazu wurde zuerst die für BZI-1 codierende cDNA sowie die genomische Struktur des *BZI-1*-Gens näher analysiert.

#### 5.1.1 Vervollständigung der BZI-1 cDNA Sequenz

Aufgrund von Sequenzvergleichen mit den verwandten bZIP-Proteinen CPRF2, OHP1, OHP2, REB, BLZ1 und AtBZIP63 wird ein stromaufwärts vom bisher bekannten Startcodon liegender Translationsstart von BZI-1 vermutet, der für das konservierte Motiv M(E/D)(R/K)VFS(M/V/D)E codiert. Da in der *BZI-1* cDNA dieser für die Domäne N codierende Bereich fehlt, wird angenommen, daß die vorliegenden cDNA-Sequenz von BZI-1 bislang unvollständig ist. Daher war es ein erstes Ziel dieser Arbeit, den fehlenden 5'-Bereich des *BZI-1*-Gens aus Tabak zu isolieren. Der Beginn des *BZI-1*-Codierbereichs kann über die Lage der Startcodons der verwandten bZIP-Faktoren abgeschätzt werden. Genomische Tabak-DNA des Kultivars Xanthi wurde für eine PCR mit den Primern P51 und P47 eingesetzt.



**Abbildung 5.1** Identifizierung des 5'-Bereichs von *BZI-1*. **A)** Schematischer Aufbau des Gens *BZI-1*. Die für die konservierten Domänen codierenden Bereiche sind grau unterlegt. D1-D4, Domäne I-IV; BD, basische Domäne, ZIP, Leuzinzipper. Bisher bekannte Introns sind als Striche eingezeichnet, der für die Domäne N codierende 5'-Bereich ist als punktiertes Kästchen dargestellt. Die Positionen der verwendeten Primer P51 und P47 sind durch Pfeile angegeben. **B)** Gelbild der PCR mit den Primern P51 und P47.

Die degenerierte Nukleotidsequenz des Primers P51 wurde anhand der Sequenz der *BZI-1*-Homologen erstellt, so daß er alle möglichen Codonkombinationen der ersten neun Aminosäuren erkennt. Der Primer P47 ist spezifisch für die *BZI-1* cDNA-Sequenz, die für den Bereich vor der Domäne I codiert. In allen *BZI-1*-ähnlichen Sequenzen liegt zwischen dem N-Terminus und der Domäne I kein Intron, so daß die Größe des erwarteten PCR-Fragments auf ungefähr 250 bp abgeschätzt werden kann. Das aus der PCR resultierende Fragment war mit einer Länge von 279 bp nur etwas länger als vermutet (Abbildung 5.1). Das PCR-Produkt wurde in den Vektor pUC57-T kloniert. Sequenzvergleiche ergaben, daß das klonierte Produkt im 3'-Bereich die bereits bekannte *BZI-1*-Sequenz enthält und im 5'-Bereich für die postulierte Proteindomäne N codiert (Abbildung 5.2).



	1	10	20	30	40																																										
<i>Nt</i> BZI-1	M	E	R	V	F	S	M	E	D	I	G	D	H	F	W	S	T	P	P	T	-----	A	D	L	G	V	D	S	P	T	A	A	A	A	V	S	-----										
<i>Pc</i> CPRF-2	M	D	R	V	F	S	V	E	D	-	I	S	D	Q	F	W	S	P	P	-----	-----	-----	-----	A	R	E	D	S	-----																		
<i>At</i> AB010697	M	E	K	V	F	S	D	E	E	I	S	G	N	H	H	S	V	N	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----																			
<i>Os</i> REB	M	E	R	V	F	S	V	E	E	-	I	S	D	P	F	W	V	P	P	P	-----	Q	S	A	A	A	A	Q	Q	Q	G	G	G	V	A	-----	S	G	G	G	G	V	A	G	G	G	G
<i>Hv</i> BLZ-1	M	E	R	V	F	S	V	E	E	-	I	P	D	P	F	W	G	Q	P	S	P	-----	-----	R	Q	R	G	R	R	-	P	P	E	G	-----	-----	-----	-----	-----	-----							
<i>Zm</i> OHP1	M	E	R	V	F	S	V	E	E	-	I	P	N	P	Y	W	V	P	P	H	P	-----	-----	Q	S	A	A	A	G	A	V	A	A	P	-----	-----	-----	-----	-----	A	G	E					
<i>Zm</i> OHP2	M	E	R	V	F	S	M	E	E	-	I	P	N	P	Y	W	A	P	P	H	P	-----	-----	Q	P	A	A	G	G	A	V	A	A	P	G	G	-----	V	G	G	A	G	D				

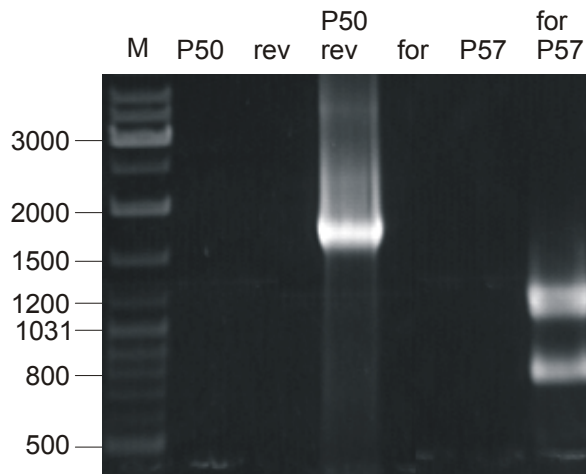
	50	60	70	80	*																																		
<i>Nt</i> BZI-1	Y	S	K	M	N	R	S	S	E	W	A	F	Q	R	F	I	Q	E	A	T	A	A	G	T	S	T	S	S	P	P	Q	P	P	T	M	T	A		
<i>Pc</i> CPRF-2	S	K	L	V	M	N	R	S	D	S	E	W	A	F	Q	S	F	I	Q	Q	A	S	A	L	E	S	S	Q	P	L	F	S	D	P	V	P	V	A	G
<i>At</i> AB010697	G	M	T	S	L	N	R	S	A	S	E	W	A	F	N	R	F	I	Q	E	S	S	A	A	A	D	D	G	E	S	T	T	A	C	G	V	S	V	S
<i>Os</i> REB	G	G	N	A	M	N	R	C	P	S	E	W	Y	F	Q	K	F	L	E	E	A	V	L	D	S	P	V	P	N	P	S	P	R	A	E	A	G	G	I
<i>Hv</i> BLZ-1	---	A	M	N	R	C	P	S	E	W	Y	F	Q	K	F	L	E	E	A	V	L	D	S	P	A	A	D	P	S	P	-----	-----	-----	-----	M				
<i>Zm</i> OHP1	A	A	G	L	M	N	R	C	P	S	E	W	Y	F	Q	K	F	L	E	E	A	V	L	D	S	P	V	P	V	A	G	V	S	-	R	-	-	G	S
<i>Zm</i> OHP2	E	A	G	A	M	N	R	C	P	S	E	W	Y	F	E	K	F	L	E	E	A	V	L	D	S	P	G	P	V	A	G	V	G	-	R	-	-	S	S

**Abbildung 5.2** Aminosäuresequenzvergleich der N-Termini von BZI-1 und homologen Proteinen. Der vor der Klonierung des vollständigen N-Terminus von BZI-1 bekannte Proteinbeginn ist durch einen Stern gekennzeichnet. Sequenzhomologien von 100 % sind dunkelgrau, von mindestens 50 % sind hellgrau unterlegt.

Die vollständige DNA- und Aminosäuresequenz von BZI-1 mit der genauen Lage der verwendeten Primer und aller für die nachfolgenden Klonierungen wichtigen Restriktionsschnittstellen ist im Anhang dargestellt.

### 5.1.2 Analyse der genomischen Struktur von *BZI-1*

Die genomische Struktur der zu *BZI-1* homologen Gene ist stark konserviert. Die Gene setzen sich jeweils aus sechs Exons und fünf Introns zusammen, deren Position zwischen den Genen ebenfalls konserviert ist. Um zu analysieren, inwieweit auch der genomische Aufbau des *BZI-1*-Gens mit dem der homologen Gene übereinstimmt, wurde die Exon-Intron Struktur von *BZI-1* näher analysiert. Für *BZI-1* konnte bislang nur die Existenz der ersten beiden Introns nachgewiesen werden (Eick, 1999). Die Position und die Größe der drei weiteren Introns wurde im Rahmen dieser Arbeit bestimmt, indem durch PCR mit geeigneten, auf der *BZI-1* cDNA-Sequenz basierenden Primern, genomische Tabak-DNA des Kultivars Xanthi amplifiziert wurde. Es wurden alle PCR-Produkte, die größer waren, als von der cDNA-Sequenz abzuleiten gewesen wäre, isoliert und zur Sequenzierung in den Vektor pGEM-T kloniert.



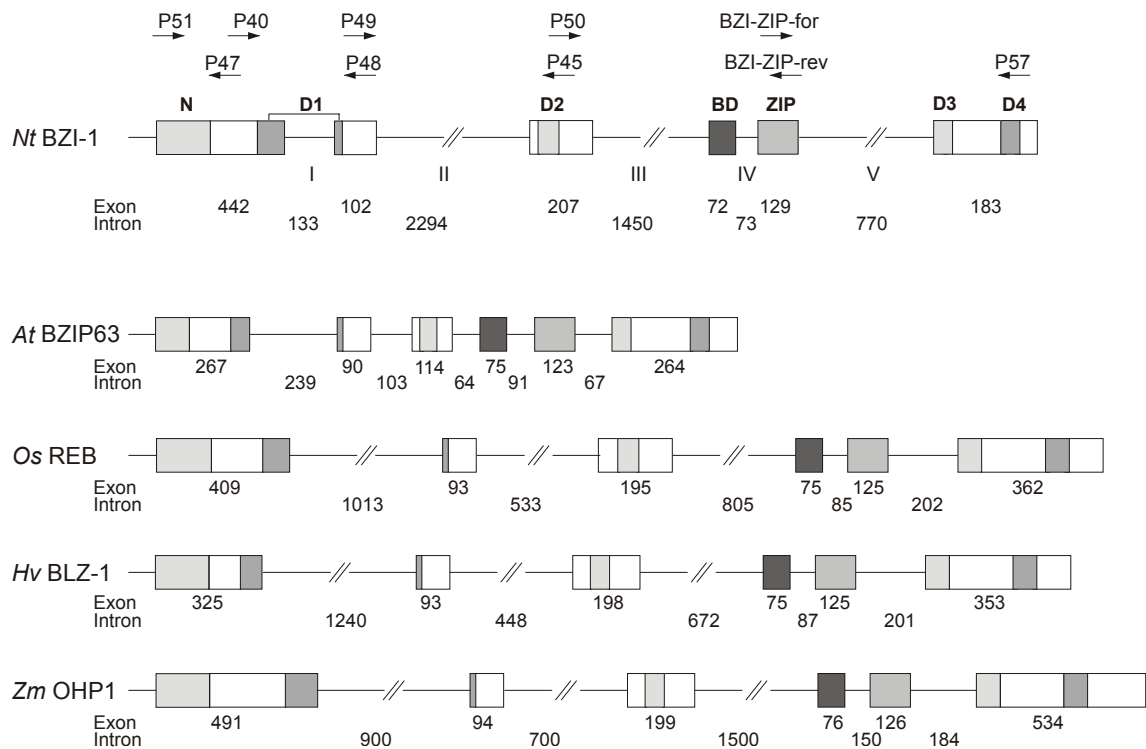
**Abbildung 5.3** Gelbild der PCR mit den Primern P50 und BZI-ZIP-rev (rev), sowie BZI-ZIP-for (for) und P57 auf Tabak-Gesamt-DNA. M, DNA-Längenstandard in bp. Zur Einordnung der Fragmentgrößen in die Exon-Intron Struktur von BZI-1 siehe auch Abbildung 5.4

Durch Vergleich der bekannten cDNA-Sequenz mit der über die PCR erhaltenen genomischen Sequenz wurden die genauen Exon-Intron Übergänge identifiziert.

Im Einzelnen wurde für die Primerkombination P50 / BZI-ZIP-rev ein PCR-Fragment mit einer Länge von 200 bp erwartet. Das erhaltene Produkt war aber ca. 1,7 kb groß. Die Sequenzierung ergab, daß jeweils genau stromauf- und stromabwärts der basischen Domäne die Introns III und IV liegen. Das Intron III ist ca. 1450 bp groß, auf eine vollständige Sequenzierung wurde daher verzichtet. Das Intron IV ist mit nur 73 bp das kleinste in der *BZI-1* DNA. Der Übergang von Intron IV zum nächsten Exon liegt exakt vor der Codiersequenz des Leucinzippers.

Das Intron V wurde mit der Primerkombination BZI-ZIP-for / P57 gefunden. Die erwartete Fragmentgröße lag bei 460 bp. In der PCR wurden zwei Fragmente mit ungefähr 800 bp bzw. 1230 bp amplifiziert. Das 800 bp Fragment enthielt keine zu *BZI-1* identischen Sequenzen. Das 1230 bp PCR-Fragment enthielt *BZI-1*-DNA mit einem ca. 770 bp umfassenden Intron. Der Exon-Intron Übergang liegt zwischen dem Codierbereich für den Leucinzipper und der Domäne III.

Die Ergebnisse der PCR-Analysen zum genomischen Aufbau des *BZI-1*-Gens sind in Abbildung 5.4 im Vergleich zu *BZI-1*-homologen Genen schematisch dargestellt.

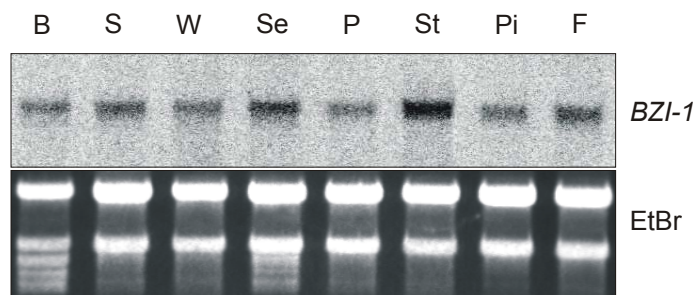


**Abbildung 5.4** Schematische Darstellung der Exon-Intron Struktur von *BZI-1* und homologen Genen. Die Größe der Exons und Introns ist in bp angegeben, die für die konservierten Proteindomänen codierenden Sequenzen (N, D1, D2, BD, ZIP, D3, D4) sind als Boxen dargestellt und grau unterlegt. Die Bezeichnung und Orientierung der auf der *BZI-1* cDNA basierenden verwendeten Primer ist durch Pfeile angegeben. *A.t.* BZIP63, GenBank Accession number AB010697; *O.s.* REB, Genbank Accession number AB021736; *H.v.* BLZ1, Vicente-Carbajosa, 1998; *Z.m.* OHP1, Pysh und Schmidt, 1996.

Die Position und häufig auch die relative Größe der Introns ist innerhalb der verglichenen Transkriptionsfaktoren stark konserviert.

### 5.1.3 Expressionsanalyse von BZI-1 in Tabak

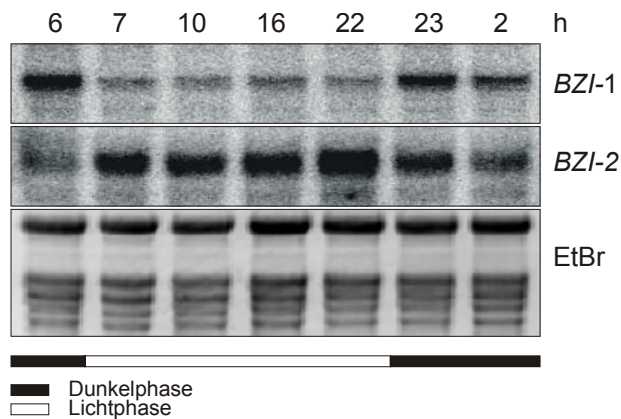
In Wildtyp-Tabakpflanzen wurde untersucht, ob die *BZI-1*-Expression auf definierte Gewebe beschränkt ist, oder ob *BZI-1* ubiquitär exprimiert wird. Dazu wurde von verschiedenen Tabakgeweben Gesamt-RNA isoliert und in Northern Blot Analysen getestet (Abbildung 5.5).



**Abbildung 5.5 Northern Blot Analyse der BZI-1-Expression in verschiedenen Tabakgeweben.** B, Blatt; S, Stengel; W, Wurzel; Se, Sepalen; P, Petalen; St, Stamina; Pi, Pistill; F, Fruchtknoten.

Die Expression von *BZI-1* findet ubiquitär in der gesamten Tabakpflanze statt, wobei eine verstärkte Transkription in den Stamina zu beobachten ist. In weiteren Northern Blot Analysen wurde die *BZI-1*-Expression auch während verschiedener Stadien der Blütenentwicklung (Abbildung 5.12) sowie in jungen und seneszenten Blättern (Abbildung 5.11) ermittelt. Dabei ergab sich ebenfalls jeweils eine gleichbleibende Transkriptionsstärke.

Obwohl es für *CPRF2* Hinweise auf eine Beteiligung an der lichtabhängigen Genexpression gibt, ist nicht bekannt, ob die *CPRF2*-Expression selbst durch Licht gesteuert wird. Auch für den *BZI-1*-Heterodimerisierungspartner *BZI-2* bzw. das *BZI-2* homologe Protein *ATB2* aus *Arabidopsis* konnte eine in einen Tag-Nachtrhythmus oszillierende Expression gezeigt werden (Strathmann, unveröffentlicht, Rook et al., 1998). Daher wurde eine möglicherweise lichtabhängige Expression von *BZI-1* in einem weiteren Northern Blot Experiment erstmalig untersucht. Zu verschiedenen Tages- und Nachtzeiten wurden Blattproben von im Klimaschrank angezogenen Tabakpflanzen entnommen. Es wurde darauf geachtet, nur Blätter zu verwenden, die der Lichtquelle jeweils vollständig ausgesetzt waren. Zur Kontrolle wurde zusätzlich das Expressionsmuster von *BZI-2* analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.6 dargestellt.



**Abbildung 5.6 Northern Blot Analyse der lichtregulierten *BZI-1*- bzw. *BZI-2*-Genexpression.** Die Uhrzeit der Probennahme ist angegeben (h). Die Licht- und Dunkelphasen sind durch weiße bzw. schwarze Balken gekennzeichnet.

Es ist zu erkennen, daß die *BZI-1*-Transkription im Licht gering ist und nach Eintritt in die Dunkelphase innerhalb einer Stunde ansteigt. Mit Beginn der nächsten Lichtphase geht die *BZI-1*-Expression ebenfalls innerhalb einer Stunde wieder auf den Ausgangslevel zurück. Die *BZI-2*-Expression verläuft dazu genau gegensätzlich, hier ist in der Dunkelphase nur eine geringe Expression detektierbar. In der Lichtphase erfolgt ein schneller und starker Anstieg der *BZI-2*-Expression. In später ausführlich behandelten Experimenten wurden weitere Analysen der *BZI-1*-Genexpression z.B. nach Pathogenbehandlung (5.2.1.1) oder Auxinininduktion von Tabakblattscheiben (5.3.7) durchgeführt.

#### 5.1.4 Analyse der Aktivierungseigenschaften von *BZI-1*

Für *BZI-1* konnte ein starkes Transaktivierungspotential nachgewiesen werden, indem Fusionsproteine aus *BZI-1* und der GAL4-Bindedomäne in einem Hefe-Reporter-System getestet wurden. Diese Fähigkeit von *BZI-1* zur Transaktivierung konnte durch Deletion der ersten 72 Aminosäuren des N-terminalen Bereichs vollständig aufgehoben werden (Heinekamp et al., 2002; Die Experimente wurden von A. Strathmann durchgeführt). Es war nun zu prüfen, ob sich die Ergebnisse aus dem Hefesystem auch auf Pflanzenzellen übertragen lassen. Eine Analyse der *in vivo* Eigenschaften des Transkriptionsfaktors *BZI-1* erfolgte durch transiente Co-Transformation von Effektor- und Reporter-genkonstrukten in Tabakmesophyllprotoplasten. Dazu wurden Plasmide hergestellt, die *BZI-1* bzw. Derivate von *BZI-1* unter Kontrolle des HBT-Promotors (Sheen, unveröffentlicht) exprimieren. Der HBT-Promotor vermittelt als Derivat des CaMV 35S-Promotors eine starke Expression des Transgens in Pflanzenzellen. Als Effektorstrukturen wurden drei unterschiedliche Vektoren eingesetzt, welche in der Abbildung 5.7 A schematisch dargestellt sind. Mit dem

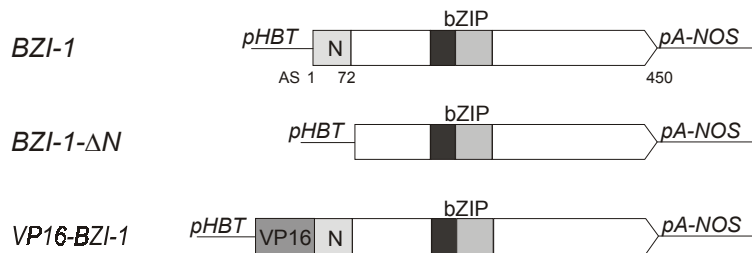
Vektor pHBT-BZI-1 ist eine Überexpression des Proteins BZI-1 gewährleistet. Durch Expression des Deletionsderivates in dem Vektor pHBT-BZI-1-ΔN sollte, im direkten Vergleich zum pHBT-BZI-1-codierten Gesamtprotein, die Transaktivierungseigenschaft der Domäne N auch *in planta* untersucht werden.

Durch Expression eines Translationsfusionsproteins im Vektor pHBT-VP16-BZI-1, bestehend aus BZI-1 und der Aktivierungsdomäne des *Herpes Simplex* Virion Proteins 16 (Triezenberg et al., 1988), sollte die *in vivo* Bindung an die verwendeten *cis*-Elemente getestet werden. Dieses Konstrukt sollte die Fähigkeit besitzen, nach Bindung an die *cis*-Elemente, die Expression des nachgeschalteten Reportergens zu aktivieren.

Als Ausgangsplasmid zur Herstellung der Reportergenkonstrukte wurde der Vektor pTTL-GUS (Krawczyk et al., 2002) gewählt. Dieser codiert ein *GUS* Reportergen, welches unter Kontrolle eines Minimalpromotors steht. Durch Klonierung verschiedener *cis*-Elemente in die "multiple cloning site" (mcs) vor der TATA-Box des Minimalpromotors, kann die Wirkung der zu untersuchenden Effektorstrukture auf die Transkription des Reportergens mittels eines sich anschließenden GUS-Enzymtests untersucht werden. Als *cis*-Elemente für die Reportergenkonstrukte wurden über synthetische Oligonukleotide C- und G-Boxen eingefügt (Abbildung 5.7 B). Es ist bekannt, daß BZI-1 und CPRF2, *in vitro* an diese Elemente binden (Kuhlmann, 2002; Weisshaar et al., 1991). Durch diese Experimente kann so die Fähigkeit des Transkriptionsfaktors BZI-1 zur Bindung an diese *cis*-Elemente *in vivo* getestet werden. Um die Bindespezifität von BZI-1 zu analysieren, wurden die Boxen auch in mutierter Form angeboten.

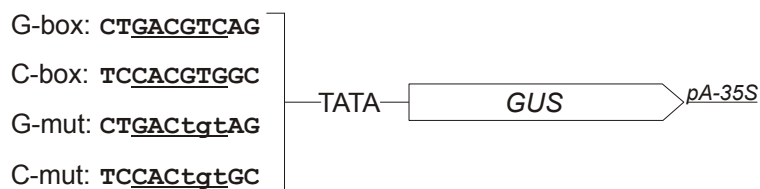
## A

Effektor-Plasmidkonstrukte

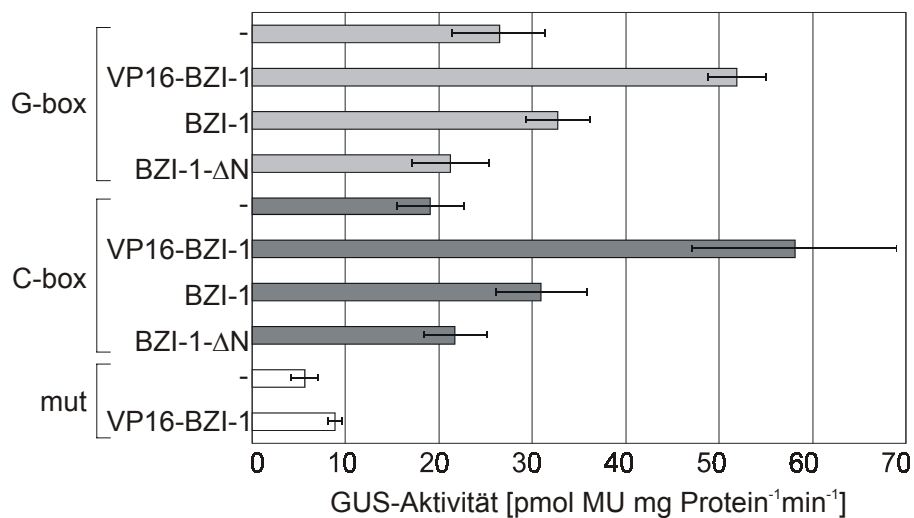


## B

Reporter-Plasmidkonstrukte



## C



**Abbildung 5.7** Transiente Analysen in Tabakmesophyllprotoplasten A) Schematische Darstellung der Effektor-Plasmidkonstrukte. Die für BZI-1-codierende Sequenz ist als Kasten dargestellt, die Domäne N ist dabei hellgrau und die VP16-Domäne ist dunkelgrau unterlegt. pHBT, CaMV 35S-Promotor-Derivat; pA-NOS, NOS Polyadenylierungssignal B) Schematische Darstellung der Reporterplasmidkonstrukte. Die G-Box und C-Box Bindemotive sind jeweils unterstrichen, mutierte Bindestellen sind in Kleinbuchstaben gesetzt. pA-35S, 35S Polyadenylierungssignal C) Graphische Darstellung der Ergebnisse des GUS-Enzymtests. Die Experimente wurden mit der C-Box in sechs und mit der G-Box in vier unabhängigen Doppelmessungen durchgeführt. mut, G-mut und C-mut; -, Kontrollansatz unter Verwendung des Plasmids pHBT als Effektor.

Die Ergebnisse in Abbildung 5.7 C zeigen, daß BZI-1 im Vergleich zum Kontrollansatz, in dem zum Reporterplasmid leerer Vektor anstelle des Effektorplasmids transformiert wurde, die Expression des Reportergens sowohl bei der C-Box wie auch bei der G-Box verstärkt. Die beobachtete Grundaktivität wird durch endogene G-Box bzw. C-Box bindende Faktoren verursacht. Dabei ist die Grundaktivität der G-Box stärker als die der C-Box. Durch Expression des Deletionsderivat BZI-1- $\Delta$ N wird die durch BZI-1 vermittelte Aktivierung jeweils vollständig aufgehoben. Dem N-Terminus kann also auch *in planta* eine Transaktivierungseigenschaft zugewiesen werden. Diese ist allerdings mit dem Faktor 1,6 bei der C-Box und Faktor 1,4 bei der G-Box nicht besonders stark, aber durchaus signifikant. Durch Expression des Fusionsproteins VP16-BZI-1 wird die Reporterogenaktivität im Fall der C-Box um das 3,1-fache gesteigert, im Fall der G-Box nur um das 2-fache. Daraus kann man schließen, daß BZI-1 *in vivo* besser an die C-Box als an die G-Box bindet. Die Reportergenkonstrukte mit der mutierten G- oder C-Box zeigen auch nach Expression von VP16-BZI-1 nur sehr geringe Hintergrundaktivitäten. BZI-1 bindet demnach nicht an die mutierten Boxen.

Es wurden auch Reportergenkonstrukte getestet, die die C- und G-Box bzw. deren mutierte Formen nach Multimerisierung in doppelter Anzahl enthielten (Daten nicht gezeigt). Bei insgesamt leicht höheren Grundaktivitäten entsprachen die Ergebnisse, bezogen auf die Aktivierungspotentiale, denen, die mit einem einfachen Bindemotiv erhalten wurden.

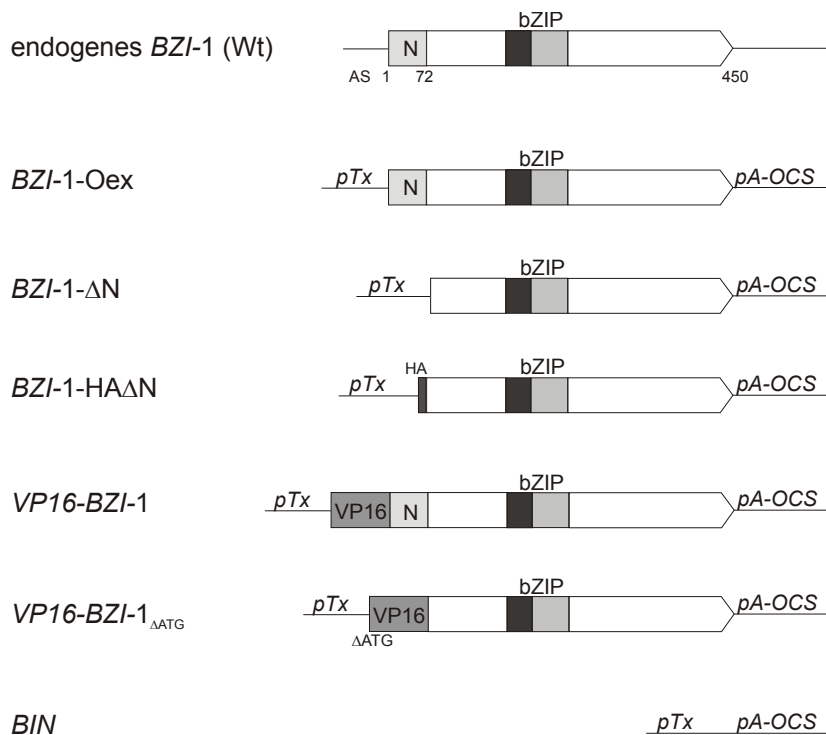
## **5.2 Überexpression von BZI-1 und von BZI-1-Derivaten mit veränderten Aktivierungseigenschaften in transgenen Tabakpflanzen**

Um die BZI-1 Funktion näher *in planta* studieren zu können, wurden transgene Tabakpflanzen erzeugt, die die in den transienten Analysen getesteten BZI-1-Derivate unter Kontrolle des Tx-Promotors (Gatz et al., 1992) exprimieren. Der Tx-Promotor ist ein durch Tetracyclin (Tc) induzierbares CaMV 35S-Derivat. Seine Induzierbarkeit wird über drei Tet-Operatoren im Bereich der TATA-Box reguliert.

Über diesen Promotor wird sowohl eine konstitutive Expression, deren Aktivität dem CaMV 35S-Promotor entspricht, wie auch induzierbare Expression des Transgens in den Pflanzen möglich. Eine konstitutive Expression wird in Pflanzen erzielt, die keinen Tetrazyklinrepressor (TetR) exprimieren. In den Tabakpflanzen Hö20.20, die TetR Protein exprimieren, ist die Expression des Transgens durch Tc-Applikation induzierbar.



Durch die gewählten Konstrukte sollte zum einen die Menge an BZI-1 in transgenen Pflanzen reguliert werden, zum anderen wurde auch eine Modulation des Aktivierungspotentials von BZI-1 angestrebt. Im Einzelnen wurden die Pflanzen mit den in Abbildung 5.8 schematisch dargestellten Konstrukten transformiert.



**Abbildung 5.8** Schematische Darstellung der in der Pflanzentransformation verwendeten Konstrukte. Die für BZI-1 codierende Sequenz ist als Kasten dargestellt, die Domäne N (AS 1-72) ist dabei hellgrau und die VP16 Domäne dunkelgrau unterlegt pTx, Tx-Promotor; pAOCS, OCS-Polyadenylierungssignal; HA, HA-Epitoptag;

Damit enthalten die Pflanzen neben endogenen BZI-1 auch noch transgen eingebrachtes Protein, welches ektopisch exprimiert wird. Jedes Konstrukt wurde jeweils in induzierbare und nicht induzierbare Pflanzen transformiert. Es wurden dabei mehrere Ansätze verfolgt. Um zu klären, ob die Menge an BZI-1-Protein relevant ist, wurde entsprechend die BZI-1-Menge in den Pflanzen erhöht. Dies wurde durch ektopische Überexpression des vollständigen BZI-1-Proteins erzielt (BZI-1-Oex). Eine Verringerung der Menge an funktionalem BZI-1 erfolgte durch einen transdominant negativ ausgerichteten Ansatz (Rieping et al., 1994) durch Expression des BZI-1- $\Delta$ N-Derivats. Da diesem BZI-1-Derivat die aktivierende Eigenschaft des N-terminalen Bereichs fehlt, sollte durch Heterodimerbildung mit endogen codiertem BZI-1 die Menge an funktionsfähigem BZI-1-Protein gesenkt werden. Zusätzlich könnte dieses Protein auch wirken, indem es als Homodimer an Promotor *cis*-Elemente bindet und die Regulation dieser Gene verändert.

A. Strathmann und M. Kuhlmann konnten in bislang unveröffentlichten Experimenten zeigen, daß BZI-1- $\Delta$ N besser an G-Box und C-Box *cis*-Elemente bindet als BZI-1. Ebenfalls ist denkbar, daß BZI-1- $\Delta$ N mit anderen BZI-1-interagierenden bZIP-Proteinen funktionsveränderte Heterodimere bildet. Es wurden auch Pflanzen mit dem *BZI-1-HA $\Delta$ N* Konstrukt transformiert. Dieses besteht aus einer Translationsfusion des HA-Epitoptags mit dem BZI-1- $\Delta$ N-Protein. Damit ist eine Immunodetektion des Proteins in transgenen Pflanzen mit dem  $\alpha$ HA-Antikörper möglich. Der HA-Epitoptag ist N-terminal an BZI-1- $\Delta$ N fusioniert.

In einem weiteren Ansatz wurden Pflanzen mit einem Fusionsgen bestehend aus BZI-1 und der VP16-Aktivierungsdomäne transformiert. Dies sollte für ein Protein codieren, welches an BZI-1-Zielpromotorsequenzen bindet und diese konstitutiv aktiviert. Das gilt allerdings nur, falls die DNA-Bindung von BZI-1 bzw. VP16-BZI-1 nicht weiter reguliert ist. Zur Kontrolle wurden auch transgene Pflanzen hergestellt, die nur das Hygromycinresistenzgen als Selektionsmarker exprimieren, aber kein BZI-1-Derivat oder irgendein weiteres Fremdgen. Diese Pflanzen wurden dann immer als Vergleichspflanzen in den Experimenten eingesetzt, um Effekte auszuschließen, die durch die Regeneration nach der Pflanzentransformation verursacht worden sein könnten. Als weitere Kontrolle wurden Pflanzen mit einem Konstrukt transformiert, welches für ein VP16-BZI-1 $\Delta$ ATG-Fusionsgen codiert. In diesem Konstrukt ist das Adenin des Startcodons deletiert, so daß die Pflanzen zwar, wie in Northern und Western Blot Experimenten überprüft wurde (Daten nicht gezeigt), die RNA exprimieren, diese aber nicht mehr translatiert werden kann.

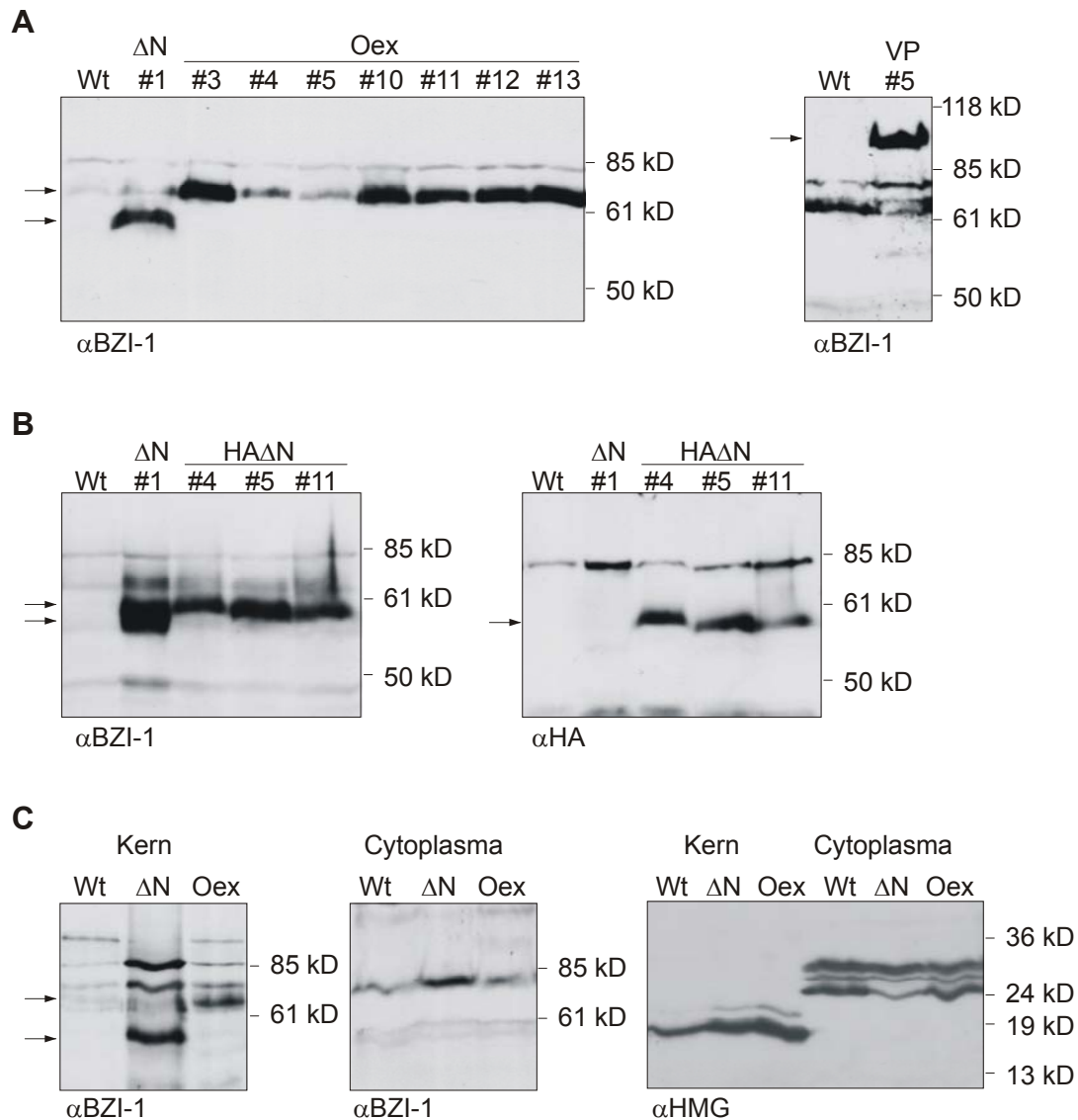
Die nach der Blattscheibentransformation regenerierten Pflanzen wurden in Northern Blot Analysen auf die Expression des Fremdgens getestet, bzw. in Western Blot Analysen unter Verwendung des BZI-1-Antikörpers (Kuhlmann, 2002) auf die Translation des transgen codierten Proteins hin untersucht. Eine Übersicht über einige der getesteten Pflanzen wird in Tabelle 1.1 gegeben. Bei Pflanzen, die BZI- $\Delta$ N, BZI-1-HA $\Delta$ N und VP16-BZI-1 exprimieren, waren phänotypische Veränderungen sowohl der Blüten, wie auch des vegetativen Pflanzenteils zu beobachten. Eine nähere Betrachtung dieser Phänotypen folgt in Abschnitt 5.3.

**Tabelle 5.1 Übersicht über die relative Expressionstärke ausgewählter transgener Pflanzen und der damit verbundenen Ausprägung eines veränderten Phänotyps**

Pflanze	BZI-1-RNA Expression	BZI-1-Protein Expression	Phänotypische Veränderungen
Oex#3	+	++	-
Oex#4	n.t.	+/-	-
Oex#5	n.t.	-	-
Oex#7	n.t.	++	-
Oex#8	n.t.	+	-
Oex#9	n.t.	+	-
Oex#10	n.t.	++	-
Oex#11	n.t.	++	-
Oex#12	n.t.	++	-
Oex#13	++	++	-
$\Delta$ N#1	++	++	++
$\Delta$ N#2	+/-	-	-
$\Delta$ N#3	-	-	-
$\Delta$ N#15A (S1)	++	n.t.	++
$\Delta$ N#15B (S1)	+	++	++
$\Delta$ N#15H	++	++	++
$\Delta$ N#15I	++	+	+
$\Delta$ N#15M	++	n.t.	++
HA $\Delta$ N#1	++	+	++
HA $\Delta$ N#3	+/-	-	-
HA $\Delta$ N#4	++	++	++
HA $\Delta$ N#5	++	++	++
HA $\Delta$ N#7	++	n.t.	++
HA $\Delta$ N#9	+/-	-	-
HA $\Delta$ N#11	+	++	++
HA $\Delta$ N#12	+	+/-	-
VP16#1 - #4	n.t.	-	-
VP16#5	n.t.	++	++
VP16#6 - #12	n.t.	-	-

**Die Angabe der relativen Expressionsstärke von *BZI-1*-RNA und *BZI-1*-Protein wurde bezogen auf den Wildtyp von - (keine Veränderung) bis ++ (sehr starker Veränderung); n.t., nicht getestet.**

In Abbildung 5.9 ist in Western Blot Analysen mit Proteinextrakten ausgewählter Pflanzen die konstitutive Expression des Transgens gezeigt. Die Expression des Transgens auf RNA-Ebene in den verwendeten Pflanzen wird später jeweils in den einzelnen Experimenten gezeigt.



**Abbildung 5.9** Western Blot Analysen zum Nachweis der Expression von BZI-1 und BZI-1-Derivaten in transgenen Pflanzen. Der jeweils für den immunologischen Nachweis eingesetzte Primärantikörper ist unterhalb der einzelnen Abbildungen angegeben. A) Nachweis der Proteinexpression in BZI-1-Oex-, BZI-1- $\Delta N$ - und VP16-BZI-1-Pflanzen. B) Detektion von BZI-1-HA $\Delta N$ -Protein. C) Nachweis der Kernlokalisierung des exprimierten Proteins.

Der BZI-1-Antikörper erkennt in Wildtyppflanzen bei ca. 64 kD schwach ein Protein, welches wahrscheinlich das endogene BZI-1-Protein darstellt. In der BZI-1-Oex-Pflanze wird auf der gleichen Höhe ein wesentlich stärkeres Signal detektiert, welches auf die Überexpression des Proteins zurückzuführen ist. Das um 72 Aminosäuren verkürzte BZI-1- $\Delta N$ -Protein läuft im SDS-Gel deutlich unterhalb des BZI-1-Proteinsignals. Das VP16-BZI-1-Fusionsprotein ergibt im Bereich von 100 kD ein Signal. Die Proteine werden also in Pflanzen nachweisbar exprimiert. Die durch die SDS-Gelelektrophorese ermittelten Proteingrößen sind allerdings sehr ungenau, sie weichen deutlich von den theoretischen Molekularmassen der Proteine ab. So beträgt die errechnete Molekularmasse für das 450

AS große BZI-1-Protein 48,4 kD, für das 378 AS große BZI-1- $\Delta$ N-Deletionsprotein 40,6 kD, für das 388 AS große BZI-1-HA $\Delta$ N-Protein 41,7 kD und für die 584 AS des VP16-BZI-1-Fusionsproteins 62,1 kD. Die Detektion des mit einem HA-Epitoptag markierten BZI-1- $\Delta$ N-Proteins ist durch Verwendung des HA-Antikörpers möglich. In Abbildung 5.9B konnte gezeigt werden, daß der BZI-1-Antikörper sowohl BZI- $\Delta$ N- wie auch BZI-1-HA $\Delta$ N-Protein erkennt, wohingegen der HA-Antikörper nur die Proteine mit dem HA-Epitoptag detektiert. Der Nachweis der Kernlokalisierung der Proteine wurde ebenfalls immunologisch erbracht. Abbildung 5.9C zeigt, daß in isolierten Kernen der transgenen Pflanzen die Proteineexpression nachweisbar ist. In der Cytoplasmafraktion ist dagegen kein transgen exprimiertes Protein nachweisbar. Um wechselseitige Verunreinigungen der Kern- bzw. der Cytoplasmafraktionen auszuschließen, wurden die Extrakte auch mit einem gegen "High Mobility Group"-Proteine (HMG) gerichteten Antikörper getestet. HMG-Proteine sind bevorzugt an transkriptionell aktives Chromatin assoziiert und zeichnen sich durch ein sehr geringes Molekulargewicht von ca. 15 kD aus (zur Übersicht siehe Grasser, 1995). Nur Extrakte der Kernfraktion ergaben in Western Blot Analysen ein Signal in der erwarteten Größe.

Für die weiteren Experimente wurden von den BZI-1-Oex-Pflanzen die Linien Oex#3, Oex#5 und Oex#13, sowie von den BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen die Linien  $\Delta$ N#1,  $\Delta$ NHA#4 und  $\Delta$ NHA#5 ausgewählt. Bei den Pflanzen, in denen die Induktion der Proteinexpression durch Tc Applikation erfolgt, wurde jeweils mit drei unabhängig transformierten Linien gearbeitet. Die Induzierbarkeit des Transgens wurde dann durch Northern Blot bzw. Immunoblotanalysen bei den entsprechenden Versuchen nachgewiesen.

### **5.2.1 Untersuchungen zur Beteiligung von BZI-1 an der Regulation von Genen des Phenylpropanstoffwechsels**

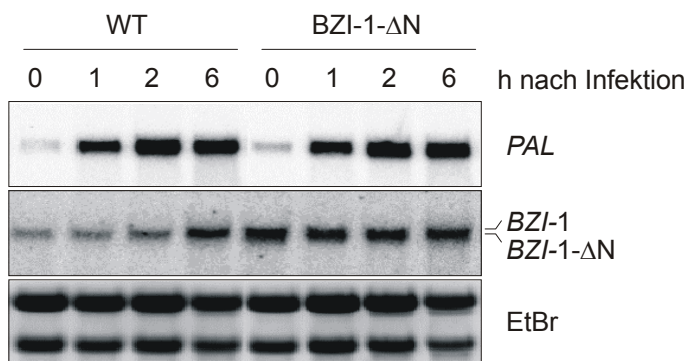
Ausgehend von den bisher vorliegenden Ergebnissen, wurde postuliert, daß BZI-1 an der pathogeninduzierten transkriptionellen Aktivierung von Genen des Phenylpropanstoffwechsels, bzw. deren entwicklungs- oder gewebespezifischer Expression, beteiligt sein könnte (Dröge-Laser et al., 1997). Unter Verwendung der erzeugten transgenen Pflanzen, in denen die BZI-1-Menge bzw. die Aktivierungseigenschaften von BZI-1 moduliert sind, wurde diese Hypothese überprüft.

### 5.2.1.1 Untersuchungen zur Beteiligung von BZI-1 an der Regulation pathogeninduzierter *PAL*-Expression

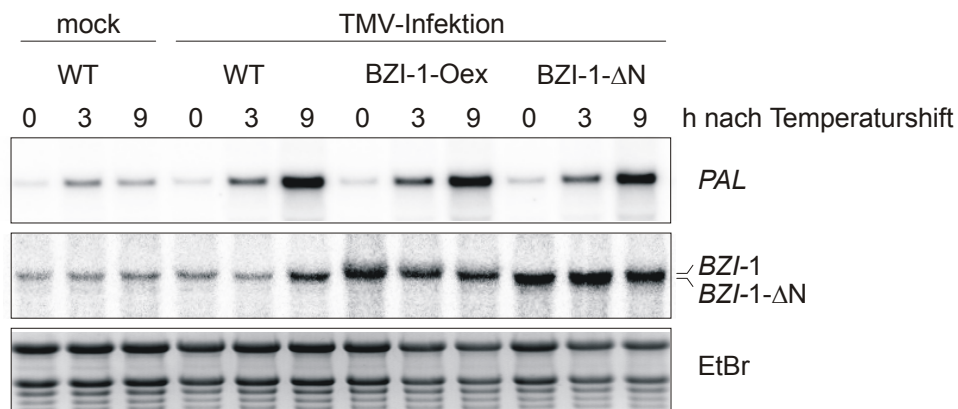
Zuerst wurde die pathogeninduzierte Expression des Gens *PAL* in BZI-Oex- und BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Dazu wurden Tabaksuspensionskulturen mit dem Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. pisi (*P. syringae* pv. pisi) und Tabakpflanzen mit dem Tabak Mosaic Virus (TMV) infiziert. Durch Infektion mit dem Bakterium sollte im Rahmen einer inkompatiblen Abwehrreaktion die Expression der *PAL* induziert werden. Die TMV-Infektion führt über die *N*-Gen vermittelte Resistenz zur Auslösung einer HR (Hypersensitive Response) und in diesem Zusammenhang auch zu einem Anstieg der *PAL*-Transkriptmenge. Durch die Infektion und anschließende viertägige Inkubation der Tabakpflanzen bei 32 °C wird die Ausbreitung des Virus über die gesamte Pflanze ermöglicht, ohne eine Abwehrreaktion auszulösen. Durch eine Temperaturabsenkung auf 24 °C wird dann die HR in allen Geweben synchronisiert ausgelöst (Malamy et al., 1992).

Abbildung 5.10 zeigt, daß die *PAL*-Expression durch Behandlung mit Pseudomonaden nach 1 h deutlich induziert ist, nach TMV-Infektion wird *PAL* innerhalb von 3 h induziert. Eine Veränderung der Induktionsstärke oder der Induktionsgeschwindigkeit der *PAL*-Expression nach Infektion mit *P. syringae* pv. pisi tritt in den BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp allerdings nicht auf.

A



B



**Abbildung 5.10** Northern Blot Analyse der pathogeninduzierten *PAL*- und *BZI-1*-Expression in Wildtyp-, *BZI-1-Oex*- und *BZI-1-ΔN*-Pflanzen. A) Northern Blot Analyse von Tabaksuspensionskulturen nach Infektion mit *P. syringae* pv. *psis*. B) Northern Blot Analyse von Tabakpflanzen nach TMV-Infektion. Bei 32 °C angezogene Pflanzen wurden mit TMV bzw. Puffer (Mock) infiziert und für 4 weitere Tage bei 32 °C kultiviert. Die Probennahme erfolgte nach Temperatursenkung auf 24 °C zu den angegebenen Zeitpunkten.

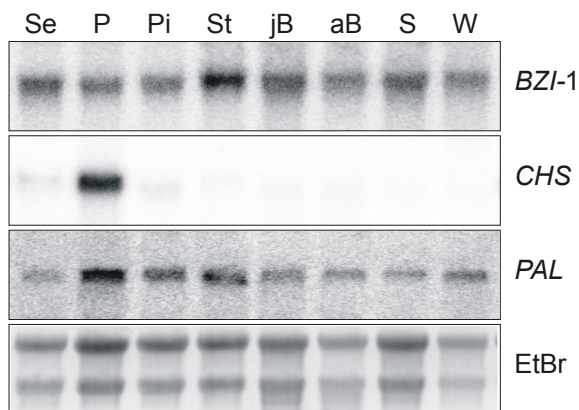
Auch nach TMV-Infektion zeigt sich im Vergleich zum Wildtyp weder bei *BZI-1-Oex*- noch bei *BZI-1-ΔN*-Pflanzen eine Veränderung der *PAL*-Induktionskinetik. In Abbildung 5.10 ist zu erkennen, daß die Transkription von *BZI-1* nach Infektion mit *P. syringae* pv. *psis* innerhalb von 2 bis 6 h ansteigt. Ebenso ist ein Anstieg nach TMV-Infektion zu erkennen. Durch Aufreiben der Pufferlösung (Mock) wird weder die *PAL*- noch die *BZI-1*-Expression deutlich induziert. Die *BZI-1*-Expression ist also durch Pathogene, nicht aber durch Verwundung, induzierbar.

Nach Pathogenbefall kommt es im Rahmen der Pflanzenabwehr sowohl lokal wie auch systemisch zu einem Anstieg des endogenen SA-Levels. Durch exogene Applikation von SA kann so modellhaft bei Pflanzen ein Pathogenbefall simuliert werden, wodurch wiederum an der Pflanzenabwehr beteiligte Gene induziert werden. Daher wurde auch die

*BZI-1*-Expression nach SA-Induktion in Tabakblattscheiben getestet (Daten nicht gezeigt). Eine Behandlung mit SA führt hier allerdings nicht zu einem Anstieg der *BZI-1*-Expression.

### 5.2.1.2 Untersuchungen zur Beteiligung von *BZI-1* an der entwicklungs- und gewebespezifischen Expression von *PAL* und *CHS*

Durch Northern Blot Analysen wurde die Expression der Gene *BZI-1*, *PAL* und *CHS* in verschiedenen Tabakgeweben untersucht (Abbildung 5.11).

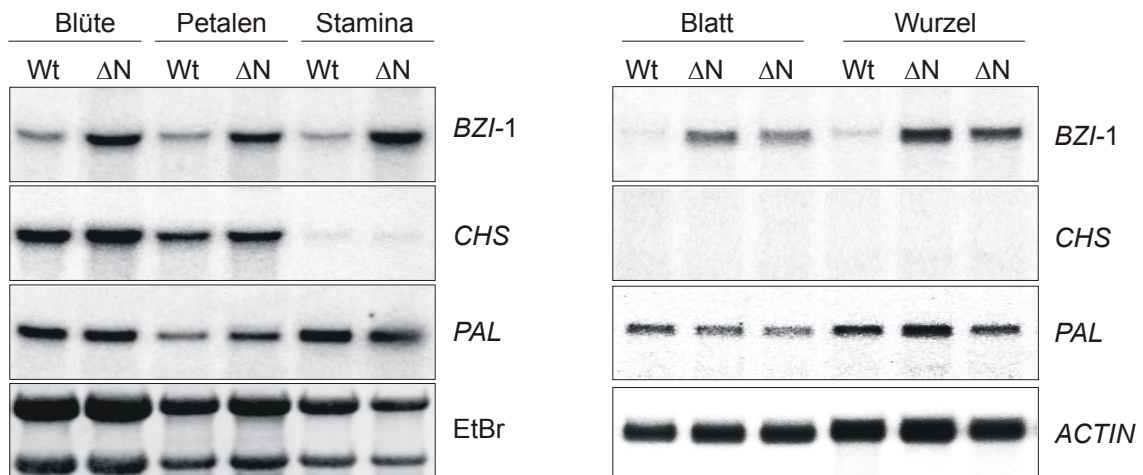


**Abbildung 5.11** Northern Blot Analyse der gewebespezifischen Expression von *BZI-1*, *PAL* und *CHS*. Se, Sepalen; P, Petalen; Pi, Pistill; ST, Stamina; jB, junges Blatt; aB, altes Blatt; S, Stengel; W, Wurzel.

Die Expression der *PAL*- und *CHS*-Gene wird entwicklungs- bzw. gewebespezifisch reguliert. *PAL* wird vorwiegend in den Petalen, der Carpelle und in den Stamina exprimiert. Geringere Mengen finden sich darüber hinaus noch in Wurzeln und im Stengel. *CHS*-mRNA findet sich fast ausschließlich in den Petalen. Im Gegensatz dazu wird *BZI-1* ubiquitär in allen getesteten Tabakgeweben gebildet, wobei sich in den Stamina eine leicht verstärkte Expression findet. Es gibt demnach kein übereinstimmendes Expressionsmuster der Gene *BZI-1*, *PAL* und *CHS*.

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob sich durch Expression von *BZI-1*-Derivaten mit veränderten Transaktivierungseigenschaften das charakteristische Expressionsmuster von *PAL* und *CHS* ändert. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.12 dargestellt.



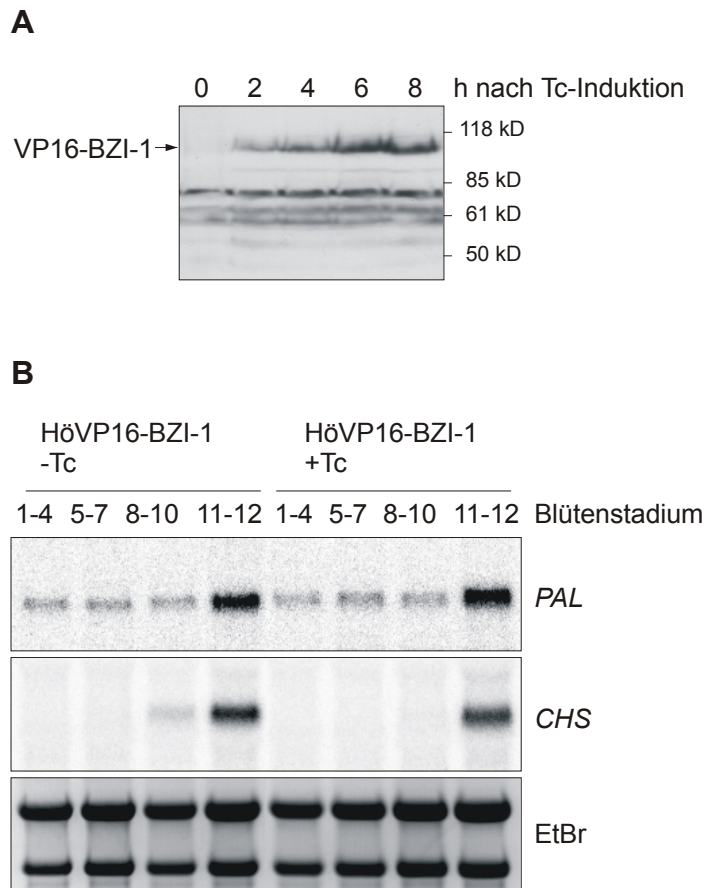


**Abbildung 5.12** Northern Blot Analyse der *PAL*- und *CHS*-Expression in Wildtyp- und *BZI-1-ΔN*-Pflanzen.

In Northern Blot Analysen wurden zum einen gesamte Blüten, sowie Petalen und Stamina, und zum anderen Blätter und Wurzeln von Wildtyp- und *BZI-1-ΔN*-Pflanzen hinsichtlich ihres RNA-Gehaltes an *CHS* und *PAL* getestet. Es war keine Veränderung des Expressionsmusters in diesen Pflanzen nachweisbar. Ein entsprechendes Bild ergab sich auch für *BZI-1-Oex*-Pflanzen.

Sollten *CHS* und *PAL* Zielgene von *BZI-1* sein, so wäre in Pflanzen, die den konstitutiven Aktivator VP16-*BZI-1* exprimieren, eine verstärkte Expression von *PAL* und *CHS* zu erwarten. Die Fähigkeit des VP16-*BZI-1*-Fusionsproteins nach Bindung an DNA *cis*-Elemente die Expression des nachgeschalteten Gens zu aktivieren, wurde in Analysen mit transient transformierten Tabakmesophyllprotoplasten bereits gezeigt.

Von HöVP16-*BZI-1*- sowie Wildtyp-Tabakpflanzen wurden Blüten verschiedener Entwicklungsstadien (nach Drews et al., 1992) geerntet und in Tc-haltiger Pufferlösung infiltriert. Dadurch wurde in den HöVP16-*BZI-1*-Blüten die Expression des Fusionsproteins VP16-*BZI-1* für mehrere Stunden induziert. Die Bildung des Proteins zu verschiedenen Zeitpunkten nach Tc-Induktion wurde immunologisch in einem Western Blot nachgewiesen (Abbildung 5.13). Nach 2 h sind bereits geringe Mengen Protein zu detektieren. Die Proteinmenge nimmt kontinuierlich zu, bis nach 6 h die maximale Expression erreicht ist. Dieser Zeitpunkt wurde dann auch für die Probenahme für die Northern Blot Analyse ausgewählt. In diesen Geweben wurden die *CHS*- und *PAL*-mRNA-Mengen mittels Northern Blot analysiert.



**Abbildung 5.13** Nachweis der Tc-Induktion in Blütenmaterial von HöVP16-BZI-1-Pflanzen. **A)** Western Blot Analyse zum Nachweis der Expression von VP16-BZI-1 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Tc-Induktion. **B)** Northern Blot Analyse der *PAL*- und *CHS*-Expression in Blüten verschiedener Entwicklungsstadien nach Infiltration mit Tc (+Tc) bzw. Puffer (-Tc).

Auch in Blüten verschiedener Entwicklungsstadien zeigte sich keine Veränderung des *CHS*- bzw. *PAL*-mRNA-Gehaltes unter dem Einfluß der VP16-BZI-1-Expression. Ein identisch aufgebautes Experiment wurde statt mit Blüten auch mit Blattmaterial von Wildtyp- und HöVP16-BZI-1-Pflanzen durchgeführt. Auch dabei gab es keinen Einfluß auf die *PAL*- und *CHS*-Expression.

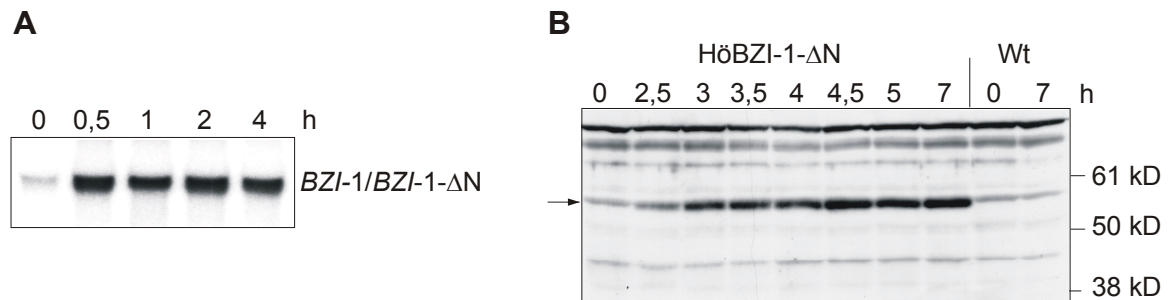
Die Gene *PAL* und *CHS* des Phenylpropanstoffwechsels sind damit keine von BZI-1 regulierten Zielgene.

## 5.2.2 Etablierung eines Differential Display Verfahrens zur Identifizierung BZI-1 regulierter Zielgene

Die Identifizierung von Zielgenen bzw. Zielpromotoren ist eine wichtige Aufgabe bei der Analyse von Transkriptionsfaktoren. Dadurch können die biologischen Funktionszusammenhänge in denen der Transkriptionsfaktor wirkt, näher definiert werden. Von BZI-1 regulierte Zielgene sollten mit Hilfe eines neu etablierten Differential Display Verfahrens gefunden werden, dem "Restriction Fragment Differential Display" (RFDD), welches als displayPROFILE™-Kit von der Firma Display Systems Biotech angeboten wird. Im Gegensatz zur Standard Differential Display PCR, bei der direkt die Erststrang cDNA amplifiziert wird, werden bei der RFDD-PCR nach reverser Transkription und Spaltung mit *TaqI* zwei unterschiedliche Adapter an die cDNA-Fragmentenden ligiert. Ein Adapter trägt am 3'-Ende eine Schutzgruppe, die bei einer PCR eine Extension verhindert, wenn dieser Adapter an beide cDNA-Enden ligiert wurde. Der zweite Adapter trägt diese Schutzgruppe nicht. Bei der sich anschließenden PCR-Reaktion zur Amplifizierung der mit den Adaptern versehenen Fragmente kommt jeweils ein radioaktiv markierter Primer zum Einsatz, der zu dem Adapter mit der Schutzgruppe komplementär ist (0-Extension Primer) und ein zweiter spezifischer Primer (displayPROBE Primer), der zu dem zweiten Adapter komplementär ist. Drei Basen des spezifischen displayPROBE Primers reichen in die cDNA-Sequenz hinein. Diese drei Basen sind dafür verantwortlich, daß der displayPROBE Primers für eine cDNA-Sequenz spezifisch ist. Zusätzlich verhindern sie die Amplifikation von cDNA-Fragmenten, an deren beiden Enden der Standardadapter ligiert wurde, da diese Fragmente an beiden Enden die identischen drei Basen besitzen müßten, um amplifiziert zu werden. Um alle möglichen Variationen amplifizieren zu können, wäre ein von Satz von  $4^3 = 64$  displayPROBE Primern notwendig. In dieser Arbeit wurden die displayPROBE Primer Eu1-Eu48 für die PCR eingesetzt, wodurch dreiviertel aller Variationsmöglichkeiten abgedeckt waren. Nach der PCR wurden die Ansätze in einem Sequenziergel aufgetrennt, welches anschließend auf Fließpapier getrocknet und dann in einer Expositionscassette mit einem Bioimager-Screen für einige Stunden exponiert wurde. Unterschiedlich exprimierte cDNA-Signale wurden aus dem Gel ausgeschnitten und in Wasser gelöst. Durch eine erneute PCR unter Verwendung des O-Extension Primers sowie des displayPROBE Primers, mit dem das ursprüngliche Signal erhalten worden war, wurde das Fragment aus dem Eluat amplifiziert. Das Amplifikat wurde dann mit Hilfe des pGEM-T Kloning Kits in den Vektor pGEM-T kloniert und sequenziert.

Mit dieser Technik wurden zwei unterschiedliche Ansätze getestet. Zuerst wurden Tabaksuspensionskulturen von Wildtyp- und HöBZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen für definierte Zeiträume jeweils mit Tc induziert. Als Wildtyp wurde in diesem Experiment eine Suspensionskultur eingesetzt, die aus einer mit dem leeren Pflanzentransformationsvektor pBINHygTx transformierten Pflanze etabliert wurde (HöBin). Da sowohl der Wildtyp- wie auch der HöBZI-1- $\Delta$ N-Ansatz mit Tc behandelt wurden, sollten die beobachteten Unterschiede der Genexpression spezifisch durch die Tc-Induktion des BZI-1- $\Delta$ N-Transgens hervorgerufen werden.

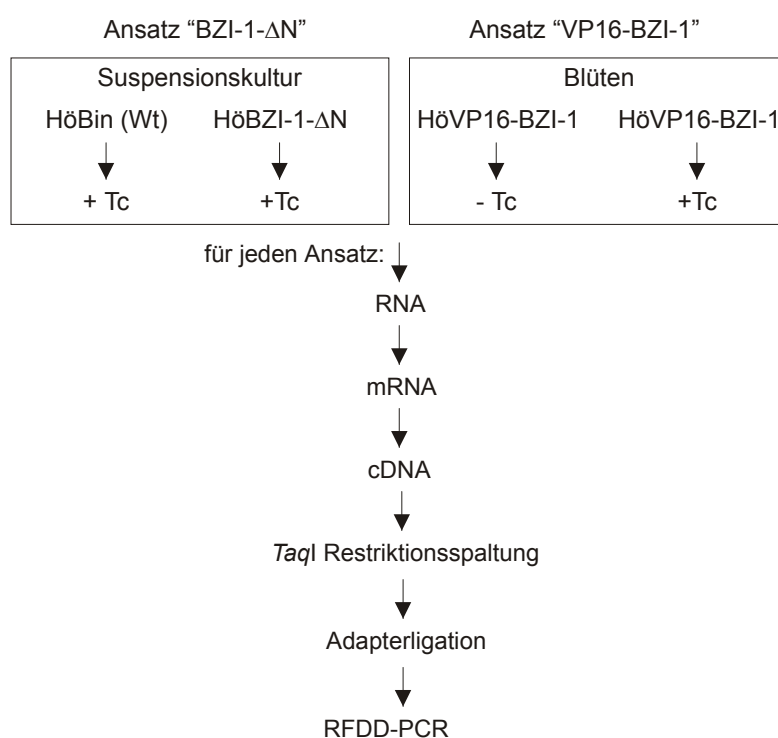
Bevor die Ansätze für das Differential Display eingesetzt wurden, wurde die Tc-induzierte Expression des BZI-1- $\Delta$ N-Deletionsderivates in Northern und Western Blot Analysen nachgewiesen (Abbildung 5.14).



**Abbildung 5.14** Nachweis der Tc-induzierten BZI-1- $\Delta$ N-Expression zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe von Tc (h) in HöBZI-1- $\Delta$ N Suspensionskulturen durch A) Northern Blot Analyse unter Verwendung der BZI-1 Sonde und B) immunologischen Nachweis in einem Western Blot unter Verwendung des  $\alpha$ BZI-1-Antikörpers. BZI-1- $\Delta$ N-Protein ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

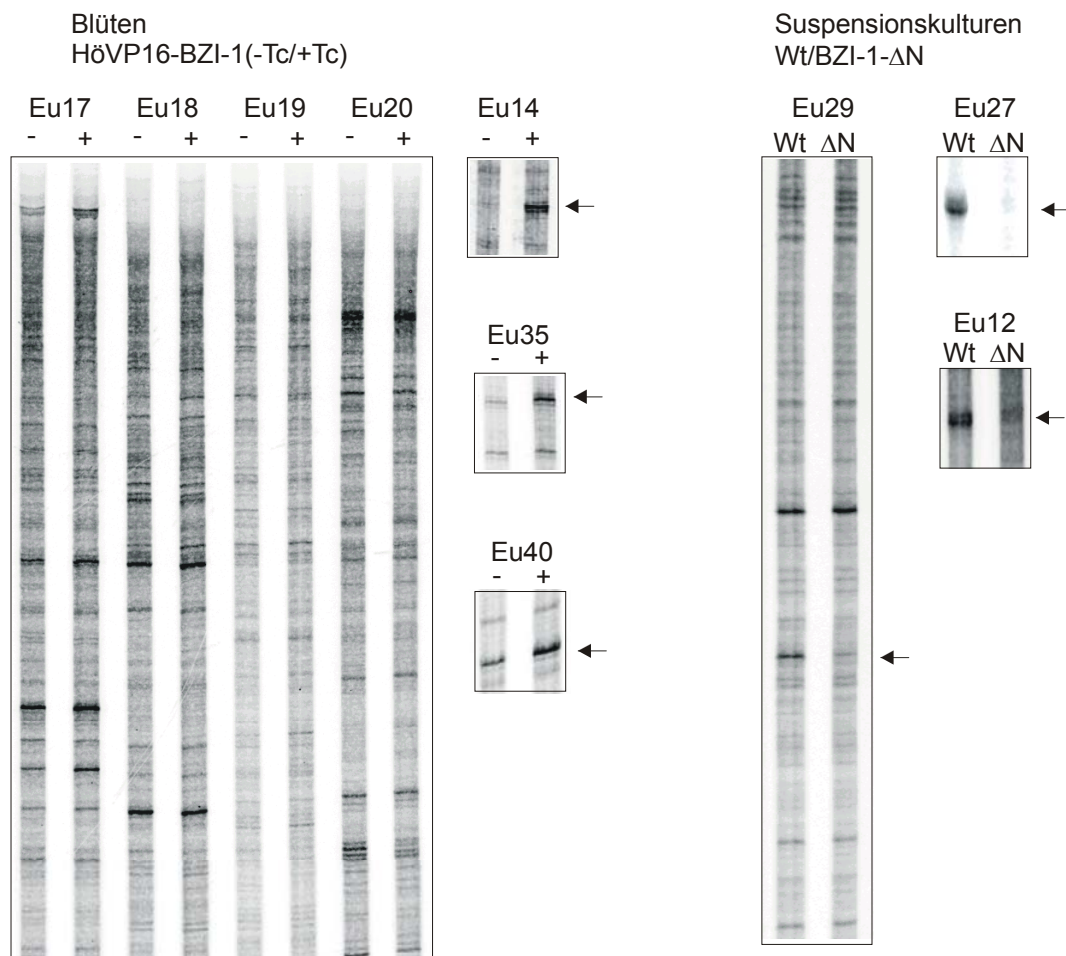
Die Induktion der Transkription erfolgt innerhalb der ersten 30 Minuten und bleibt über den Versuchszeitraum konstant. In der Western Blot Analyse zum Nachweis der Proteinexpression erkennt man eine ähnliche Induktionskinetik wie bei mit Tc infiltrierten HöVP16-BZI-1-Blüten. Zum Zeitpunkt 0 h ist nur endogen in den Suspensionskulturen vorhandenes BZI-1-Protein detektierbar. Geringe Mengen des gebildeten BZI-1- $\Delta$ N-Proteins sind nach 2,5 bis 3 h nachweisbar. Im Kontrollansatz mit den Tc behandelten Wildtyp-Suspensionskulturen ist keine Veränderung der endogenen BZI-1-Menge nachweisbar. Für den Vergleich im Differential Display wurden jeweils Suspensionskulturen 4 h nach der Tc-Induktion eingesetzt. Zu diesem Zeitpunkt sollte genügend Protein gebildet worden sein, um einen Einfluß auf die Expression der von BZI-1 regulierten Zielgene nachweisen zu können.

In einem zweiten Ansatz wurde in Blüten von HöVP16-BZI-1-Pflanzen die Expression des Fusionsproteins VP16-BZI-1 für eine Dauer von 4 h durch Tc-Infiltration induziert. In einem Vergleichsansatz wurden die Blüten derselben Pflanze nur mit Puffer behandelt. Dieser Differential Display Ansatz wurde gewählt, da es aufgrund der später noch ausführlich beschriebenen phänotypischen Veränderungen in Blüten von BZI-1- $\Delta$ N Pflanzen, Hinweise auf eine Beteiligung von BZI-1 an der Blütenentwicklung gab. In den mit Tc induzierten Blüten sollte durch die Bindung des gebildeten Proteins VP16-BZI-1 an Zielpromotorsequenzen, deren Expression angeschaltet bzw. verstärkt werden. Durch einen Vergleich mit den nicht induzierten Blüten sollten sich auf diese Weise durch BZI-1 regulierte Gene identifizieren lassen. In diesem Experiment wurden alle Blüten von einer einzigen Pflanze (HöVP16-BZI-1) geerntet, wodurch Unterschiede in der Genexpression vermieden wurden, die durch die Anzucht zweier unterschiedlicher Pflanzen (Wildtyp und HöVP16-BZI-1) hätten begründet sein können. Allerdings lassen sich in diesem Ansatz keine unspezifisch durch Tc verursachte Effekte ausschließen. Das in diesem Experiment verwendete Blütenmaterial wurde bereits im vorangehenden Kapitel (Abbildung 5.13) auf die Induzierbarkeit des VP16-BZI-1-Proteins getestet. Für diesen Versuch wurden jetzt die Blüten aller Entwicklungsstadien vereinigt, um ein möglichst breites Spektrum möglicher Zielgene zu erhalten. Abbildung 5.15 zeigt eine Übersicht der Differential Display Ansätze und des gesamten Versuchsablaufs.



**Abbildung 5.15 Versuchsaufbau und Ablaufschema des RFDD. Details siehe Text.**

In Abbildung 5.16 ist ein typisches Ergebnis eines RFDD-PCR-Gels dargestellt. Man erkennt die gute Reproduzierbarkeit der Signale innerhalb der identischen displayPROBE Primer. Im linken Teil der Abbildung ist ein exemplarisches Autoradiogramm von im Sequenziergel aufgetrennten RFDD-PCR-Ansätzen gezeigt, bei denen keine differentiell exprimierten Signale zu erkennen sind. Diese sind in Detailausschnitten weiterer Autoradiogramme im rechten Teil der Abbildung unter Angabe der verwendeten Primer gezeigt.



**Abbildung 5.16** Autoradiogramme der in Sequenziergelen aufgetrennten RFDD-PCRs des VP16-BZI-1-Ansatzes und des BZI-1-ΔN-Ansatzes. Die angegebenen Primer wurden jeweils in Kombination mit dem radioaktiv markierten 0-Extension Primer für die PCR eingesetzt. Die unterschiedlich exprimierte Signale sind durch Pfeile markiert.

Nach erfolgter Auftrennung der RFDD-PCRs im Sequenziergel wurden nur Fragmente zur Isolierung ausgewählt, deren Expressionstärken deutlich unterscheidbar war. Im VP16-BZI-1-Ansatz wurden ausschließlich hochregulierte Signale und im BZI-1-ΔN-Ansatz wurden nur herunterregulierte Signale isoliert. Es gab in beiden Ansätzen auch einige wenige Signale, die in jeweils umgekehrter Weise reguliert wurden, die Unterschiede in

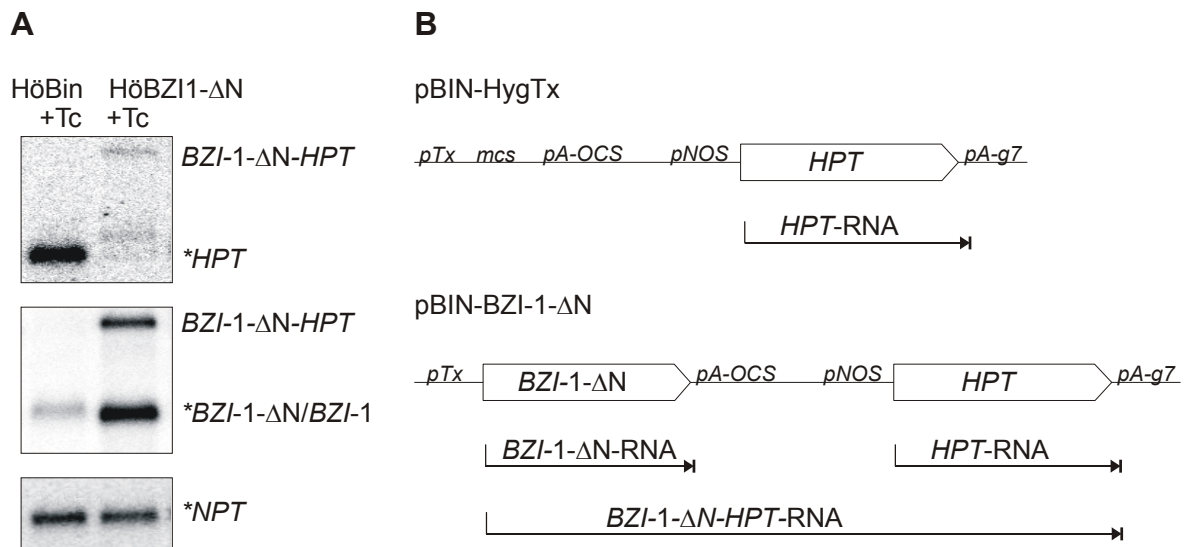
deren Expressionsstärke waren aber so gering, daß auf eine Isolierung verzichtet wurde. In den Ansätzen wurden verschiedene Teilsequenzen potentieller Zielgene erhalten. In Tabelle 5.2 sind alle im Differential Display identifizierten Gene aufgelistet. Dabei wurden die isolierten Nukleotidsequenzen erst in allen möglichen Leserahmen translatiert und dann durch Datenbankvergleich (BLAST, Altschul et al., 1997) bereits bekannten Proteinen zugeordnet.

**Tabelle 5.2 Übersicht der im BZI-1- $\Delta$ N Ansatz und im VP16-BZI-1 Ansatz im Differential Display isolierten Gene.**

Differential Display Ansatz BZI-1- $\Delta$ N				
Primer	+/-	BLAST-Ergebnis Homologievergleich der RFDD-Teilsequenz	Genbank Accession	Eigenschaft/Funktion
EU12	-	Hygromycin B Phosphotransferase (HPT)		Resistenzgen
EU12	-	Hydroxymethyltransferase-like Protein aus <i>A. thaliana</i>	NC003075	Hydroxymethyltransferase
EU17	-	RNA binding Glycine-rich Protein (RGP1b) aus <i>N. sylvestris</i>	D16205	streßinduzierbar
EU27	-	Hygromycin B Phosphotransferase (HPT)		Resistenzgen
EU29	-	RNA binding Glycine-rich Protein (RGP1b) aus <i>N. tabacum</i>	D16205	streßinduzierbar
EU29	-	Thioredoxin (TRX) aus <i>N. tabacum</i>	X58527	cytoplasmatisches Thioredoxin
EU18	-	Glycosyltransferase aus <i>A. thaliana</i>	AF006081	Glycosyltransferase
Differential Display Ansatz VP16-BZI-1				
Primer	+/-	BLAST-Ergebnis Homologievergleich der RFDD-Teilsequenz	Genbank Accession	Eigenschaft/Funktion
EU14	+	Centrin (CEN1) aus <i>N. tabacum</i>	AF072519	Cytoskelettprotein, elicitorinduzierbar
EU14	+	Nictaba (NT1) aus <i>N. tabacum</i>	AF389848	jasmonatinduzierbar
EU40	+	Xylosidase aus <i>N. tabacum</i>	NP199747	Xylosidase
EU40	+	putatives Protein aus <i>A. thaliana</i>	NP198924	GDPD
EU35	+	SKP1-like aus <i>N. clevelandii</i>	AF070967	Zellzyklus, Auxinantwort
EU35	+	Nt-SubD10 aus <i>N. tabacum</i>	AB040410	elicitorinduzierbar

Die angegebenen Primer wurden jeweils in Kombination mit dem 0-Extension Primer in der RFDD-PCR eingesetzt. GDPD, Glycerophosphoryldiesterphosphodiesterase; +, induzierte Expression des Gens in der RFDD-PCR; -, reduzierte Expression des Gens in der RFDD-PCR.

Als erstes differentiell exprimiertes Gen wurden in in zwei BZI-1- $\Delta$ N-Ansätzen mit den displayPROBE Primern EU12 und EU27 unterschiedliche Teilsequenzen des Hygromycin B Resistenzgens, (Hygromycinphosphotransferase, HPT) isoliert. Dieses ist identisch mit dem durch die agrobakterienvermittelte Pflanzentransformation als Selektionsmarker eingebrachten Resistengen. Die Isolierung dieses Gens kann man als Positiv-Kontrolle des Differential Display Systems verwenden.



**Abbildung 5.17 Tc-induzierte BZI-1- $\Delta$ N-Expression (+Tc) in HöBin und HöBZI-1- $\Delta$ N Suspensionskulturen** A) Northern Blot Analyse der Expression der Gene *HPT*, *NPT* und *BZI-1* und *BZI-1- $\Delta$ N* nach Tc-Induktion. Die jeweils verwendeten radioaktiv markierten Sonden sind mit einem Stern gekennzeichnet. B) Schematische Darstellung der verwendeten DNA-Konstrukte und der nach Tc-Induktion davon abgelesenen RNAs. Bei der *BZI-1- $\Delta$ N* mRNA erfolgt der Abbruch der Transkription durch das *OCS*-Polyadenylierungssignal (*pA-OCS*). In einigen Fällen erfolgt dieser Abbruch jedoch erst nach Bildung der *BZI-1- $\Delta$ N-HPT*-RNA durch das *pA-g7* Polyadenylierungssignal. *pTx*, Tx-Promotor; *mcs*, multiple cloning site; *pNOS*, NOS-Promotor.

In Northern Blot Analysen (Abbildung 5.17) wurde gezeigt, daß durch Tc-Induktion die Transkription des direkt stromabwärts der *BZI-1- $\Delta$ N*-Sequenz lokalisierten *HPT*-Gens reduziert wird. Die Expression eines weiteren in der Pflanze vorliegenden Resistenzgens, der Kanamycinresistenz-vermittelnden Neomycinphosphotransferase (*NPT*) wird nicht verändert. Da sowohl das *HPT*-Gen, wie auch das *NPT*-Gen jeweils unter Kontrolle des NOS-Promotors stehen, ist ein Einfluß von Tc auf den Promotor der Resistenzgene auszuschließen. Nach Tc-Induktion in HöBZI-1- $\Delta$ N-Suspensionskulturen wird im Northern Blot oberhalb des *BZI-1- $\Delta$ N*- bzw. des *HPT*-Transkripts noch ein weiteres Signal detektiert, welches auf ein Durchlesen der RNA-Polymerase bis in das *HPT*-Gen hinein zurückzuführen ist. Dies könnte zur Unterdrückung der *HPT*-Transkription bzw. zu

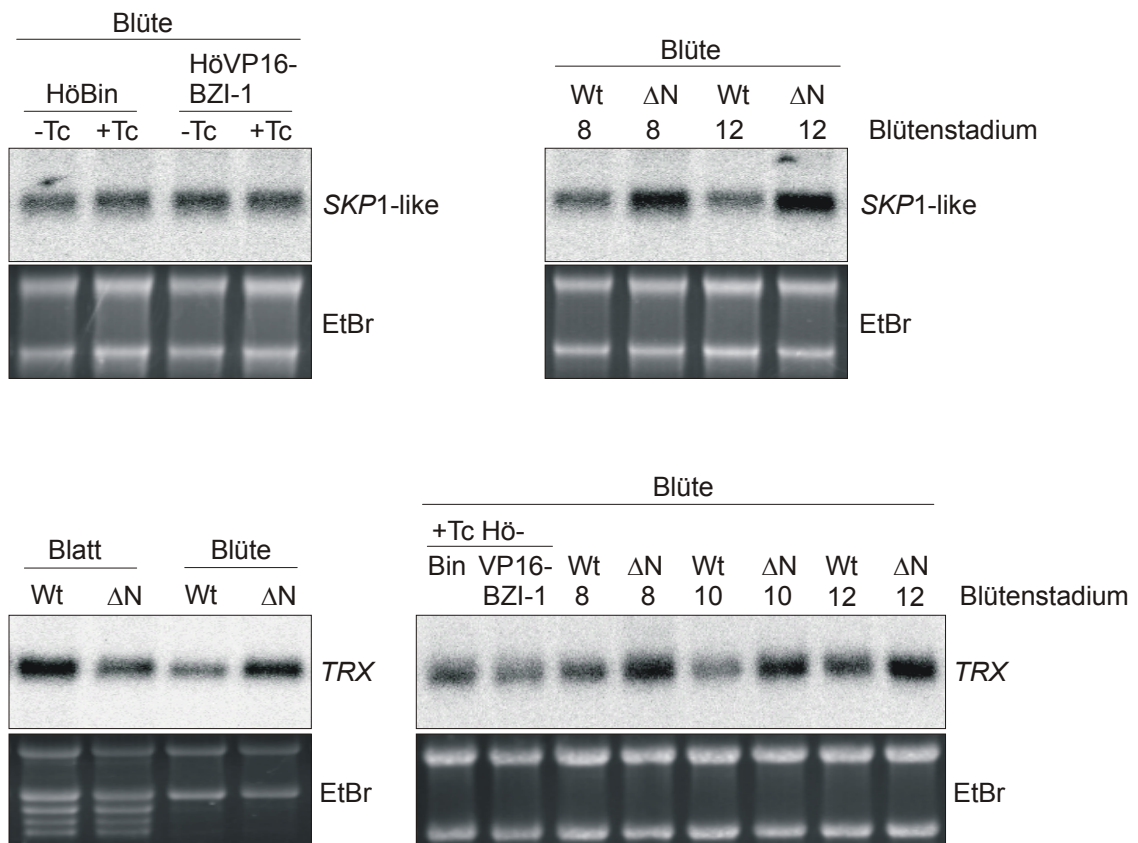


Interferenzen mit der *HPT*-mRNA führen, und so zu einer Reduktion der *HPT*-Transkriptmenge. Mit diesem Ergebnis konnte gezeigt werden, daß das verwendete Differential Display System prinzipiell geeignet ist, unterschiedlich regulierte Gene zu identifizieren.

Ob es sich bei den isolierten Genen tatsächlich um differentiell exprimierte Gene handelte, wurde in Northern Blot Analysen mit vom Differential Display Ansatz unabhängigen RNA-Proben. überprüft. Es wurden RNA-Proben aus Blatt- und Blütenmaterial von Wildtyp- und BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen und Blüten von HöBin- und HöVP16-BZI-1-Pflanzen auf die Expression der isolierten Gene getestet. Als ein mögliches Zielgen konnte im VP16-BZI-1-Ansatz ein Gen identifiziert werden, welches für ein SKP1-ähnliches Protein codiert. Die Größe des isolierten cDNA-Fragments beträgt 120 bp. Die Aminosäuresequenz zu dem SKP1-like Protein aus *Nicotiana clevelandii* ist zu 89 % identisch. Für SKP1-ähnliche Proteine ist bekannt, daß sie den Zellzyklus in der Mitose regulieren. Als Bestandteil einer Untereinheit der Ubiquitin-Ligase sind sie am Ubiquitin vermittelten Abbau von Proteinen beteiligt, dadurch besteht auch eine Verbindung zur Auxinantwort (zur Übersicht siehe Peters et al., 1998). Northern Blot Analysen der HöVP16-BZI-1-Pflanzen sowie von BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen ergaben unterschiedliche Ergebnisse in Bezug auf die *SKP1*-like-Transkriptmenge in den transgenen Pflanzen (Abbildung 5.18). Obwohl *SKP1*-like über seine in induzierten VP16-BZI-1-Blüten verstärkte Expression identifiziert wurde, konnte in ersten Nachtests diese Verstärkung nicht reproduziert werden. Dagegen zeigen Blüten von BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen in verschiedenen Entwicklungsstadien wiederholt eine verstärkte Expression dieses Gens im Vergleich zum Wildtyp. Diese Ergebnisse müssen in weiteren Experimenten allerdings noch an zusätzlichen Pflanzenlinien näher untersucht werden.

Im BZI-1- $\Delta$ N-Ansatz wurde ein 180 bp Fragment mit einer 99 %igen Homologie zu dem Gen *Thioredoxin (TRX)* aus *N. tabacum* gefunden. Thioredoxine reduzieren spezifisch Disulfidbrücken von Zielproteinen. Das cytosolische Thioredoxinsystem ist u.a. an der Aktivierung einiger Transkriptionsfaktoren und an der Regulation des Apoptosesignalweges beteiligt (zur Übersicht siehe Arner und Holmgren, 2000).

Erste Nachtests ergaben eine Reduktion der *TRX*-mRNA in Blättern von BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen. In den Blüten dieser Pflanzen ist die Expression des Thioredoxins dagegen verstärkt (Abbildung 5.18).



**Abbildung 5.18** Northern Blot Analyse der Expression der im RFDD isolierten Gene *TRX* und *SKP1-like*. Es wurden RNA-Proben aus Blatt- und Blütenmaterial verschiedener Entwicklungsstadien von Wildtyp- und BZI-1-ΔN-Pflanzen und Blüten von HöBin- und HöVP16-BZI-1-Pflanzen mit (+Tc) und ohne Tc-Induktion (-Tc) auf die Expression der isolierten Gene getestet.

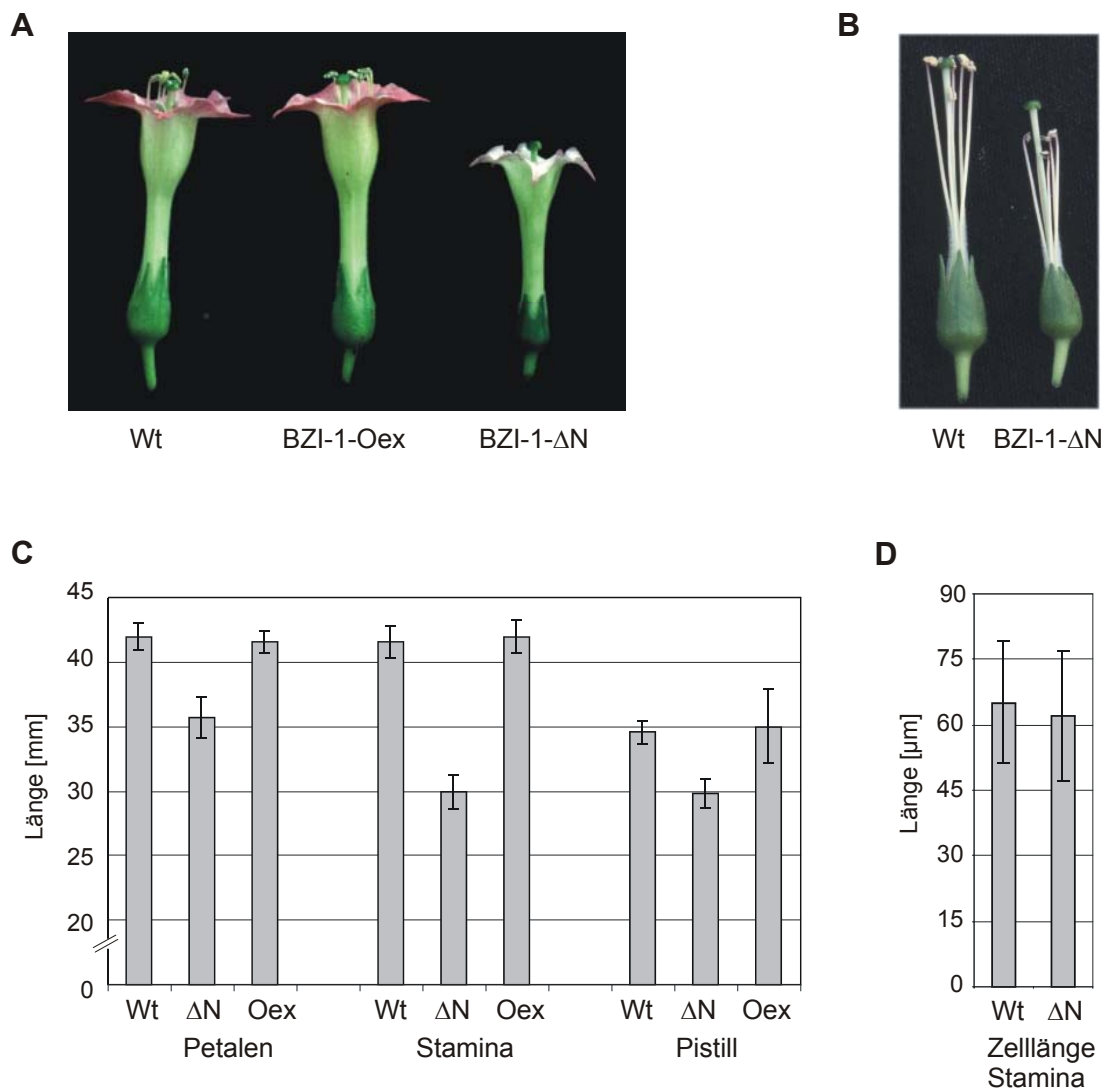
*SKP1-like* und *TRX* stellen also mögliche von BZI-1 regulierte Zielgene dar. Bei allen weiteren im Differential Display gefundenen Genen konnte in den Northern Blot Nachtests kein Einfluß von BZI-1 auf deren Expression reproduziert werden. Hierbei handelt es sich demnach nicht um BZI-1 regulierte Zielgene.

Im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit war eine nochmalige Überprüfung der *SKP1* und *TRX* Expression leider nicht mehr möglich. Eine Analyse zusätzlicher unabhängiger Pflanzenlinien ist daher unbedingt notwendig.

### 5.3 Analyse transgener Tabakpflanzen, die BZI-1 und BZI-1-Derivate mit veränderter Aktivierungseigenschaft exprimieren

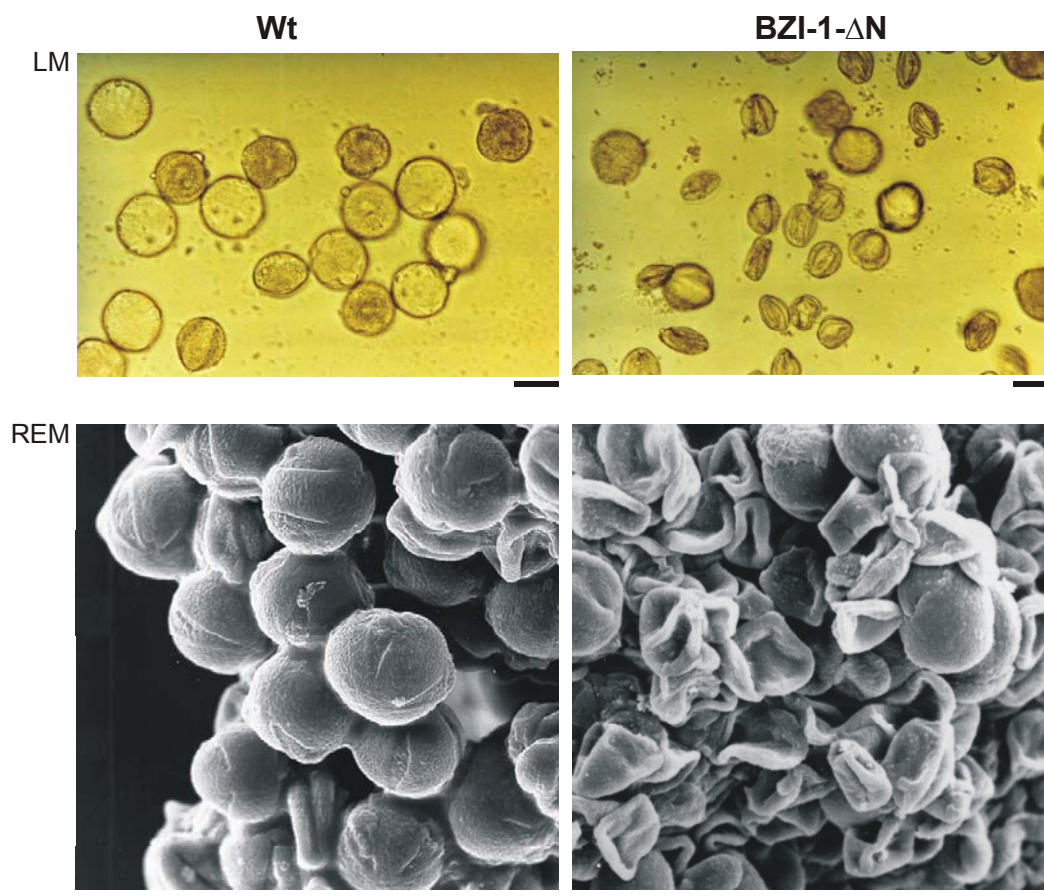
#### 5.3.1 Blütenmorphologie

Vergleicht man Wildtyp-Tabakblüten mit denen von Pflanzen, die BZI-1- $\Delta$ N exprimieren, fällt auf, daß diese Blüten einen pleiotropen Phänotyp zeigen (Abbildung 5.19).



**Abbildung 5.19** Vergleich der Blüten von Wildtyp-, BZI-1- $\Delta$ N- und BZI-1-Oex-Pflanzen. **A)** Seitenansicht vollständig entwickelter Blüten. **B)** Seitenansicht der Stamina von Wildtyp- und BZI-1- $\Delta$ N-Blüten nach Entfernen der Petalen. **C)** Längenvergleich ausgewählter Blütenorgane der in **A)** gezeigten Blüten. Die Länge der Petalen und Stamina wurden ausgehend von der Basis der Sepalen und die Länge des Pistills ausgehend vom Übergang zum Fruchtknoten gemessen. Die Messungen wurden an jeweils 20 Blüten verschiedener Wildtyp- und transgener Pflanzen vorgenommen. **D)** Längenvergleich der filamentbildenden Zellen in den Stamina von Wildtyp- und BZI-1- $\Delta$ N-Blüten.

Die Blüten sind insgesamt um ein Drittel kleiner als Wildtypblüten des gleichen Entwicklungsstadiums, dabei sind besonders die Petalen und die Stamina stark verkürzt. Dagegen sind BZI-1-Oex-Blüten von Wildtypblüten phänotypisch nicht zu unterscheiden. Eine Quantifizierung der Größe der einzelnen Blütenorgane ist ebenfalls in Abbildung 5.19 angegeben. Lichtmikroskopische Messungen der die Filamente bildenden Zellen ergaben, daß deren Größe bei Wildtypblüten und transgenen Blüten fast identisch ist. Daher muß für die Ausbildung der kürzeren Filamente eine verringerte Zellanzahl verantwortlich sein. Es fällt zudem auf, daß die Pollen der BZI-1- $\Delta$ N-Blüten morphologisch verändert sind. Abbildung 5.20 zeigt Aufnahmen von Pollen von Wildtyp- und BZI-1- $\Delta$ N-Blüten, die mit einem Lichtmikroskop (LM) bzw. mit einem Rasterelektronenmikroskop (REM) angefertigt wurden (Die Präparation der REM-Proben und die REM-Aufnahmen wurden von G. Weiß durchgeführt).

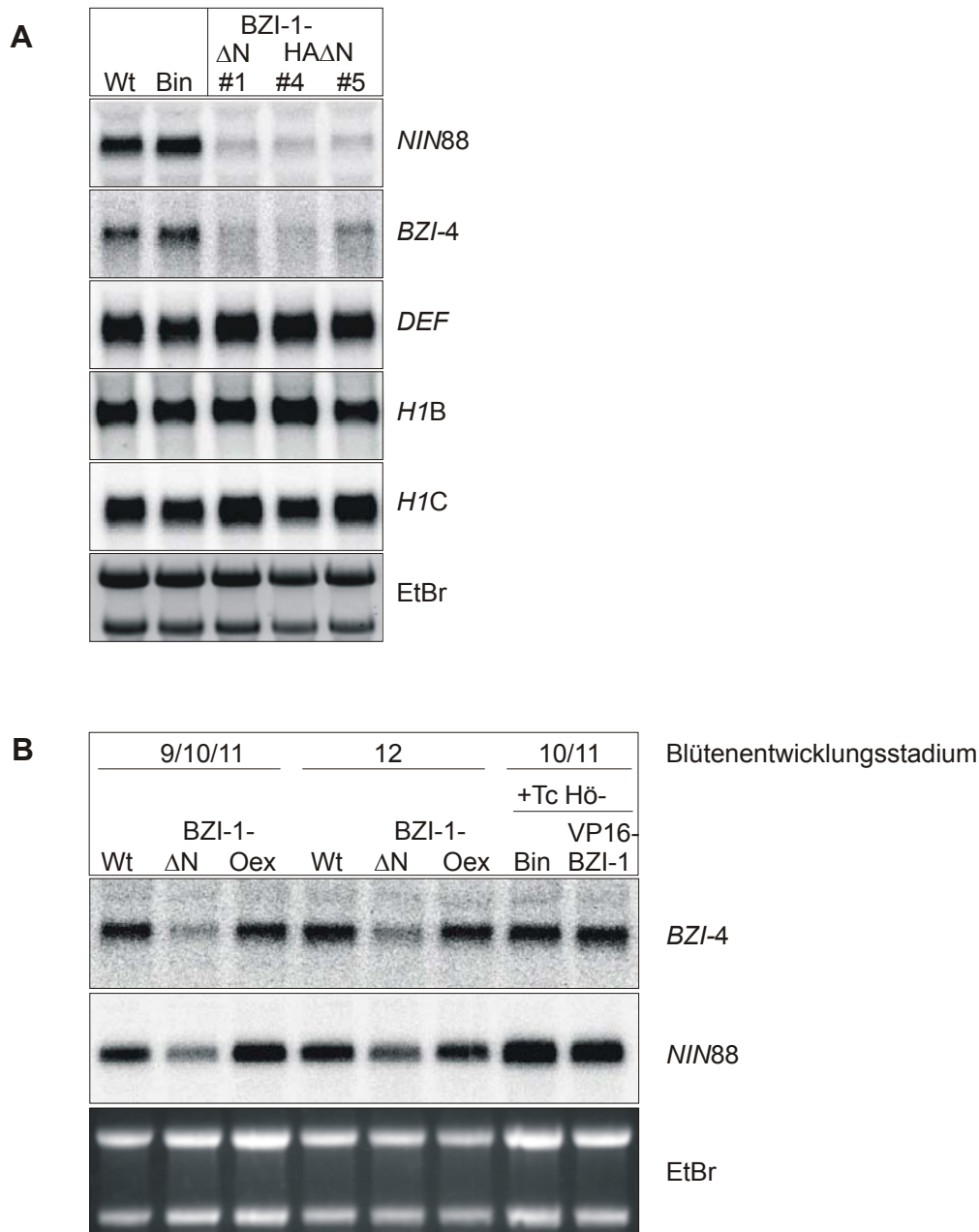


**Abbildung 5.20** Phänotyp von Wildtyp- und BZI-1- $\Delta$ N-Pollen. Die Aufnahmen wurden mit einem Lichtmikroskop (LM) bzw. Rasterelektronenmikroskop (REM) angefertigt. Der Balken unter den einzelnen Fotos gibt jeweils die Länge von 20  $\mu$ m an.

Man erkennt, daß ein Großteil der BZI-1- $\Delta$ N-Pollen degeneriert und infertil erscheint. Die Anzahl der gebildeten fertilen Samen ist in diesen Blüten ebenfalls reduziert, die Samenkapseln sind deutlich kleiner. Bestäubt man jedoch BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen mit Wildtyppollen, so werden normale Samenkapseln mit einer normalen Anzahl keimfähiger Samen gebildet. Das deutet darauf hin, daß in BZI-1- $\Delta$ N-Blüten die Entwicklung der Mikrosporen beeinflusst ist.

Dies entspricht einem von Goetz et al. (2001) beschriebenen Phänotyp, der bei der Pollenentwicklung von Pflanzen auftritt, in denen der Gehalt der blütenspezifisch exprimierten extrazellulären Invertase *NIN88* durch antisense-Expression vermindert wurde. Die Invertase sorgt spezifisch in den Antheren für die Spaltung des Disaccharids Sucrose in Fructose und Glucose, die dann als Energiequelle über spezielle Hexosetransporter in die Zellen aufgenommen werden.

Northern Blot Analysen mit Gesamt-Blüten mehrerer Wildtyp- und BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen zeigen in den transgenen Linien eine verringerte Menge an *NIN88*-mRNA. Die mRNA-Menge des Gens *BZI-4*, welches für einen blütenspezifisch exprimierten BZI-1-Interaktionspartner codiert, ist dort ebenfalls stark reduziert.



**Abbildung 5.21** Northern Blot Analyse der Blüten von Wildtyp- und BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen. **A)** Es wurden Blüten von Wildtyp-, Bin- und BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen auf die Expression der Gene *NIN88*, *BZI-4*, *DEF*, *H1B* und *H1C* analysiert. **B)** Es wurden Stamina von Blüten der angegebenen Entwicklungsstadien von Wildtyp-, BZI-1- $\Delta$ N- ( $\Delta$ N), BZI-1-Oex-Pflanzen (Oex), sowie von HöBin- und HöVP16-BZI-1-Pflanzen nach Tc-Induktion (+Tc) auf die Expression der Gene *BZI-4* und *NIN88* analysiert.

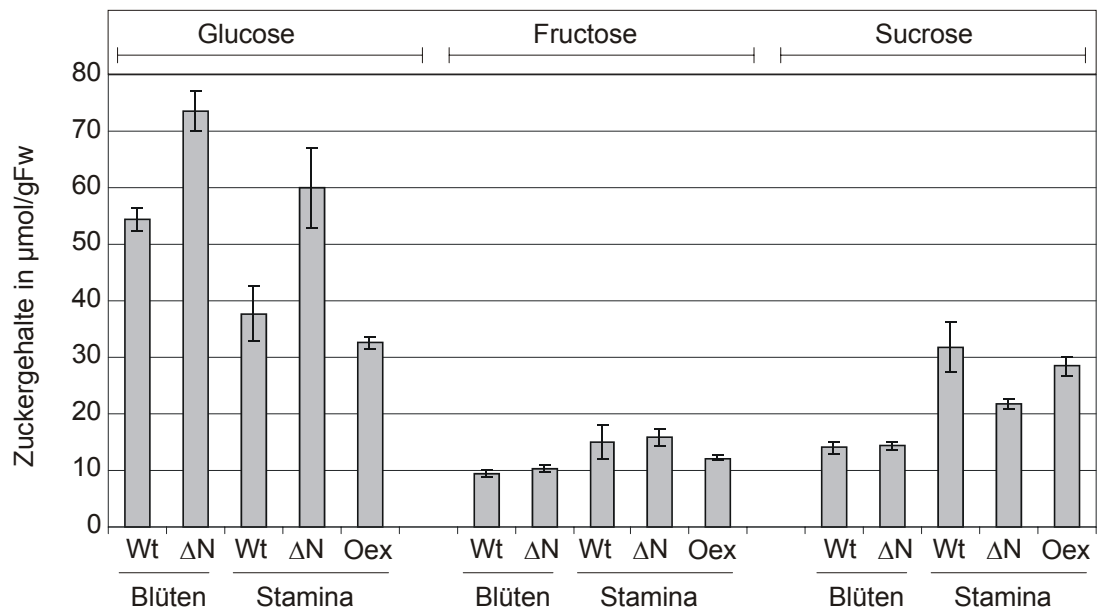
Um zu überprüfen, ob weitere Gene ebenfalls in ihrer Regulation verändert sind, wurde u.a. die Expression des Blütenorganidentitätsgens *DEFICIENS* (*DEF*) in Northern Blot Analysen getestet. *DEF* codiert für einen MADS-Box Transkriptionsfaktor, der in Blüten die Bildung der Petalen sowie der Stamina reguliert (Davies et al., 1996). Obwohl in den BZI-1- $\Delta$ N-Blüten hauptsächlich diese beiden Blütenorgane verändert sind, ist die Expression von *DEF* davon nicht betroffen.

In Pflanzen mit reduzierten Mengen der Histonvarianten H1A und H1B, und einem damit verbundenem Anstieg der Histonvarianten H1C-H1F, konnten Veränderungen bei der Blütenentwicklung gezeigt werden, die dem Phänotyp der BZI-1- $\Delta$ N-Blüten ähnlich sind (Prymakowska-Bosak et al., 1999). Die Blüten sind ebenfalls in ihrer Größe reduziert und männlich steril. Die Expression der Histonvarianten H1B und H1C ist in BZI-1- $\Delta$ N-Blüten im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert. Die Ausprägung des BZI-1- $\Delta$ N-Phänotyps ist also nicht auf eine veränderte Histonzusammensetzung in den Blüten zurückzuführen, ebenso ist ein Einfluß von BZI-1 auf die Expression von H1B und H1C auszuschließen.

Da *BZI-4*- und *NIN88*-Transkripte innerhalb der Blüte hauptsächlich in den Stamina lokalisiert sind (Strathmann et al., 2001; Goetz et al., 2001), wurde deren Expression in Stamina verschiedener Entwicklungsstadien in Northern Blot Analysen untersucht. In den Stamina von BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen ist die Expression von *BZI-4* und *NIN88* stark reduziert. In den Stamina der BZI-1-Oex-Pflanzen ist dagegen kein Unterschied zum Wildtyp erkennbar. Ebenso wenig führt eine Tc-abhängige Expression des VP16-BZI-1-Proteins in den Stamina zu verstärkter *BZI-4*- oder *NIN88*-Transkription. Für diese Tc-Induktion wurden ganze Blüten von Wildtyp- und von HöVP16-BZI-1-Pflanzen für 6 h in Tc haltiger Pufferlösung inkubiert, die Stamina wurden erst nach der Induktion isoliert.

### **5.3.2 Bestimmung der Zuckerkonzentrationen der Blüten transgener Tabakpflanzen**

Die in Wildtyp- und BZI-1- $\Delta$ N-Blüten unterschiedliche Expressionsstärke der Invertase *NIN88* könnte in einer veränderten Zuckerzusammensetzung in den Blüten, speziell in den Stamina, resultieren. Extrazelluläre Invertasen sorgen für eine Sucroseentladung aus dem Phloem in den Apoplasten, indem sie Sucrose dort spalten und die entstehenden Hexosen über spezifische Transporter in die Zellen aufgenommen werden. Durch den entstehenden Sucrosegradienten wird so weiterhin Sucrose aus dem Phloem über Sucrosetransporter in den Apoplasten entladen. Inwieweit die Kohlenhydratzusammensetzung in den morphologisch veränderten transgenen Blüten betroffen ist, wurde durch Messungen der Zuckerspiegel in Kooperation mit G. Lohaus, Universität Göttingen, untersucht. Von blühenden Wildtyp- und BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen wurden jeweils vollständige Blüten der Entwicklungsstadien 9-11 geerntet, von Wildtyp-, BZI-1- $\Delta$ N- und BZI-1-Oex-Blüten wurden zusätzlich Stamina derselben Entwicklungsstadien isoliert. Die Ergebnisse der Zuckerbestimmung sind in einem Balkendiagramm (Abbildung 5.22) dargestellt.



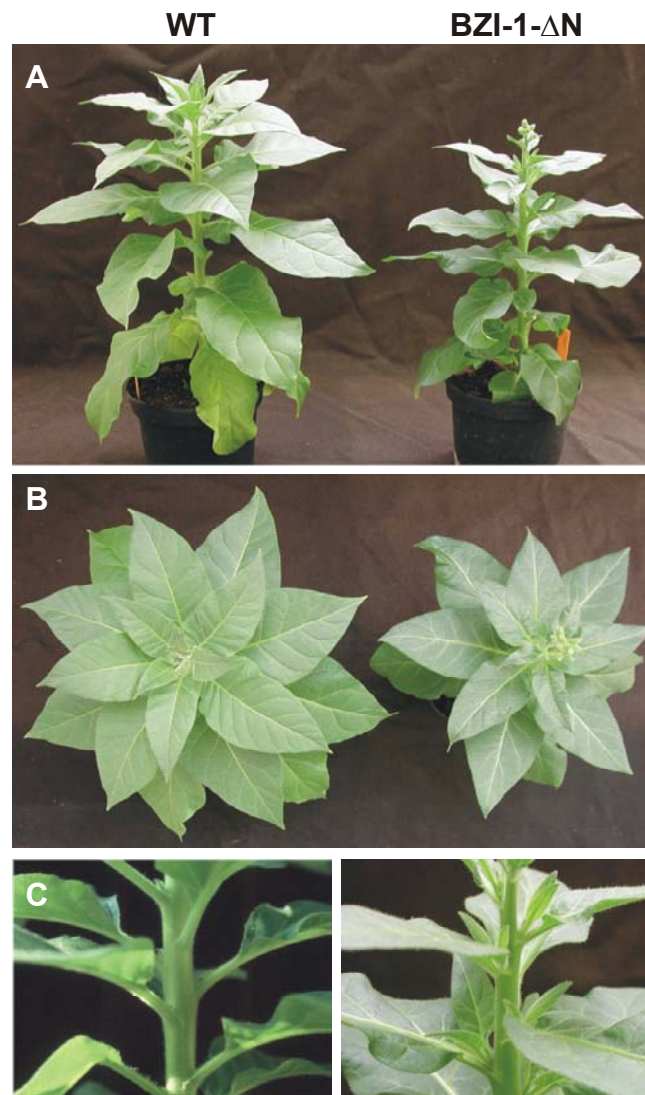
**Abbildung 5.22 Bestimmung der Glucose-, Fructose- und Sucrosekonzentration in Blüten bzw. Stamina von Wildtyp-, BZI-1 $\Delta$ N- und BZI-1-Oex-Pflanzen.** Für die Zuckermessung wurde jeweils von mehreren parallel angezogenen Pflanzen Blütenmaterial des jeweils gleichen Entwicklungsstadiums (9-11, nach Drews et al., 1992) eingesetzt. Fw, Frischgewicht der Probe.

Der Glucosegehalt ist in den BZI-1- $\Delta$ N-Blüten deutlich höher als in Wildtypblüten. Das gilt in gleichem Maße für die Stamina. Der Glucosegehalt der Stamina der BZI-1-Oex-Blüten liegt im Bereich des Wildtyps. Der Fructosegehalt unterscheidet sich in den getesteten Blüten bzw. Stamina nicht. Auch die Sucrosekonzentration in den vollständigen Blüten der Wildtyp- und BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen ist im Rahmen der Standardabweichung gleich. Dagegen ist die Sucrosekonzentration in den BZI-1- $\Delta$ N-Stamina geringer als in Wildtyp- und BZI-1-Oex-Stamina.

### 5.3.3 Vegetatives Wachstum der transgenen Tabakpflanzen

Die transgenen Pflanzen unterscheiden sich nicht nur in ihrer Blütenmorphologie, sondern auch im vegetativen Wachstum. BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen zeigen im Vergleich zum Wildtyp eine vermehrte Initiation von Seitensprossen, sind kleinwüchsig und bilden kleinere, dunkelgrüne und gewellte Blätter (Abbildung 5.23). BZI-1-Oex-Pflanzen zeigen dagegen keine diese Veränderungen. Die Wurzeln aller transgener Pflanzenlinien sind ebenfalls im Vergleich zum Wildtyp nicht unterschiedlich.

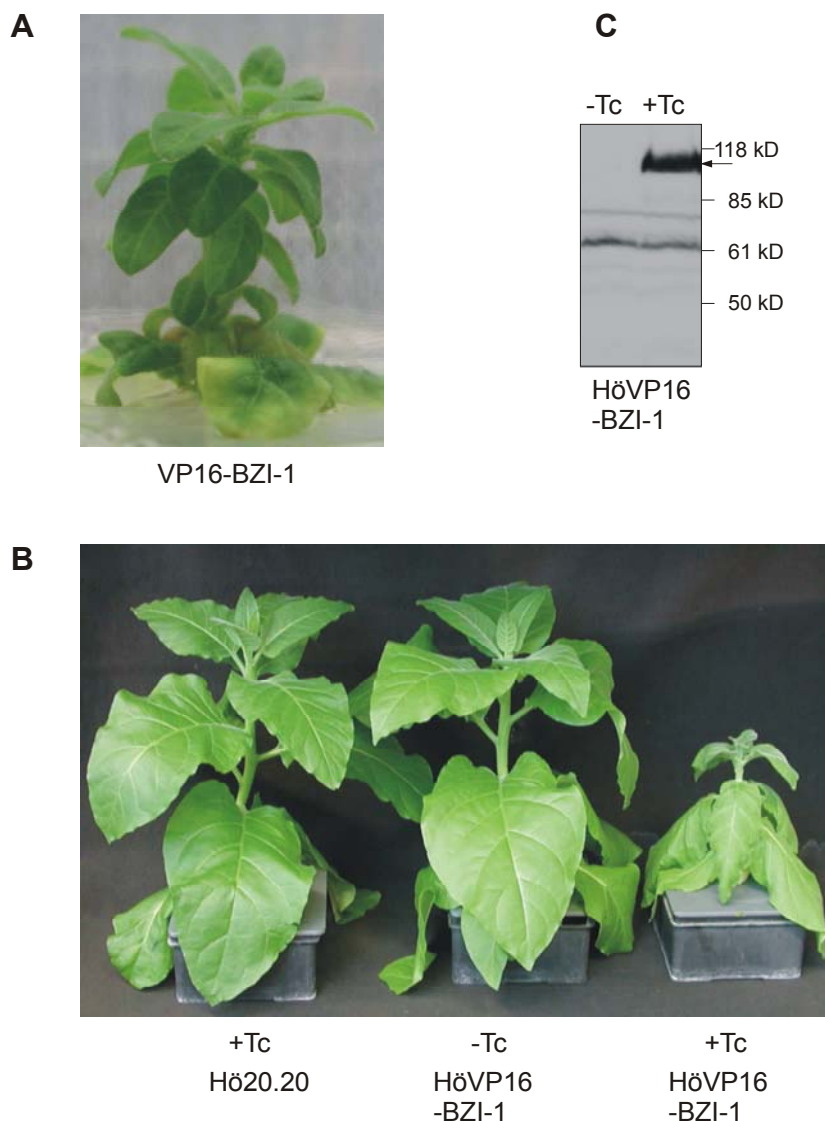




**Abbildung 5.23 Phänotyp von Wildtyp- und BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen. Gezeigt sind jeweils unter identischen Bedingungen agezogene repräsentative Pflanzen gleichen Alters in A) Seitenansicht und B) Aufsicht sowie C) in einer Detailansicht des oberen Sproßabschnittes.**

Eine konstitutive Expression des VP16-BZI-1-Proteins ist in Tabakpflanzen meist lethal. Bei der Pflanzentransformation konnte nur eine einzige Pflanze regeneriert werden, die in immunologisch nachweisbaren Mengen das VP16-BZI-1-Fusionsprotein exprimiert. Diese Pflanze zeigt drastische Veränderungen in ihrer Morphologie. Die in Abbildung 5.24 gezeigte Pflanze war nur ca. 6 cm groß, obwohl sie zum Zeitpunkt der Aufnahme bereits vier Monate in Sterilkultur gewachsen war. Sie zeigt einen stark gestauchten Wuchs, verkürzte Internodienabstände und sehr kleine Blätter. Dabei wird die Bildung vieler Seitensprosse initiiert. Die Wurzelbildung ist dagegen stark reduziert. Eine Anzucht dieser Pflanze in Erde oder in hydroponischer Kultur war nicht möglich. Diese Pflanze eignete sich daher nicht für weitere Analysen. Aus diesen Gründen wurde in weiteren Experimenten von Pflanzen Gebrauch gemacht, deren VP16-BZI-1-Expression durch Tc-

Applikation induzierbar ist. Die Pflanzen wurden dazu erst in Sterilkultur vermehrt und dann in hydroponischer Lösung weiter angezogen. Nach Akklimation wurde die Expression des Fusionsproteins in den Pflanzen durch Zugabe von Tc zur Hydroponiklösung induziert und weiter kultiviert. Die Tc Aufnahme erfolgte so über die Wurzeln. In Abbildung 5.24 ist das Ergebnis der Tc-Induktion einer HöVP16-BZI-1-Pflanze zu sehen. Um einen Einfluß von Tc auf die Wildtyppflanze auszuschließen, wurde auch diese mit Tc behandelt.



**Abbildung 5.24** Phänotyp von Pflanzen mit A) konstitutiver (VP16-BZI-1) und B) Tc-induzierbarer Expression des VP16-BZI-1-Fusionsproteins. C) Western Blot zum Nachweis der Tc-induzierten Expression des VP16-BZI-1-Fusionsproteins. VP16-BZI-1-Protein ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

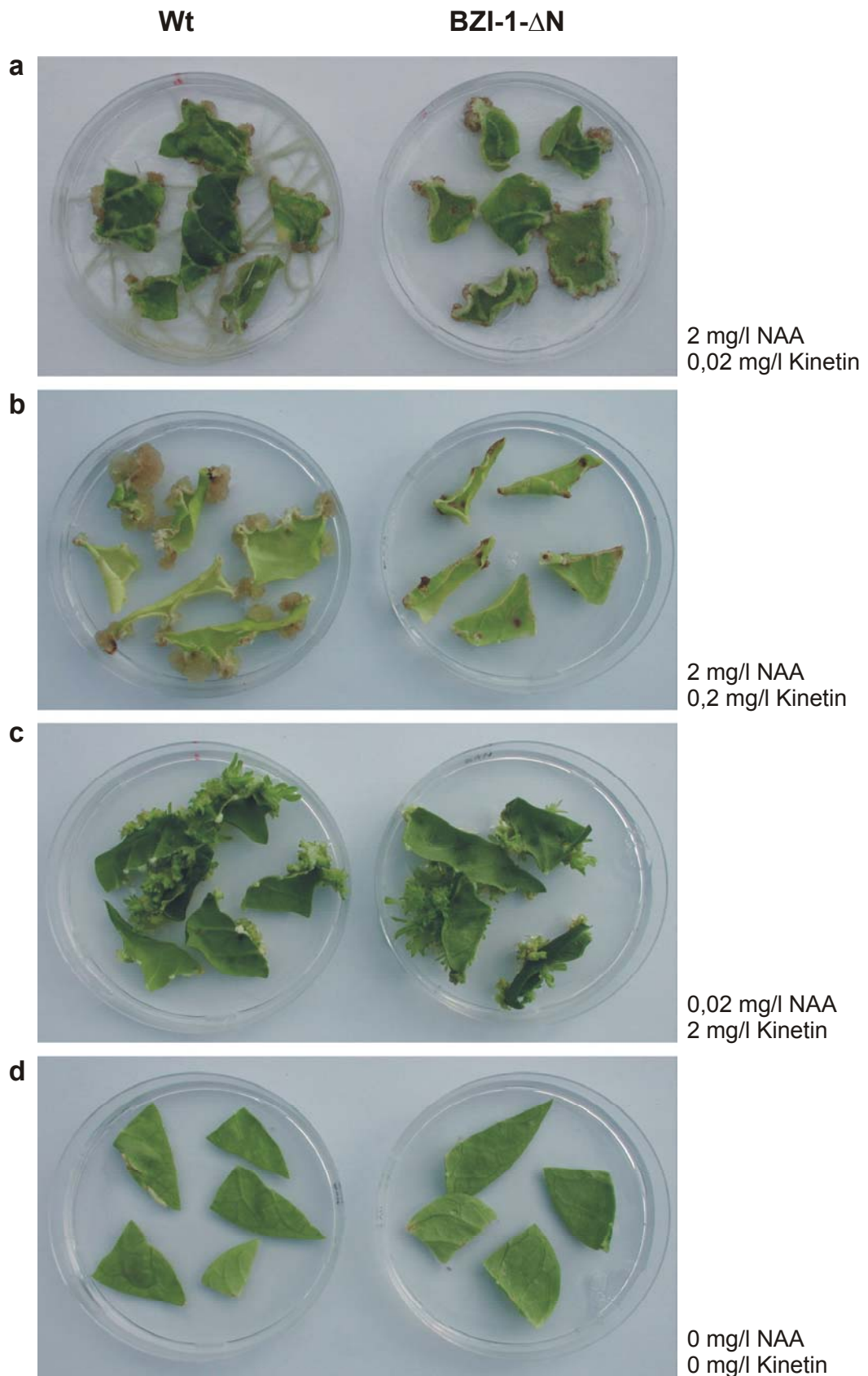
Während die Wildtyppflanze nach Tc-Applikation und die nicht induzierte transgene Pflanze normales Wachstum zeigen, ist die Tc-induzierte HöVP16-BZI-1-Pflanze

innerhalb der zweiwöchigen Induktion klein und gestaucht gewachsen. Die unteren Blätter zeigen Anzeichen einer frühen Seneszenz. Die induzierte Expression des Proteins wurde in einem Western Blot Experiment nachgewiesen. Eine längere Zeit andauernde Tc-induzierte VP16-BZI-1-Expression ist in HöVP16-BZI-1-Pflanzen ebenso lethal wie in konstitutiv exprimierenden Pflanzen. Daher konnte auch durch eine Induktion zu späteren Entwicklungszeitpunkten, die wiederum zur Einstellung des Streckungswachstums und zu Seneszenzzeichen bei den Blättern führt, keine HöVP16-BZI-1-Pflanze bis zur Blütenbildung induziert werden, um mögliche Auswirkungen auf den Blütenphänotyp zu untersuchen. Um zu gewährleisten, daß die beobachteten Effekte auf die DNA-Bindung von VP16-BZI-1 und somit durch eine durch die VP16-Domäne vermittelte Genaktivierung zurückzuführen ist, wurden verschiedene Kontrollpflanzen analysiert. Tabakpflanzen, die ein Fusionsprotein aus dem Tetracyclinrepressor und VP16 exprimieren (Böhner et al., 2001), zeigen keine unspezifischen Veränderungen. Auch transgene Pflanzen, die ein VP16-BZI-1-Konstrukt mit einer Leserasterverschiebung exprimieren (VP16-BZI-1 $\Delta$ ATG), so daß zwar mRNA, aber kein Protein gebildet wird, zeigen keine phänotypischen Effekte (Daten nicht gezeigt). Daher ist der beobachtete Phänotyp in den VP16-BZI-1-Pflanzen auf eine spezifische DNA-Bindung des VP16-BZI-1-Proteins und die Aktivierung der regulierten Gene zurückzuführen.

### 5.3.4 Hormonregulierte Organogenese an Tabakblattscheiben

Die genannten phänotypischen Veränderungen in BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen sprechen für eine Beteiligung von BZI-1 an der Verarbeitung von Hormonsignalen oder an der Regulation der Hormonkonzentrationen.

Durch Auflegen von Blattscheiben auf hormonhaltiges Medium kann durch unterschiedliche Verhältnisse der Phytohormone Auxin und Cytokinin die Bildung definierter Gewebe induziert werden (Fukazawa et al., 2000). Für Blattscheiben aus Wildtyppflanzen gilt, daß durch hohe Auxin- und niedrige Cytokininkonzentrationen die Bildung von Wurzeln induziert wird. Durch hohe Cytokinin- und niedrige Auxinkonzentrationen kann die Sproßinduktion induziert werden. Bei ausgeglichenen Hormonkonzentrationen wird Kallusgewebe gebildet. Ohne Hormonzugabe wird keine Organogenese initiiert. In Abbildung 5.25 ist diese hormongesteuerte Organogenese bei Wildtypblattscheiben zu sehen.

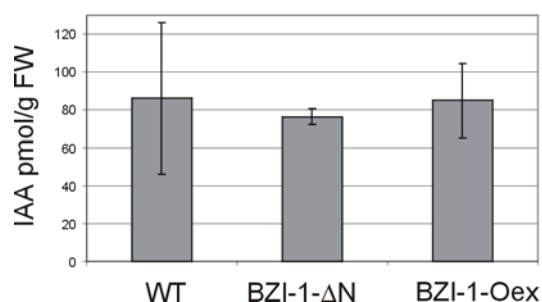


**Abbildung 5.25** Hormonregulierte Organogenese an Tabakblattscheiben. Wildtyp und BZI-1- $\Delta$ N-Blattscheiben wurden steril auf MS Medium mit der jeweils angegebenen Hormonzusammensetzung ausgelegt. A) Induktion der Wurzelbildung. B) Induktion von Kallusgewebe. C) Induktion des Sproßwachstums. D) Kontrolle, kein Hormonzusatz.

Dagegen ist nach exogener Gabe von Hormonen die Organogenese an BZI-1- $\Delta$ N-Blattscheiben deutlich beeinträchtigt. An BZI-1- $\Delta$ N-Blattscheiben ist bei Gabe hoher Auxinkonzentrationen kein Wurzelwachstum induzierbar. Auch die Fähigkeit zur Kallusinduktion ist stark vermindert. Die Reaktion auf die Gabe hoher Cytokininkonzentrationen ist dagegen nicht beeinträchtigt. Hier wird wie bei Wildtypblattscheiben Sproßwachstum initiiert. Das Experiment wurde auch mit Blattscheiben von BZI-1-Oex-Pflanzen durchgeführt, bei der Verwendung identischer Hormonmengen ist dabei keine veränderte Organogenese erkennbar (Daten nicht gezeigt). Eine in BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen veränderte Reaktion auf weitere Phytohormone wurde an Wildtyp- und BZI-1- $\Delta$ N-Samen untersucht. BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen bilden zwar deutlich kleinere Samenkapseln mit nur wenigen Samen, diese unterscheiden sich dennoch nicht in ihrem Keimungsverhalten von Wildtypsamen. Damit ist ein Einfluß des BZI-1- $\Delta$ N-Proteins auf die durch Gibberellinsäure sowie durch Abscisinsäure vermittelte Signaltransduktion unwahrscheinlich. Gibberellinsäure bricht die Samenruhe und ist damit ein notwendiger Faktor für die Einleitung der Keimung, Abscisinsäure hemmt dagegen die Samenkeimung. Keimlinge, die in der Brassinosteroidbiosynthese gestört sind, zeigen bei Dunkelkeimung einen typischen deetiolierten Phänotyp (Pepper et al., 1994). Auch das ist bei BZI-1- $\Delta$ N-Samen nicht der Fall, die Keimung entspricht der von Wildtyp Samen.

### 5.3.5 Analyse des Auxingehalts in BZI-1- $\Delta$ N- und BZI-1-Oex-Pflanzen

Um zu überprüfen, ob die beobachteten Phänotypen auf einen veränderten Hormonlevel in diesen Pflanzen zurückzuführen ist, wurde der Auxingehalt in Blättern von Wildtyp und BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Weiler an der Universität Bochum bestimmt. Zur Auxinmessung wurde Blattmaterial von jeweils 6 identisch angezogenen Pflanzen eingesetzt.



**Abbildung 5.26** Messung des endogenen Auxingehalts in Blättern von Wildtyp-, BZI-1- $\Delta$ N- und BZI-1-Oex-Pflanzen.

Es ergab sich keine signifikante Veränderung der Auxinmenge in den getesteten Pflanzen (Abbildung 5.26). BZI-1 reguliert demnach nicht den endogenen Auxinspiegel in diesen Pflanzen, sondern wirkt in der Auxinsignaltransduktion.

### 5.3.6 Pfropfungsexperimente an Wildtyp- und BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen

Um zu untersuchen, ob die morphologischen Veränderungen in den BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen durch ein mobiles Signal übertragen werden können, oder ob es sich um lokal begrenzte Veränderungen handelt, wurden Pfropfungsexperimente durchgeführt. Dabei wurden jeweils die Sproßteile von Wildtyp- und BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen ausgetauscht.



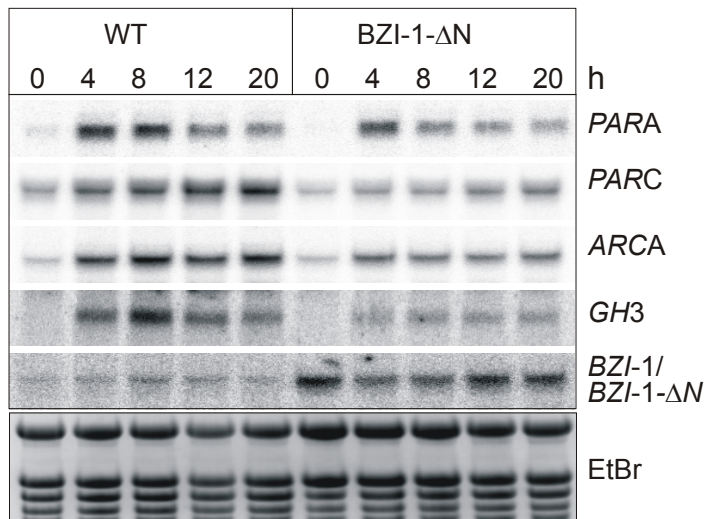
**Abbildung 5.27** Tabakpflanzen nach Propfung. Links erfolgte die Pfropfung eines Wildtypsprosses auf den Wurzelstock einer BZI-1- $\Delta$ N-Pflanze. Rechts wurde auf einen Wildtyp-Wurzelstock ein BZ-1- $\Delta$ N-Sproß gepfropft. Die Pfropfungsstelle ist jeweils mit einem weißen Quadrat markiert.

In Abbildung 5.27 erkennt man, daß die morphologischen Veränderungen der BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen nicht auf den Wildtypanteil übertragbar sind. Der auf den BZI-1- $\Delta$ N gepfropfte Wildtyp Sproß entwickelt keine Seitensprosse und wächst nicht gestaucht. Die Blätter zeigen ein normales Wildtyp-Erscheinungsbild. Im umgekehrten Experiment, bei dem auf den Wildtyp-Wurzelstock ein BZI- $\Delta$ N-Sproß gesetzt wurde, ist eine fortgesetzte Ausprägung des typischen BZI-1- $\Delta$ N-Phänotyps zu beobachten. Der Sproß zeigt vermehrte Initiation der Seitensproßbildung, wächst gestaucht und entwickelt kleinere Blätter. Der Wildtypanteil ist also nicht in der Lage, die Veränderungen im transgenen Bereich der Pflanze aufzuheben. Auch die später gebildeten Blüten zeigen, jeweils abhängig vom Sproßteil, den Wildtyp- bzw. BZI-1- $\Delta$ N-typischen Phänotyp. Man kann daraus schließen,

daß der lokale genetische Hintergrund für die beobachteten Veränderungen im Erscheinungsbild der BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen entscheidend ist, und nicht ein über weite Strecken wirkendes mobiles Signal.

### **5.3.7 Northern Blot Analyse auxininduzierbarer Gene in BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen**

Die in den BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen verminderte Fähigkeit auf exogene Auxingabe zu reagieren, wurde auf molekularer Ebene näher charakterisiert. In Zeitreihenexperimenten wurden Blattscheiben von Wildtyp und BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen durch Aufschwimmen auf auxinhaltiger Pufferlösung inkubiert. Verschiedene auxinregulierte Gene wurden dann in Northern Analysen auf ihre Induzierbarkeit getestet. Von den untersuchten Genen *PARA*, *PARC*, *ARCA* und *GH3* ist bekannt, daß ihre Expression durch Applikation geringer Mengen Auxins innerhalb kurzer Zeit (30 min in Zellkulturen) induzierbar ist. Während die Gene *PARA*, *PARB* und *ARCA* auch durch einige nicht aktive Auxinanaloga, sowie Schwermetalle und verschiedene Streßbedingungen, induzierbar sind (Ulmasov et al., 1994; Droog et al., 1995), ist *GH3* spezifisch nur durch aktive Auxine induzierbar (Roux et al., 1997). Dem Protein *PARA* wird eine nicht näher bestimmte Funktion bei der Transkription zugeschrieben (Takahashi et al., 1995), zusätzlich wird für Mitglieder der *PAR*-Genfamilie eine Funktion als Glutathion S-Transferase (GST) diskutiert (Droog et al., 1993). *ARCA* gehört zu einer Genfamilie, die für die  $\beta$ -Untereinheit von G Proteinen codiert (Ishida et al., 1993). Die biologische Funktion der *GH3*-Proteine ist bislang weitgehend ungeklärt. Wird ein Mitglied der Arabidopsis *GH3*-Genfamilie, *DFL1* (dwarf in light 1), in Arabidopsis überexprimiert, resultiert daraus ein auxinresistenter Phänotyp, in dem die Hypokotylstreckung im Licht negativ reguliert ist. *DFL1*-antisense Pflanzen zeigen ein verlängertes Sproßwachstum und eine vermehrte Bildung von Seitenwurzeln (Nakazawa et al., 2001).



**Abbildung 5.28 Northern Blot Analyse von Wildtyp- und BZI-1-ΔN-Blattscheiben nach Induktion mit Auxin.**

Es konnte in insgesamt drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten gezeigt werden, daß in den BZI-1-ΔN Blattscheiben besonders die Induktion der Gene *GH3* und *PARC* vermindert ist (Abbildung 5.28). Auch die Gene *PARA* und *ARCA* zeigen eine schwächere Auxininduzierbarkeit. Durch Hybridisierung mit der *BZI-1*-Sonde ist die Expression des Transgens gezeigt. Eine auxinabhängige Induktion von endogenem *BZI-1*-Transkript ist dabei nicht zu erkennen.

*BZI-1* ist demnach direkt oder indirekt an der transkriptionellen Regulation auxininduzierbarer Gene beteiligt.

### 5.3.8 Analyse der auxinabhängigen *GH3*-Transkription nach Tc-induzierter Expression eines VP16-BZI-1-Fusionsproteins

In Pflanzen, in denen das *VP16-BZI-1*-Fusionsgen durch Tc-Induktion exprimiert werden kann, wurde die Expression des auxininduzierbaren Gens *GH3* in Northern Blot Analysen untersucht.

Die Expression von VP16-BZI-1 wurde induziert, indem Blattscheiben von HöVP16-BZI-1-Pflanzen für die Dauer von 4,5 h in Tc-haltigem Puffer inkubiert wurden. Die Bildung des Proteins innerhalb dieser Zeit wurde immunologisch mittels Western Blot Analyse nachgewiesen (Abbildung 5.29A). Dann wurde zusätzlich in DMSO gelöstes NAA bzw. zur Kontrolle nur DMSO zu der Pufferlösung gegeben und in Zeitreihenexperimenten die Expression des auxininduzierbaren Gens *GH3* durch Northern Blot Analysen untersucht (Abbildung 5.29B).



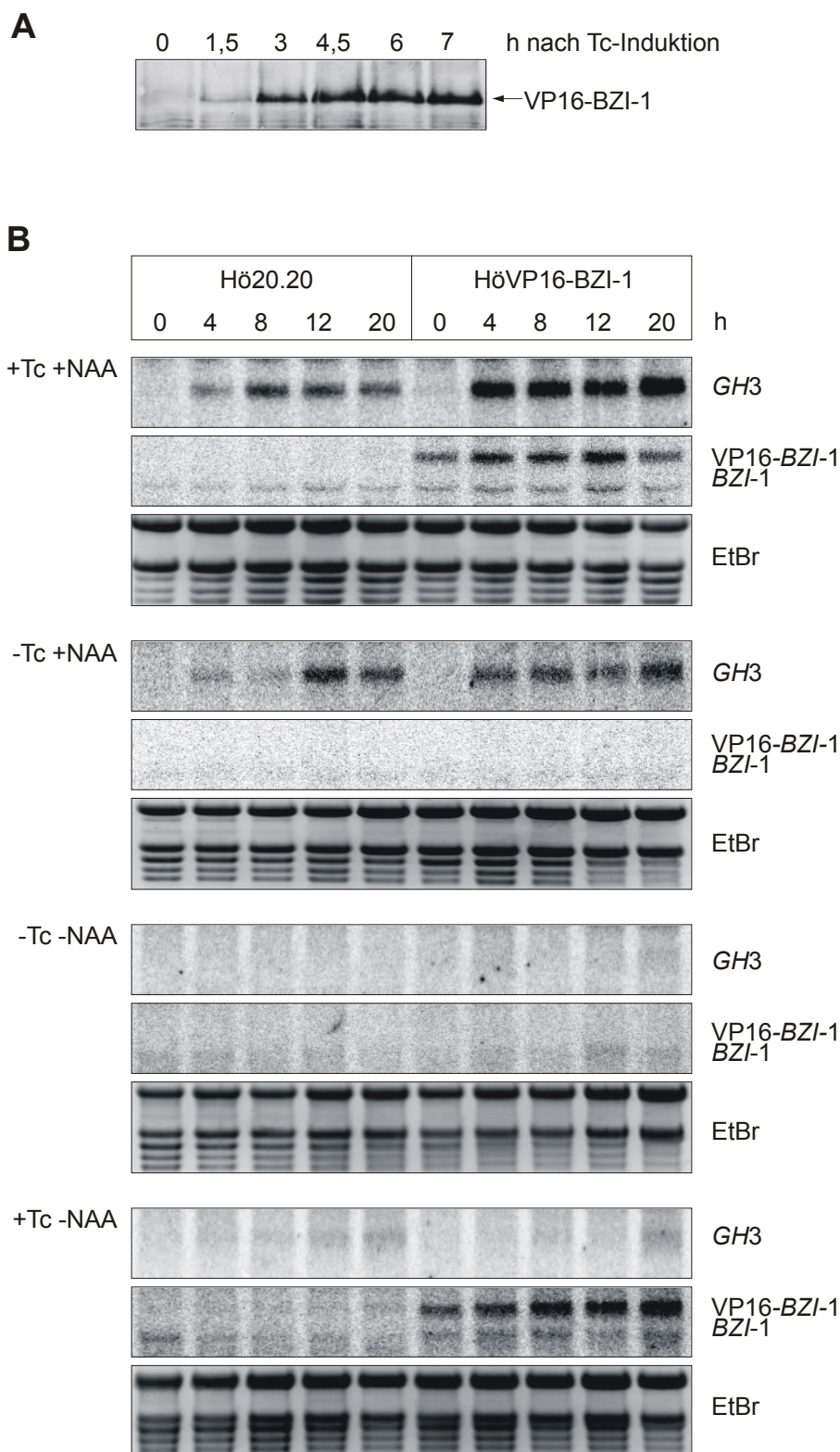
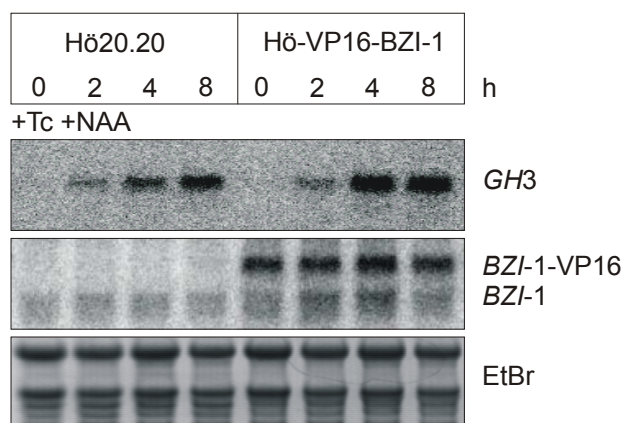


Abbildung 5.29 Tc-Induktion der VP16-BZI-1-Expression in HöVP16BZI-1-Pflanzen. A) Western Blot zum Nachweis der Proteinexpression. B) Northern Blot Analysen nach Auxininduktion und Tc-induzierter VP16-BZI-1-Expression in Wildtyp- und HöVP16-BZI-1-Pflanzen. Die Blattscheiben wurden 4,5 h in Pufferlösung mit bzw. ohne Zusatz von Tc vorinkubiert. Zum Zeitpunkt 0 erfolgte dann der Zusatz von NAA bzw. DMSO.

Bei dem Kontrollexperiment, in dem die Blattscheiben weder mit Tc noch mit NAA behandelt wurden, zeigt sich, daß *GH3* nicht durch Verwundungseffekte oder die Kultivierungsbedingungen (Pufferinkubation) induzierbar ist. Die Induktion von *GH3* durch Auxin erfolgt ca. 4 h nach NAA-Zugabe zum Puffer. Dies wurde sowohl für Wildtyp- wie auch für HöVP16-BZI-1-Blattscheiben in einem Ansatz ohne Tc-Induktion gezeigt. Darüberhinaus ist durch Tc-Induktion des Fusionsproteins in Hö-VP16-BZI-1-Pflanzen ohne eine zusätzliche NAA-Inkubation keine direkte Induktion der *GH3*-Transkription nachweisbar. Durch zusätzliche Gabe von Auxin zu den bereits mit Tc behandelten HöVP16-BZI-1-Blattscheiben zeigt sich dagegen zum Zeitpunkt 4 h nach Auxinzugabe eine um den Faktor 4 verstärkte *GH3*-Induktion im Vergleich zu den Tc- und NAA-induzierten Wildtypblattscheiben. Auch zu den späteren Zeitpunkten ist die *GH3*-Expression weiterhin in den VP16-BZI-1-Blattscheiben verstärkt (Faktor 2-3). Um zu überprüfen, ob durch die Expression von VP16-BZI-1 nicht nur die Induktionsstärke, sondern auch die Induktionsgeschwindigkeit der auxininduzierten *GH3*-Transkription verändert wird, wurde in einem weiteren Experiment zusätzlich zu den Zeitpunkten 4 h und 8 h auch schon zum Zeitpunkt 2 h nach NAA-Zugabe der Expressionslevel von *GH3* analysiert (Abbildung 5.30).



**Abbildung 5.30 Tc-Induktion der VP16-BZI-1-Expression in HöVP16BZI-1-Pflanzen. Northern Blot Analysen nach Auxininduktion und Tc-induzierter VP16-BZI-1-Expression in Wildtyp- und HöVP16-BZI-1-Pflanzen. Die Blattscheiben wurden 4,5 h in Pufferlösung mit bzw. ohne Zusatz von Tc vorinkubiert. Zum Zeitpunkt 0 erfolgte dann der Zusatz von NAA.**

Wie Abbildung 5.30 zeigt, konnte dabei kein Einfluß auf die Induktionsgeschwindigkeit der *GH3*-Expression festgestellt werden. Zu diesem frühen Zeitpunkt war die *GH3*-Induktion sowohl in Wildtyp- wie auch in HöVP16-BZI-1-Blattscheiben jeweils noch sehr gering. Erst zu den Zeitpunkten 4 h und 8 h war die Verstärkung der *GH3*-Expression (Faktor 3) in den HöVP16-BZI-1-Blattscheiben durch Tc- und NAA-Induktion wiederum

deutlich nachweisbar. Die Induktion der VP16-*BZI-1*-Expression sowie die Expressionsstärke des endogenen *BZI-1* ist durch Hybridisierung mit der *BZI-1* Sonde jeweils gezeigt. Der Transkriptlevel des endogenen *BZI-1* wird dabei weder durch Tc noch durch Auxin beeinflusst. Die Expression von VP16-*BZI-1* wird jeweils nur nach Vorinkubation mit Tc induziert.

Da in EMSAs eine Bindung von *BZI-1* an die G/C Hybridbox im *GH3*-Promotor gezeigt werden konnte (A. Strathmann und M. Kuhlmann, unveröffentlicht), und da durch Expression von VP16-*BZI-1* die Transkription von *GH3* in Abhängigkeit von Auxin verstärkt wird, könnte *GH3* ein von *BZI-1* reguliertes Zielgen darstellen.

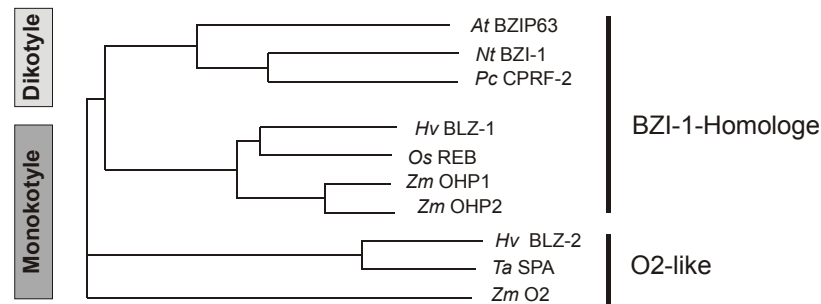
## 6 Diskussion

### 6.1 BZI-1 ist Mitglied einer Gruppe homologer Transkriptionsfaktoren

Der in dieser Arbeit untersuchte bZIP-Transkriptionsfaktor BZI-1 läßt sich in Anlehnung an eine Einteilung der Arabidopsis bZIP-Proteine der Subfamilie C zuordnen (Jakoby et al., 2002). Innerhalb dieser Subfamilie gehört BZI-1 zu einer Gruppe hochkonservierter Transkriptionsfaktoren, deren Vertreter sowohl in dikotylen wie auch in monokotylen Pflanzenspezies zu finden sind. Dazu zählen CPRF2 aus Petersilie (Weisshaar et al., 1991), AtBZIP63 aus Arabidopsis (Jakoby et al., 2002), OHP1 und OHP2 aus Mais (Pysh et al., 1993), BLZ1 aus Gerste (Vicente-Carbajosa et al., 1998) und REB aus Reis (Nakase et al., 1997). Diese Proteine sind durch das Vorhandensein konservierter Domänen gekennzeichnet. Neben der bZIP-Domäne sind das die Domänen DI bis DIV (Dröge-Laser et al., 1997), sowie die in dieser Arbeit auch für BZI-1 identifizierte Domäne N.

Nicht nur die Proteinstruktur, auch der genomische Aufbau von BZI-1 entspricht dem der BZI-1-homologen Transkriptionsfaktoren. Die genomische Struktur ist, mit Ausnahme von CPRF2, von allen BZI-1-Homologen bekannt (*A.t.*BZIP63, GenBank Accession number AB010697; *O.s.*REB, Genbank Accession number AB021736; *H.v.*BLZ1, Vicente-Carbajosa, 1998; *Z.m.*OHP1/2, Pysh und Schmidt, 1996). Diese Gene setzen sich jeweils aus sechs Exons und fünf Introns zusammen. Bei allen Genen sind die Exon-Intron Übergänge konserviert. Die für BZI-1 und BZI-1-Homologe charakteristischen Proteindomänen sind, mit Ausnahme der Domäne I, jeweils auf einzelnen Exons lokalisiert. Es kann vermutet werden, daß die Gene durch Exon-Shuffling zusammengesetzt wurden, und einen gemeinsamen Ursprung in der Evolution besitzen. Die Proteine könnten daher Aufgaben in ähnlichen Funktionszusammenhängen innerhalb der jeweiligen Pflanzenspezies übernehmen.

Die Einordnung von BZI-1 zu ähnlichen Proteinen ist in einem Stammbaum dargestellt (Abbildung 6.1). Die Einteilung beruht auf der konservierten Exon-Intron Struktur der genomischen Sequenz (soweit bekannt), sowie der Aminosäuresequenz und der Domänenstruktur.



**Abbildung 6.1** Stammbaum der BZI-1-ähnlichen Protein. Die Gruppe der zu BZI-1 homologen Proteine aus monokotylen und dikotylen Pflanzenspezies und die Gruppe der O2-like Transkriptionsfaktoren sind jeweils durch einen schwarzen Balken gekennzeichnet. CPRF2, Weisshaar et al., 1991; AtBZIP63, GenBank Accession number AB010697; OHP1/2, Pysh et al., 1993; BLZ1 Vicente-Carbajosa et al., 1998; REB, Nakase et al., 1997; O2, Schmidt et al., 1992; SPA, Albani et al., 1997; und BLZ2, Onate et al., 1999.

Die Proteine BZI-1, CPRF2, OHP1, OHP2, REB und BLZ1 bilden hierbei eine Untergruppe, die sich von der Gruppe der O2-like Transkriptionsfaktoren, zu der O2 aus Mais (Schmidt et al., 1992), SPA aus Weizen (*Triticum aestivum*, Albani et al., 1997) und BLZ2 aus Gerste (Onate et al., 1999) gehören, abgrenzen läßt. Für O2 ist eine ähnliche Exon-Intron Struktur wie für die BZI-1-Homologen beschrieben, auch hier ist die codierende Sequenz auf 6 Exons verteilt (GenBank accession number X16618).

Die O2-like Transkriptionsfaktoren werden spezifisch im Endosperm exprimiert. Für sie wurde eine Funktion in der Regulation von Speicherproteingenen beschrieben (Schmidt et al., 1992; Albani et al., 1997; Onate et al., 1999). Auch für einige BZI-1-Homologe aus Monokotylen wurde eine Bindung an Promotorelemente von Speicherproteingenen sowie eine Dimerisierung mit O2-like Proteinen gezeigt (Nakase et al., 1997, Pysh et al., 1993; Onate et al., 1999). Allerdings wurde für die BZI-1-Homologen aus Monokotylen auch eine Expression außerhalb des Endosperms nachgewiesen. Es ist zu vermuten, daß diese Transkriptionsfaktoren zusätzlich Funktionen außerhalb des Samens übernehmen.

Während AtBZIP63 noch nicht näher analysiert wurde, wird für das BZI-1-Homolog CPRF2 aus der dikotylen Petersilie aufgrund seiner *in vitro* Bindung an die G-Box der LRU (Light Responsive Unit) im *CHS* Promotor eine Beteiligung an der lichtregulierten Genexpression zugeschrieben (Kircher et al., 1999). Allerdings ist fraglich, ob *CHS* ein *in vivo* Zielgen von CPRF2 darstellt, da eine *in vivo* Beteiligung von CPRF2 an der Regulation der *CHS* bislang nicht gezeigt werden konnte.

## 6.2 BZI-1 wird ubiquitär in der Pflanze exprimiert und die Expressionstärke unterliegt einer Regulation durch Licht und Pathogene

Die Expression von BZI-1 konnte in allen Pflanzenorganen, mit einer leicht verstärkter Transkription in den Stamina, nachgewiesen werden. Auch für *BZI-1*-Homologe wurde eine Expression in verschiedensten Geweben nachgewiesen, so wird *BLZ1*, im Gegensatz zu *BLZ2*, nicht nur im Endosperm, sondern auch in Wurzeln und Blättern transkribiert (Vicente-Carbajosa et al., 1998). *CPRF2*- und *OHP1*-Transkripte konnten ebenfalls in allen Pflanzenorganen nachgewiesen werden (Kircher et al. 1998, Pysh et al., 1993). Es stellt sich die Frage, wie BZI-1 (und die BZI-1-Homologen) als Transkriptionsfaktor trotz dieser ubiquitären Expression eine regulierte Genexpression vermitteln kann.

Dafür bieten sich mehrere mögliche Erklärungen an. Die BZI-1-Aktivität könnte u.a. posttranslational reguliert werden. Durch die *in vitro* und *in vivo* gezeigte schnelle Phosphorylierung von BZI-1 nach Pathogenbefall (Kuhlmann, 2002), könnte die DNA-Bindung verändert wird. Für den bZIP-Transkriptionsfaktor O2 konnte eine diurnal regulierte Phosphorylierung nachgewiesen werden, die seine DNA-Bindung beeinflusst (Ciceri et al., 1997). *CPRF2* wird ebenfalls lichtabhängig phosphoryliert, eine dadurch verstärkte DNA-Bindung konnte bislang allerdings nicht gezeigt werden (Wellmer et al., 1999).

BZI-1 könnte darüberhinaus einem geregelten Kerntransport unterliegen. So wird beispielsweise für *CPRF2* eine phytochromabhängige Translokation in den Kern beschrieben (Kircher et al., 1999). Für den bZIP-Transkriptionsfaktor O2 wurde gezeigt, daß eine Kernlokalisierungssequenz (NLS) in der basischen Domäne für den Kerntransport verantwortlich ist (Varagona et al. 1994). M. Kuhlmann (2002) konnte für BZI-1 die Existenz einer funktionalen NLS in der basischen Domäne nachweisen. In transient transformierten Tabakprotoplasten war das GFP-BZI-1 Fusionsprotein überwiegend im Kern, nach Deletion der basischen Domäne aber überwiegend im Cytoplasma lokalisiert. Diese Verteilung gilt unabhängig von äußeren Stimuli wie Licht oder Elicitorbehandlung (Kuhlmann, 2002). Die Möglichkeit der BZI-1 Regulation über einen stimulusgesteuerten Kerntransport ist daher eher unwahrscheinlich.

Es ist auch eine Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren denkbar, die an benachbarte *cis*-Elemente binden. Über diese Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren könnte die Spezifität für Zielgene, die in ihren Promotoren

spezifische Erkennungssequenzen für verschiedene Transkriptionsfaktoren enthalten, erreicht werden. So konnte für *O2* eine Interaktion mit dem 20 bp entfernt bindenden Zinkfinger Transkriptionsfaktor PBF belegt werden (Vicente-Carbajosa et al., 1997).

Auch durch Heterodimerisierung mit anderen bZIP-Proteinen, die gewebespezifisch oder stimulusabhängig exprimiert werden, könnte die durch BZI-1 regulierte Expression von Genen erfolgen. Durch Dimerisierung erhöht sich die Anzahl möglicher Transkriptionsfaktorkomplexe und dadurch kann ein positiver oder negativer Einfluß auf die DNA-Bindung, auf das Aktivierungspotential und auf die Kernlokalisierung ausgeübt werden (zur Übersicht siehe Schwechheimer und Bevan, 1998). Von Strathmann et al. (2001) wurden mehrere Heterodimerisierungspartner von BZI-1 mittels eines Hefe "Two-Hybrid" Systems isoliert. Die drei bZIP-Transkriptionsfaktoren, BZI-2, BZI-3 und BZI-4, zählen in Anlehnung an die Einteilung der bZIP-Faktoren in Arabidopsis zur Subfamilie S der bZIP-Proteine (Jakoby et al., 2002). Die Proteininteraktion mit BZI-1 wird über die bZIP-Domäne vermittelt und ist spezifisch, da eine Dimerisierung mit anderen bZIP-Proteinen, wie z.B. den TGA-Faktoren der Subfamilie D der bZIP-Proteine, nicht stattfindet (Strathmann et al. 2001; Jakoby et al., 2002). Ein für diese Proteine charakteristischer langer Leucin-Zipper, mit neun Leucinwiederholungen bei den Faktoren BZI-2, BZI-3 und BZI-4 sowie sieben Leucinwiederholungen bei BZI-1, ist wahrscheinlich für die spezifische Interaktion verantwortlich.

Obwohl *BZI-1* ubiquitär exprimiert wird, unterliegt die Transkription zusätzlich noch mindestens zwei äußeren Faktoren. Zum einen wird die *BZI-1*-Transkription durch virale und bakterielle Pathogene induziert. Welche Bedeutung diese Beteiligung an der Pathogenantwort besitzt, muß noch näher analysiert werden. Zum anderen unterliegt die Expression von *BZI-1* einer Tag-Nachtrhythmik mit verstärkter Transkription während der Dunkelphase. Der *BZI-1*-Heterodimerisierungspartner *BZI-2* wird dagegen genau umgekehrt reguliert, mit hohen Expressionsraten tagsüber und verringerter Expression in der Nacht. Es gibt Hinweise darauf, daß die *BZI-1*- und *BZI-2*-Transkription lichtabhängig reguliert wird, denn nach einer deutlich verkürzten Dunkelphase wird die *BZI-1*-Expression ebenfalls schnell herunter- und die *BZI-2*-Expression hochreguliert (Strathmann, unveröffentlicht).

Für *O2* ist bekannt, daß seine Transkription einer Tag-Nachtrhythmik ähnlich der von *BZI-2* unterliegt (Ciceri et al., 1999). Die *O2*-Expression erreicht ihr Maximum mittags und weist die geringste Transkriptionsrate in den Nachtstunden auf. Diese Tag-Nachtoszillation

wird allerdings nicht durch Licht gesteuert, da das Expressionsmuster auch nach einer konstanten Dunkelphase weiter erhalten bleibt. Die Expression des zu BZI-1 homologen Proteins OHP1 aus Mais, einem O<sub>2</sub>-Dimerisierungspartner, unterliegt im Gegensatz zu BZI-1 keiner diurnalen Regulation. Für die BZI-1-Heterodimerisierungspartner BZI-3 und BZI-4 ist ebenfalls keine diurnal gesteuerte Transkription nachweisbar (Strathmann, unveröffentlicht). Man könnte vermuten, daß BZI-1 und BZI-2, möglicherweise mit einem weiteren Heterodimerisierungspartner, wechselseitig in einem Tag-Nachtrhythmus die Expression eines gemeinsamen Zielgens steuern. Dies könnte z.B. im Rahmen der Photosynthese bzw. des damit verbundenen Zuckerstoffwechsels geschehen.

### **6.3 BZI-1 bindet an G- und C-Box *cis*-Elemente und ist ein transkriptioneller Aktivator *in planta***

In transienten Analysen wurde durch die Expression verschiedener BZI-1-Derivate deren Aktivierungspotential untersucht. Zusätzlich wurde die von Kuhlmann (2002) gezeigte *in vitro* Bindung an G- und C-Box *cis*-Elemente in diesem System *in vivo* überprüft.

Für BZI-1 konnte in Experimenten, die von A. Strathmann durchgeführt wurden, ein starkes Transaktivierungspotential nachgewiesen werden, indem Fusionsproteine aus BZI-1 und der GAL4-Bindedomäne in einem Hefe-Reporter-System getestet wurden (Heinekamp et al., 2002). Diese Fähigkeit von BZI-1 zur Transaktivierung konnte durch Deletion der ersten 72 Aminosäuren des N-terminalen Bereichs vollständig aufgehoben werden.

Das die Domäne N eine wichtige Funktion ausübt, wurde bereits für BLZ1 gezeigt. Vicente-Carbajosa et al. (1998) konnten im Bereich der ersten 142 Aminosäuren eine Transaktivierungskapazität lokalisieren. Dazu wurden Fusionsproteine mit einer GAL4-Bindedomäne in einem Hefe-Reporter-System getestet. Die Transaktivierungsdomäne umfaßt den N-Terminus des BLZ1-Proteins bis einschließlich der Domäne I. Ähnliche prolinreiche Aktivierungsdomänen wurden für verschiedene bZIP-Faktoren in der Literatur beschrieben (Weisshaar et al., 1991; Schindler et al., 1992b; Siberil et al., 2001).

Um die Hypothese zu überprüfen, daß die Domäne N auch *in planta* ein Aktivierungspotential besitzt, wurde in transient transformierten Tabak-Mesophyllprotoplasten die Aktivierungseigenschaft von BZI-1 und einem Deletionsderivat mit einem verkürzten N-Terminus (BZI-1- $\Delta$ N) verglichen.



Für BZI-1 konnte eine schwache Aktivierung des Reporterkonstruktes (Faktor 1,6) nachgewiesen werden. Dieses Aktivierungspotential wurde durch Expression des Deletionsderivates BZI-1- $\Delta$ N vollständig aufgehoben.

Sprenger-Haussels und Weisshaar (2000) wiesen auch für die Domäne N von CPRF2 nach, daß sie in transient transformierten Petersilieprotoplasten ein schwacher Aktivator ist. Die im Vergleich zu den Ergebnissen in Hefe nur sehr geringe Aktivierung des Reporterkonstruktes durch Expression von BZI-1 bzw. CPRF2 in Protoplasten zeigt, daß in Hefe gewonnene Daten nicht immer mit der *in planta*-Funktion des Proteins übereinstimmen.

Für das Konstrukt VP16-BZI-1, welches ein Fusionsprotein aus der Aktivierungsdomäne VP16 und BZI-1 codiert und somit eine Aktivierung des Reportergens vermittelt, konnte gezeigt werden, daß es *in vivo* an G- und C-Box Promotorelemente bindet. Die Bindung ist spezifisch, da die Boxen in mutierter Form nicht erkannt werden. Die Aktivierung des Reporterkonstrukts um den Faktor 3 ist allerdings nicht besonders stark. Dieses Ergebnis stimmt mit dem von Sprenger-Haussels und Weisshaar (2000) überein. Sie konnten für das Konstrukt CPRF2-VP16 ebenfalls nur eine relativ geringe Aktivierung des Reporterkonstruktes nachweisen und schließen daraus auf eine schwache *in vivo*-Bindung von CPRF2 an die G-Box des CHS-Promotors.

Es könnte aber auch bedeuten, daß die getesteten *cis*-Elemente keine *in vivo*-Zielsequenzen für die Transkriptionsfaktoren darstellen, obwohl Dröge-Laser et al. (1997) und Weisshaar et al. (1991) zeigen konnten, daß BZI-1- $\Delta$ N bzw. CPRF2 *in vitro* an diese Elemente binden. Es muß allerdings darauf hingewiesen werden, daß eine deutliche *in vitro* Bindung an die verwendeten *cis*-Elemente in EMSAs bislang nur für ein um 13 Aminosäuren am N-Terminus verkürztes CPRF2-Protein wie auch für das BZI-1- $\Delta$ N-Derivat gezeigt wurden (Izawa et al., 1993; Kuhlmann, 2002). In bislang unveröffentlichten Experimenten konnten A. Strathmann und M. Kuhlmann zeigen, daß das vollständige BZI-1 im Vergleich zu BZI-1- $\Delta$ N nur schwach an verschiedene *cis*-Elemente, wie G-Box, C-Box und G/C-Box, bindet. Darüber hinaus konnte in Hefe gezeigt werden, daß BZI-1 zwar Homodimere bildet, aber die Heterodimerisierung mit den Faktoren BZI-2, BZI-3 und BZI-4 deutlich bevorzugt ist (Strathmann et al. 2001). In EMSAs mit *in vitro* translatierten BZI-1, BZI-1- $\Delta$ N, BZI-2, BZI-3 und BZI-4 Proteinen konnten die in Hefe gewonnenen Daten bestätigt werden. BZI-1 bindet als Heterodimer mit BZI-2, BZI-3 oder BZI-4 deutlich an die getesteten Boxen. Auch Heterodimere von BZI-1 mit BZI-1- $\Delta$ N und Homodimere von BZI-1- $\Delta$ N binden an diese *cis*-Elemente. Dagegen sind die Signale, die durch BZI-1-Homodimere im EMSA

hervorgerufen werden, sehr schwach. Dafür könnte es zwei mögliche Ursachen geben. Entweder werden nur sehr wenige BZI-1-Homodimere gebildet, die dann an DNA binden können, oder die Bindung der Homodimere an die DNA wird sterisch behindert. Der N-terminale Bereich von BZI-1 wäre dann für diese Effekte verantwortlich.

#### **6.4 Die zentralen Gene des Phenylpropanstoffwechsels *PAL* und *CHS* sind keine von BZI-1-regulierten Zielgene**

Da BZI-1 ebenso wie CPRF2 über seine *in vitro* Bindung an *CHS*-Promotorelemente isoliert wurde, wurde auch für BZI-1 eine funktionelle Rolle bei der Regulation der *CHS* bzw. weiterer zentraler Gene des Phenylpropanstoffwechsels, die durch ähnliche *cis*-Elemente reguliert werden, zugeschrieben (Dröge-Laser et al., 1997). Die Expression der Gene *CHS* und *PAL* wurde in transgenen Tabakpflanzen analysiert, in denen zum einen die Menge an BZI-1 und zum anderen die Transaktivierungseigenschaften von BZI-1 verändert sind.

Ektopische Überexpression von BZI-1 führte nicht zu einer veränderten *CHS*- oder *PAL*-Transkription. Sollte BZI-1 an der *CHS*- oder *PAL*-Expression beteiligt sein, bedeutet das, daß die Menge an BZI-1 nicht bestimmend für die regulierte Expression dieser Gene ist.

Eine Verringerung der Menge an funktionalem BZI-1 wurde in einem transdominant negativen Ansatz durch Expression des BZI-1- $\Delta$ N-Derivats erzielt. Fukazawa et al (2000) konnten in einem vergleichbaren Ansatz durch Expression eines dominant negativ wirkenden Derivates des bZIP-Transkriptionsfaktors REPRESSION OF SHOOT GROWTH (RSG), dem die Aktivierungsdomäne fehlt, die Transkription von RSG-regulierten Gibberellinsäurebiosynthesegenen reduzieren. Da auch diesem BZI-1-Derivat die aktivierende Eigenschaft des N-terminalen Bereichs fehlt, könnte durch Heterodimerbildung mit endogen codiertem BZI-1 die Menge an funktionsfähigem BZI-1-Protein gesenkt werden. Zusätzlich könnte dieses Protein auch wirken, indem es als BZI-1- $\Delta$ N-Homodimer an Promotor-*cis*-Elemente bindet und die Transkription dieser Gene behindert. *In vitro* wurde eine bevorzugte Bindung von BZI-1- $\Delta$ N im Vergleich zu BZI-1 gezeigt (Kuhlmann, 2002). Es ist ebenfalls denkbar, daß BZI-1- $\Delta$ N mit anderen BZI-1 interagierenden bZIP-Proteinen, wie z.B. BZI-2, BZI-3 oder BZI-4, funktionsveränderte Heterodimere bildet, so daß die normalerweise durch diese Heterodimere regulierten Zielgene nicht mehr exprimiert werden können. Pflanzen, die BZI-1- $\Delta$ N exprimieren, zeigen keine Veränderung der *PAL*- und *CHS*-Expression. Das die Expression des

Deletionsderivates *in planta* prinzipiell funktioniert und Effekte auf die Genregulation ausübt, ist dadurch zu belegen, daß diese Pflanzen morphologisch im Vergleich zum Wildtyp verändert sind. Diese Veränderungen werden später noch eingehend diskutiert.

In einem weiteren Ansatz wurden Pflanzen mit einem Fusionsgen bestehend aus BZI-1 und der VP16-Aktivierungsdomäne transformiert. Dies sollte für ein Protein codieren, welches an BZI-1-Zielpromotorsequenzen bindet und diese konstitutiv aktiviert. Die Funktionsfähigkeit des Konstruktes *in planta* wurde durch Aktivierung eines Reportergens in transienten Analysen an Tabakprotoplasten gezeigt. Das VP16-BZI-1-Fusionsprotein wurde in den transgenen Pflanzen unter Kontrolle eines Tc-induzierbaren Promotors exprimiert. Dadurch war es möglich VP16-BZI-1 zu einem bestimmten Zeitpunkt oder auch in isolierten Geweben, wie z.B. Blüten oder Blattscheiben, definiert zu exprimieren und direkt mit nicht induziertem Pflanzenmaterial zu vergleichen. Dieser Ansatz war vorteilhaft, da das Ziel in der Identifikation von primären Zielgenen bestand. Durch kurzzeitige Induktion der VP16-BZI-1-Expression kann ein indirekter Effekt auf die Regulation einzelner Gene zwar nicht ausgeschlossen, aber zumindest minimiert werden. In den hier gezeigten Experimenten ist nach Induktion des VP16-BZI-1-Proteins in Bezug auf die Stärke der Expression von *PAL* und *CHS* keine Veränderung festzustellen. In keinem der drei Ansätze, Überexpression von BZI-1, Reduktion von BZI-1 in BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen und Expression des konstitutiven Aktivators VP16-BZI-1, kann man einen Einfluß von BZI-1 auf die Regulation von Genen des Phenylpropanstoffwechsels nachweisen.

Die Beobachtung, daß BZI-1 nicht an der Regulation von *PAL* und *CHS* beteiligt ist, wird auch durch die Tatsache unterstützt, daß eine unterschiedliche räumliche Verteilung von *BZI-1* bzw. *PAL* und *CHS* vorliegt. *BZI-1* wird ubiquitär in der gesamten Pflanze exprimiert, während *CHS* nur in den pigmentierten Bereichen der Petalen aktiv ist. Die *PAL*-Expression ist ebenfalls in den Blüten verstärkt. Da dieses gewebespezifische Expressionsmuster von *PAL* und *CHS* in BZI-1- $\Delta$ N- und VP16-BZI-1-Pflanzen unverändert ist, ist ein Einfluß von BZI-1, auch als Heterodimerisierungspartner mit einem blütenspezifisch exprimierten weiteren bZIP-Faktor, höchstwahrscheinlich auszuschließen. Auch die pathogeninduzierte *PAL*-Expression ist in BZI-1-modulierten Tabakpflanzen weder nach viraler noch nach bakterieller Infektion in irgendeiner Weise im Vergleich zum Wildtyp verändert. Da die *CHS* aus Tabak nicht pathogeninduzierbar ist, wurde auf eine Expressionsanalyse in diesem Zusammenhang verzichtet.

Der beobachtete Anstieg der endogenen *BZI-1*-Transkriptmenge nach Behandlung mit Pathogenen deutet, ebenso wie die beschriebene pathogeninduzierte Phosphorylierung, auf eine Beteiligung von *BZI-1* an der Pathogenantwort hin. Diese Beteiligung ist aber unabhängig von der pathogeninduzierten Aktivierung von Genen des Phenylpropanstoffwechsels, wie z.B. *PAL*. Da die transkriptionelle Aktivierung der *BZI-1*-Expression nach ca. 4 h, im Vergleich zur innerhalb weniger Minuten nach Elicitorbehandlung einsetzenden Phosphorylierung, relativ spät erfolgt, kann es sich auch um einen indirekten Effekt handeln, der durch eine allgemeine Umstellung der Zellphysiologie nach einem Pathogenbefall erfolgt.

Mit diesen genetisch ausgerichteten Experimenten konnte die in biochemischen Ansätzen gezeigte Beteiligung von *bZIP*-Transkriptionsfaktoren an der Regulation von Genen des Phenylpropanstoffwechsels (zur Übersicht siehe Weisshaar und Jenkins 1998) nicht bestätigt werden. Da auch für *CPRF2*, welches über seine *in vitro* Bindung an die G-Box im *CHS*-Promotor isoliert wurde, eine *in vivo* Beteiligung an der Regulation der *CHS* bislang ebenfalls nicht gezeigt werden konnte (Kircher et al., 1998), belegen diese Daten, wie wichtig es ist, *in vitro* gewonnene Ergebnisse auf ihre *in vivo* Relevanz zu überprüfen.

## **6.5 Die RFDD-PCR ist eine geeignete Methode zur Isolierung von *BZI-1* regulierten Genen**

Um die biologischen Funktionszusammenhänge in denen *BZI-1* als Transkriptionsfaktor die Regulation von Genen steuert, näher definieren zu können, wurde ein Differential Display Verfahren, die RFDD-PCR, etabliert. Dazu wurden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt. Durch Tc-Induktion von *HöBZI-1-ΔN*- und *HöBin*-Suspensionskulturen sollte die durch Expression von *BZI-1-ΔN* ausgelöste Veränderung der Expression möglicher Zielgene identifiziert werden. Da sowohl der *HöBin*- wie auch der *HöBZI-1-ΔN*-Ansatz mit Tc behandelt wurden, sollten die beobachteten Unterschiede der Genexpression durch die Tc-Induktion des *BZI-1-ΔN*-Transgens hervorgerufen werden, und nicht durch andere unspezifisch durch Tc ausgelöste Effekte. In einem zweiten Ansatz sollte in mit Tc-induzierten *HöVP16-BZI-1*-Blüten durch die Bindung des gebildeten Proteins *VP16-BZI-1* an Zielpromotorsequenzen deren Expression verstärkt werden. Durch einen Vergleich mit nicht induzierten Blüten derselben Pflanze sollten sich auf diese Weise durch *BZI-1* regulierte Gene identifizieren lassen. In diesem Experiment wurden alle Blüten von einer

einzigsten Pflanze (HöVP16-BZI-1) geerntet, wodurch Unterschiede in der Genexpression vermieden wurden, die durch die Anzucht zweier unterschiedlicher Pflanzen (Wildtyp und HöVP16-BZI-1) hätten begründet sein können. Allerdings lassen sich in diesem Ansatz keine unspezifisch durch Tc verursachten Effekte ausschließen.

Bevor auf die Ergebnisse des Differential Displays im Einzelnen eingegangen wird, sollen noch weitere mögliche Probleme diskutiert werden, die bei diesem Verfahren auftreten können. So liegt einmal das Problem in der Wahl des analysierten Gewebes. Suspensionskulturen bieten den Vorteil, daß sie sehr einfach durch Zugabe von Tc zum Medium induzierbar sind. Dagegen ist die gleichmäßige Induktion von Blättern oder Blüten schwieriger. Durch Infiltration und anschließende Inkubation können Streßbedingungen entstehen, die die durch VP16-BZI-1 ausgelösten Effekte überdecken. Da man erst die Neusynthese von BZI-1- $\Delta$ N bzw. VP16-BZI-1 induzieren muß, dauert es einige Zeit bis von den gebildeten Proteinen Unterschiede in der Expression von Zielgenen ausgelöst werden. Daher ist auch der Zeitpunkt der Probennahme kritisch. Hier wurden die Zustände jeweils 4 h nach Tc-Induktion in den Ansätzen verglichen. In dieser Zeit kann es schon zur Ausprägung indirekter Effekte gekommen sein. Zu früheren Zeitpunkten war die in Western Blot Analysen detektierte Proteinmenge der BZI-1-Derivate allerdings noch gering, so daß durch eine frühere Probennahme evtl. noch keine direkt durch VP16-BZI-1 bzw. BZI-1- $\Delta$ N ausgelöste Zielgenexpression zu beobachten gewesen wäre. Das Problem der erforderlichen Proteinneusynthese hätte man durch die Wahl eines anderen Induktionssystems umgehen können. Sablowski und Meyerowitz (1998) beschreiben einen Ansatz der induzierten Aktivierung eines konstitutiv gebildeten Fusionsproteins aus dem Transkriptionsfaktor AP3 und dem Glucocorticoidrezeptor. Die Aktivierung von AP3 erfolgt durch dexamethasoninduzierte Dissoziation von an das Fusionsprotein gebundenem HSP90. Dieses System bietet den Vorteil, daß keine Neusynthese von Proteinen notwendig ist. So können direkte Effekte des Transkriptionsfaktors auf die Zielgenexpression beobachtet werden, während indirekte Effekte durch Zugabe eines Proteinsynthesehemmers blockiert werden können. In diesem System muß allerdings vorab überprüft werden, ob das Fusionsprotein mit dem Glucocorticoidrezeptor noch funktionell ist. Die Funktionsfähigkeit von BZI-1- $\Delta$ N und VP16-BZI-1 sowie die Tc-induzierbare Expression dieser Proteine war dagegen bereits weitgehend untersucht.

Obwohl die Methode im Rahmen dieser Arbeit aus Zeitgründen noch nicht optimiert werden konnte, wurde gezeigt, daß sie prinzipiell geeignet ist, differentiell exprimierte Gene zu isolieren. So konnte mit zwei unterschiedlichen Primerkombinationen in Tc-

induzierten Suspensionskulturen des BZI-1- $\Delta$ N-Ansatzes das über die Pflanzentransformation eingebrachte Hygromycinresistenzgen (*HPT*) isoliert werden. Dieses Ergebnis kann als Positivkontrolle der Methode angesehen werden. In Northern Blot Analysen wurde gezeigt, daß durch Tc-Induktion die Transkription des direkt stromabwärts der BZI-1- $\Delta$ N-Sequenz lokalisierten *HPT*-Gens reduziert wird. Ein Einfluß von Tc auf den NOS-Promotor, der die Expression des *HPT*-Gens vermittelt, ist auszuschließen, da die Expression der ebenfalls vom NOS-Promotor regulierten Neomycinphosphotransferase (*NPT*) in den Suspensionskulturen nicht verändert wird. Vielmehr deuten die Northern Blot Ergebnisse darauf hin, daß es nach Tc-induzierter Expression von BZI-1- $\Delta$ N nicht zu einem korrekten Abbruch der Transkription kommt, sondern zu einem Durchlesen der RNA-Polymerase bis zum Ende des *HPT*-Gens. Dies könnte zur Unterdrückung der *HPT*-Transkription bzw. zu Interferenzen mit der *HPT*-RNA führen, und so zu einer Reduktion der *HPT*-Transkriptmenge.

Innerhalb der verschiedenen Differential Display Ansätze wurden insgesamt zwölf PCR-Produkte isoliert. In ersten Nachtests mittels unabhängiger Northern Blot Analysen konnte für zehn dieser Gene kein Einfluß von BZI-1- $\Delta$ N oder VP16-BZI-1 auf deren Expression reproduziert werden. Für zwei Gene wurde in BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen eine unterschiedliche Expression bestätigt.

Das erste der in der RFDD-PCR isolierten Gene wurde identifiziert, weil seine Expression in Suspensionskulturen nach Induktion der BZI-1- $\Delta$ N-Expression reduziert war. Dieses Expressionsmuster konnte allerdings in Northern Blot Nachtests mit unabhängig isolierter RNA aus Suspensionskulturen nicht reproduziert werden. Weitere Northern Blot Analysen in Pflanzengewebe ergaben jedoch, daß die mRNA-Menge dieses Gens in Blättern von BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp erniedrigt ist. Im Gegensatz dazu ist die Expression in BZI-1- $\Delta$ N-Blüten gegenüber Wildtypblüten erhöht.

Sequenzvergleiche ergaben, daß das isolierte Gen für ein cytoplasmatisch lokalisiertes Thioredoxin (TRX) codiert. Thioredoxine sind kleine Proteine (Molekularmasse von 12-13 kD), die eine Rolle in der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse spielen. In höheren Pflanzen gibt es zwei gut untersuchte Thioredoxinsysteme, ein cytoplasmatisches, bestehend aus verschiedenen Thioredoxinen und einer NADPH-abhängigen Thioredoxinreduktase, und ein im Chloroplasten lokalisiertes, welches durch eine ferredoxinabhängige Thioredoxinreduktase charakterisiert ist. Kürzlich wurde von Laloi et al. (2001) auch noch ein mitochondriales Thioredoxinsystem beschrieben. Thioredoxine reduzieren spezifisch Disulfidbrücken von Zielproteinen. In Weizensamen wird durch

thioredoxinvermittelte Spaltung der Disulfidbrücken des Speicherproteins Glutenin die Proteolyse in keimenden Samen verstärkt, so daß diese Energiereserven dem Keimling zur Verfügung stehen (Kobrehel et al., 1992). Das cytosolische Thioredoxinsystem ist u.a. an der Aktivierung einiger Transkriptionsfaktoren und an der Regulation des Apoptosesignalweges beteiligt (zur Übersicht siehe Arner und Holmgren, 2000).

Die von BZI-1 regulierte Expression von Thioredoxin könnte möglicherweise an der Pathogenabwehr beteiligt sein. Nach TMV-Infektion kommt es in BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen im Rahmen der HR zur Ausbildung von lokal nicht begrenzten Läsionen (Kuhlmann, 2002). Ein wichtiger Prozess in der Ausprägung der HR ist die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). BZI-1 könnte in diesem Zusammenhang über eine thioredoxingesteuerte Redoxkontrolle an der Pathogenantwort beteiligt sein.

Das zweite im Differential Display isolierte Gen codiert für ein SKP-1-like Protein. Für SKP1 ähnliche Proteine ist bekannt, daß sie den Zellzyklus in der Mitose regulieren. SKP1 interagiert mit Proteinen, die ein F-Box-Motiv besitzen. Sie sind an der Bildung einer Untereinheit der Ubiquitin-Ligase beteiligt und stehen damit in Zusammenhang mit dem Ubiquitin vermittelten Abbau von Proteinen (zur Übersicht siehe Peters, 1998).

Aus Arabidopsis konnten neun SKP1-homologe Gene, ASK1-ASK9, identifiziert werden. Die Arabidopsismutante *ask1-1*, in der eine Transposoninsertion im *ASK1* Gen vorliegt, ist männlich steril (Yang et al., 1999). In der *ask1-1*-Mutante treten Veränderungen während der Entwicklung von Petalen und Stamina auf. Die Anzahl und Größe der Petalen ist verändert und die Anzahl der die Filamente bildenden Zellen ist reduziert (Zhao et al., 1999). Im Hefe Two Hybrid System konnte eine Interaktion von UNUSUAL FLORAL ORGANS (UFO), einem Transkriptionsfaktor mit einem F-Box Motiv, mit ASK1 gezeigt werden (Samach et al., 1999). Zhao et al. (2001) postulieren, daß UFO und ASK1 Komponenten einer Ubiquitin-Ligase sind, die die Proteolyse eines Repressors vermitteln, der die Expression von an der Blütenentwicklung beteiligten Genen mit B-Funktion (Bildung von Petalen und Stamina) reguliert. Da in BZI-1- $\Delta$ N-Blüten die Expression von *SKP-1-like*-mRNA verstärkt ist, könnte durch verstärkte Proteolyse des Repressors die Petalen- und Stamenentwicklung der BZI-1- $\Delta$ N Blüten beeinflusst werden.

Auch bei der Regulation weiterer wichtiger Signalwege in Pflanzen spielt SKP1 eine Rolle. So ist der Arabidopsis SCF<sup>TIR1</sup> Komplex, bestehend aus SKP1/ASK1, AtCUL Cullin und dem F-Box Faktor TIR1, entscheidend an der Auxinsignaltransduktion beteiligt (Gray et al., 1999). Mutationen in *ask1* und *tir1* resultieren in einer verminderten

Auxinantwort (Gray et al., 1999; Yang et al., 1999). Gray et al. (2001) postulieren ein Modell der Auxinantwort, in dem AUX/IAA-Proteine die Auxinantwort durch negative Regulation der ARF-Transkriptionsfaktoren unterdrücken. Auxin verstärkt die Ubiquitinierung der AUX/IAA-Proteine durch die SCF<sup>TIR</sup> Ubiquitin Ligase. Der nachfolgende Abbau der AUX/IAA Proteine resultiert in der Aktivierung der ARFs und des Auxinsignalweges. Da *AUX/IAA*-Gene selbst durch Auxin induziert werden, existiert eine negative Feedbackschleife, die über neu synthetisierte AUX/IAA Proteine die Repression des Signalweges wiederherstellt. Sollte sich in weiteren Untersuchungen tatsächlich eine Regulation von *SKP1*-like-Genen durch BZI-1 bestätigen, so könnte BZI-1 ebenso über Regulation der Proteolyse eines Repressors an der Auxinsignaltransduktion beteiligt sein.

Aus zeitlichen Gründen war es im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht mehr möglich, diese Hypothesen zu überprüfen. Das Expressionsmuster der zwei gefundenen Gene, *SKP1*-like und *TRX*, muß in jedem Fall noch eingehender durch Analysen weiterer unabhängiger Pflanzenlinien und nach Induktion mit verschiedenen Stimuli wie Auxin oder Pathogenen, untersucht werden, um zu bestätigen, daß es sich hierbei um von BZI-1 regulierte Zielgene handelt.

## **6.6 BZI-1 ist an der Regulation blütenspezifisch exprimierter Gene beteiligt**

Pflanzen, die das BZI-1- $\Delta$ N-Derivat exprimieren, entwickeln veränderte Blüten. Im Gegensatz dazu zeigen die Blüten der Kontrollpflanzen, die nur mit einem leeren Pflanzentransformationsvektor transformiert wurden, ein normales Wildtypphänotyp. Somit kann ein Einfluß des Pflanzentransformationsvorgangs auf die phänotypischen Veränderungen ausgeschlossen werden.

BZI-1- $\Delta$ N-Blüten sind um ca. ein Drittel in ihrer Größe reduziert. Davon sind insbesondere die Petalen und die Stamina betroffen. Da die Zellgröße in den betroffenen Stamina nicht verringert war, ist offensichtlich die Zellteilung in diesen Geweben reduziert. Die Pollen der BZI-1- $\Delta$ N-Blüten sind degeneriert und zum Großteil infertil. Zusätzlich ist die Bildung der Samenkapseln betroffen. Diese sind sehr klein und enthalten nur wenige keimungsfähige Samen. Bestäubt man BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen mit Wildtyppollen, so werden normale Samenkapseln mit einer normalen Anzahl keimfähiger Samen gebildet. Das deutet darauf hin, daß in BZI-1- $\Delta$ N-Blüten nur die Entwicklung der Mikrosporen beeinflusst ist.



Einige ähnliche Blütenphänotypen wurden bereits in der Literatur beschrieben. In Pflanzen mit reduzierten Mengen der Histonvarianten H1A und H1B, und einem damit verbundenem Anstieg der Histonvarianten H1C-H1F konnten ähnliche Veränderungen bei der Blütenentwicklung gezeigt werden (Prymakowska-Bosak et al., 1999). Die Blüten sind ebenfalls in ihrer Größe reduziert und männlich steril. Die Expression der Histonvarianten H1B und H1C ist in BZI-1- $\Delta$ N-Blüten im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert. Die Ausprägung des BZI-1- $\Delta$ N-Phänotyps ist also nicht auf eine veränderte Histonzusammensetzung in den Blüten zurückzuführen, ebenso ist ein Einfluß von BZI-1 auf die Expression von H1B und H1C auszuschließen.

Das Gen SUPERMAN (SUP) aus *A. thaliana* wurde in Tabak unter Kontrolle verschiedener Promotoren exprimiert. SUP codiert für ein Zinkfingerprotein, das in der Blütenentwicklung für die regulierte Zellteilung im dritten und vierten Wirtel, also bei der Bildung von Stamina und Carpelle, zuständig ist. Expression von SUP unter Kontrolle des APETALA1 (AP1) Promotors, ein Gen das zuerst im Blütenmeristem und anschließend begrenzt im ersten und zweiten Wirtel der Blüte (Bildung der Sepalen und Petalen) exprimiert wird, unterdrückt u.a. die Bildung von Petalen und Stamina. Dadurch wird SUP eine Beteiligung an der Regulation von Blütenentwicklungsgenen mit B-Funktion zugeschrieben (Yun et al., 2002). Durch Expression von SUP unter Kontrolle des Promotors des Gens FLORAL BINDING PROTEIN 1 (FBP1) wurde die Expression von SUP auf die Petalen und Stamina begrenzt. Die Blüten der FBP1::SUP Pflanzen entwickeln verkürzte Petalen und dünne kurze Filamente. Die Verkürzung der Petalen und Filamente ist in diesen Blüten auf eine verringerte Zellexpansion zurückzuführen, die Zellteilung ist nicht betroffen (Kater et al., 2000). Durch ektopische Expression von SUP in Tabak (35S::SUP) kommt es ebenfalls zur Bildung kleinerer Blüten. Dafür ist in diesem Fall sowohl eine verringerte Zellzahl als auch eine verminderte Zellgröße verantwortlich. Aufgrund der in 35S::SUP Pflanzen reduzierten Zellgröße wird eine Beteiligung von SUP an der Regulation von Genen der Gibberellinsäurebiosynthese postuliert (Bereterbide et al., 2001). Dies steht im Gegensatz zu den BZI-1- $\Delta$ N-Blüten, deren Zellgröße nicht verändert ist. Für BZI-1 ist, auch in Kombination mit weiteren Daten, demnach eine Regulation an der Gibberellinsäurebiosynthese nicht wahrscheinlich.

Goetz et al. (2001) beschreiben einen zu BZI-1- $\Delta$ N-Blüten ähnlichen Phänotyp, bei Pflanzen, deren Gehalt einer antherenspezifisch exprimierten Invertase, NIN88, durch einen Antisense Ansatz herunterreguliert ist. In Northern Blot Analysen an BZI-1- $\Delta$ N

Blüten konnte ebenfalls eine deutlich reduzierte *NIN88*-Transkriptmenge festgestellt werden, was einen Einfluß von *BZI-1* auf die Regulation dieser Invertase nahelegt. Extrazelluläre Invertasen sorgen für einen Sucrosetransport aus dem Phloem in den Apoplasten, indem sie Sucrose dort spalten und die entstehende Glucose und Fructose über spezifische Hexosetransporter in die Zellen aufgenommen werden. Durch den entstehenden Sucrosegradienten wird so weiterhin Sucrose aus dem Phloem über Sucrosetransporter in den Apoplasten entladen.

*NIN88* wird spezifisch in sich entwickelnden Antheren und während der Pollenreifung exprimiert. Für dieses distinkte Expressionsmuster ist der 3,3 kb große Promotorbereich des *NIN88*-Gens verantwortlich. Um die Versorgung der Zellen während der Pollenentwicklung mit den Hexosen Glucose und Fructose spezifisch zu beeinflussen, wurde in transgenen Tabakpflanzen *NIN88* in antisense-Orientierung unter Kontrolle des *NIN88*-Promotors exprimiert (Goetz et al., 2001). In Pflanzen mit so herunterregulierter blütenspezifischer Invertaseaktivität kommt es zur Ausbildung männlich steriler Blüten. Die Pollen dieser Pflanzen zeigen eine zu den *BZI-1-ΔN*-Pollen identische Morphologie und sind wie diese zum Großteil infertil. Im Gegensatz zu Wildtyppollen, die eine einheitliche Form und Größe zeigen, sind die Pollen der *NIN88* Antisense und *BZI-1-ΔN*-Pflanzen überwiegend uneinheitlich ausgebildet. Die Anzahl der fertilen Samen ist in diesen Blüten ebenfalls reduziert, die Samenkapseln sind deutlich kleiner.

*BZI-1* könnte demnach an der Regulation der Zuckerversorgung in sich entwickelnden Antheren bzw. Pollen beteiligt sein, indem durch *BZI-1* die Expression der extrazellulären Invertase *NIN88* aktiviert wird. Diese Regulation könnte in einem Zusammenspiel mit *BZI-1*-Heterodimerisierungspartnern erfolgen.

Da *BZI-4* ebenfalls spezifisch in einigen Blütenorganen, hauptsächlich den Stamina, aber auch in den Petalen und im Pistill, exprimiert wird, könnte ein Heterodimer aus *BZI-1* und *BZI-4* durch Bindung an den *NIN88*-Promotor dessen Expression kontrollieren. Im Promotorbereich von *NIN88* ist ca. 380 bp vor dem Transkriptionsstart eine G-Box lokalisiert. Dazu passend konnte in EMSAs für *BZI-1/BZI-4*-Heterodimere eine starke Bindung an G-Box *cis*-Elemente gezeigt werden (Strathmann, unveröffentlicht).

Interessant ist, daß in *BZI-1-ΔN*-Blüten nicht nur *NIN88*, sondern auch die *BZI-4* Transkription herunterreguliert ist. Denkbar ist deshalb auch, daß *BZI-1-ΔN* indirekt auf die *NIN88*-Expression wirkt, indem es die Bildung von *BZI-4* unterdrückt, worauf *BZI-4* als Homo- oder Heterodimer den *NIN88*-Promotor nicht mehr regulieren kann. In Blüten von HöVP16-*BZI-1*-Pflanzen konnte allerdings nach induzierter Expression des VP16-

BZI-1-Proteins keine verstärkte *BZI-4*-Expression beobachtet werden. Das könnte eventuell daran liegen, daß zusätzlich noch ein weiterer Stimulus, z.B. Auxin, für die *BZI-4*-Expression notwendig ist, wie es auch bei der auxinabhängigen Verstärkung der *GH3*-Expression durch VP16-BZI-1 gezeigt wurde. Ebenso könnten durch die Behandlung der Blüten (Tc-Infiltration und anschließende Inkubation in Puffer) Streßbedingungen ausgelöst werden, die den Einfluß von VP16-BZI-1 auf die *BZI-4* Expression überdecken.

Gegen eine direkte Regulation von *NIN88* durch BZI-1 sprechen die Northern Blot Ergebnisse, in denen gezeigt wurde, daß durch induzierte Expression von VP16-BZI-1 die Transkription von *NIN88* in den Blüten nicht verstärkt wird. Auch wenn man berücksichtigt, daß VP16BZI-1 in transienten Assays nur um den Faktor 3 verstärkend auf die Transkription der Reportergene wirkt und VP16-BZI-1 wahrscheinlich nur schlecht Homodimere bildet, so sollten Heterodimere aus VP16-BZI-1 und endogenem BZI-4 für eine verstärkte Aktivierung möglicher Zielgene ausreichen. Eine mögliche Erklärung könnte allerdings auch hier sein, daß für eine Induktion der *NIN88*-Expression noch ein weiterer Stimulus notwendig ist. Auch BZI-1/BZI-2-Heterodimere könnten an der Regulation der *NIN88*-Expression beteiligt sein. Für BZI-2 und den homologen Transkriptionsfaktor ATB2 aus Arabidopsis ist bekannt, daß sie spezifisch in "sink"-Gewebe, wie z.B. den Blüten und dem Stengel, exprimiert werden. *BZI-2* und *ATB2* besitzen jeweils eine lange 5'-UTR, über die, wie für *ATB2* von Rook et al. (1998b) gezeigt werden konnte, eine posttranskriptionelle Repression durch Sucrose erfolgt. Daher wird eine Beteiligung von BZI-2 und ATB2 an der Regulation des Kohlenhydrathaushaltes postuliert. Wird *ATB2* in Tabak überexprimiert, bilden sich ebenfalls größenreduzierte Blüten, die Expression einer im Apoplasten exprimierten Invertase steigt in diesem Fall jedoch an (Smeekens, persönliche Mitteilung). Diese Effekte sind noch nicht näher verstanden und müssen weiter untersucht werden.

Da in BZI-1- $\Delta$ N-Blüten die *NIN88*-mRNA-Menge reduziert ist, war zu erwarten, daß die Sucrosekonzentration insbesondere in den Stamina erhöht ist. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Zuckerszusammensetzung in vollständigen BZI-1- $\Delta$ N-Blüten, sowie in Stamina von BZI-1- $\Delta$ N- und BZI-1-Oex-Pflanzen jeweils im Vergleich zum Wildtyp bestimmt. Entgegen den Erwartungen wurde in BZI-1- $\Delta$ N-Blüten und -Stamina sogar ein geringerer Sucrosegehalt gemessen als im Wildtyp. Der Fructosespiegel war nicht beeinflusst, während der Glucosegehalt in den BZI-1- $\Delta$ N-Stamina im Vergleich zu

Wildtypstamina leicht erhöht war. In den phänotypisch nicht veränderten BZI-1-Oex-Blüten waren erwartungsgemäß keine Veränderungen des Zuckergehaltes meßbar.

Eine mögliche Erklärung für diese Ergebnis kann in der Wahl des Probenmaterials liegen. Extrazelluläre Invertasen werden durch eine kleine Genfamilie codiert, deren Mitglieder hochspezifisch in genau definierten sink-Geweben exprimiert werden (Godt und Roitsch, 1997). Das Problem könnte also sein, daß keine spezifischen Zuckermessungen in den relevanten Zellen möglich sind. Da ganze Blüten bzw. komplette Stamina für die Zuckerbestimmung eingesetzt wurden, ist nicht auszuschließen, daß die Wirkung weiterer Invertasen, die in anderen Blütenorganen bzw. weiteren Zellgeweben der Stamina exprimiert werden, die Effekte der Invertase NIN88 überdecken. So wurde kürzlich eine weitere antherenspezifische Invertase (NIN77) isoliert, deren genaues Expressionsmuster allerdings noch nicht näher charakterisiert ist (Roitsch, persönliche Mitteilung).

Es ist auch denkbar, daß durch die geringe Invertaseaktivität im Apoplasten die Ausbildung des Sucrosegradienten in den Blüten gestört ist, und damit weniger Sucrose über das Phloem nachgeliefert wird. Da die Expression von *NIN88* zwar reduziert, aber nicht vollständig unterbunden ist, müßte man in einem Enzymaktivitätstest nachweisen, daß die verminderte Expression von *NIN88* auch tatsächlich in einer verminderten Invertaseaktivität resultiert.

Man kann festhalten, daß in BZI-1- $\Delta$ N-Blüten die Versorgung mit Zuckern im Vergleich zu Wildtyp- und BZI-1-Oex-Blüten verändert ist. Dieser Einfluß von BZI-1 auf die Zuckerzusammensetzung ist blütenspezifisch, da eine Analyse in Blättern von Wildtyp- und BZI-1- $\Delta$ N- Pflanzen keine Veränderungen der Zuckerkonzentrationen ergab.

Ein regulierte Versorgung der Blüte mit Zuckern ist offenbar für die Entwicklung der Blütengröße und für die Bildung fertiler Pollen entscheidend. Daß Zucker eine wichtige Rolle bei der Antheren- und Pollenentwicklung spielen, konnte in verschiedenen männlich sterilen Pflanzen gezeigt werden, die Störungen in ihrem Zuckermetabolismus aufweisen (Clement und Audran, 1999).

## **6.7 BZI-1 ist an der auxinvermittelten Genregulation beteiligt**

Die in den BZI-1- $\Delta$ N Pflanzen beobachteten phänotypischen Veränderungen, wie z.B. gestauchter Wuchs und Bildung kleiner Blüten, entsprechen in vielen Punkten dem Phänotyp der bei ektopischer Überexpression des Transkriptionsfaktors SUPERMAN auftritt (Bereterbide et al., 2001). Auch diese Pflanzen zeigen, zusätzlich zum

Blütenphänotyp, einen insgesamt kleineren Wuchs. Für SUP wird eine Regulation der Gibberellinbiosynthese diskutiert.

Ein ähnlicher Phänotyp wurde auch bei Pflanzen beschrieben, die ein dominant negativ wirkendes Derivat des bZIP-Transkriptionsfaktors REPRESSION OF SHOOT GROWTH (RSG, Fukazawa et al., 2000) exprimieren. Es konnte gezeigt werden, daß RSG an der Gibberellinbiosynthese beteiligt ist, indem RSG an den Promotor des Arabidopsis *G43*-Gens bindet und dessen Expression aktiviert. Ursächlich für den gestauchten Wuchs in den Pflanzen, die die dominant negative Form von RSG exprimieren, ist eine durch die Störung in der Gibberellinbiosynthese hervorgerufene Beeinträchtigung der Zellstreckung. Da die Zellstreckung in BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen nicht betroffen ist, wird für BZI-1 keine Beteiligung am Gibberellinstoffwechsel angenommen. Durch die Analyse von BZI-1- $\Delta$ N-Keimlingen konnte ein mögliches Eingreifen von BZI-1 in weitere Hormonsignaltransduktionswege untersucht werden. BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen bilden zwar deutlich kleinere Samenkapseln mit nur wenigen Samen, diese unterscheiden sich aber nicht in ihrem Keimungsverhalten von Wildtypsamen. An Keimungsvorgängen sind verschiedene Pflanzenhormone beteiligt, so hemmt Abscisinsäure die Samenkeimung, während Gibberellinsäure ein notwendiger Faktor für die Einleitung der Keimung durch Brechen der Samenruhe ist (zur Übersicht siehe Koornneef et al., 2002). Keimlinge, die in der Brassinosteroidbiosynthese gestört sind, zeigen bei Dunkelkeimung einen typischen deetiolierten Phänotyp (Pepper et al., 1994). Da die Keimung bei BZI-1- $\Delta$ N-Samen der von Wildtypsamen entspricht, ist ein Einfluß des BZI-1- $\Delta$ N-Proteins auf eine durch Gibberellinsäure, Abscisinsäure oder Brassinosteroide vermittelte Signaltransduktion unwahrscheinlich.

Um zu überprüfen, ob BZI-1 in den Auxin- bzw. Cytokininstoffwechsel eingreift, wurde die hormoninduzierte Morphogenese an Blattscheiben von Wildtyp- und BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen untersucht. In BZI-1- $\Delta$ N-Blattscheiben ist die cytokinininduzierte Sproßbildung nicht betroffen. Dagegen ist die auxininduzierte Wurzelbildung bei BZI-1- $\Delta$ N-Blattscheiben deutlich unterdrückt. Aufgrund dieser Beobachtungen wird daher für BZI-1 eine Funktion bei der auxinvermittelten Signaltransduktion angenommen.

Auxin ist als klassisches Pflanzenhormon an vielen entwicklungs- und umweltspezifischen Vorgängen beteiligt, z.B. Gravitropismus, Phototropismus, Zellteilung und Zellstreckung, Aufrechterhaltung der Apikaldominanz, Bildung von Seitenwurzeln (zur Übersicht siehe Walker und Estelle, 1998; Berleth und Sachs, 2001). Viele der Auxinantworten resultieren aus Veränderungen der Zellteilung, wobei diese Veränderungen in Abhängigkeit vom Gewebe unterschiedlich sein können. So stimuliert Auxin die Zellteilung in Wurzelzellen,

was zu einer vermehrten Bildung von Seitenwurzeln führt (Laskowski et al., 1995), hemmt aber die Zellteilung in Seitenmeristemen, was zur Unterdrückung der Seitensproßbildung und damit zur Aufrechterhaltung der Apokaldominanz führt. Daher sollte eine reduzierte Auxinsensitivität, wie sie bei der hormoninduzierten Organogenese an BZI-1- $\Delta$ N-Blattscheiben beobachtet werden kann, in der vermehrten Initiation von Seitensprossen resultieren. An BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen ist diese vermehrte Seitensprossbildung deutlich ausgeprägt.

Durch die Ergebnisse der Pfropfungsexperimente, in denen durch den Austausch der Sproßteile von Wildtyp- und BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen keine Aufhebung bzw. Übertragung des BZI-1- $\Delta$ N-Phänotyps erfolgte, kann man schließen, daß die Auxinsignaltransduktion, also der lokale genetische Hintergrund, für die beobachteten Veränderungen im Erscheinungsbild der BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen entscheidend ist. Der Transport von Auxin als mobiles und über weite Strecken wirkendes Signal ist nicht betroffen. Da die Messung der Auxinkonzentrationen keinen Unterschied zwischen Wildtyp und transgenen Pflanzen ergab, ist auch ein Einfluß von BZI-1 auf die Auxinbiosynthese unwahrscheinlich.

Da Auxin auch eine Rolle bei der Blütenbildung spielt (für einen Überblick siehe Nemhauser et al., 1998), könnte die Bildung kleinerer Blüten bei den BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen auf eine verringerte Auxinsensitivität zurückzuführen sein. So entwickelt in Arabidopsis die auxinresistente Mutante *axr1* ebenfalls kleinere Blütenorgane (Lincoln et al., 1990).

In BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen treten jedoch nicht alle Veränderungen auf, die in Pflanzen mit veränderter Auxinantwort zu erwarten wären. Die Bildung von Wurzeln ist z.B. nur bei der hormoninduzierten Organogenese an Blattscheiben gestört. Pflanzen, die in Gewebekultur vermehrt wurden, bilden normale Wurzeln. Es wird daher postuliert, daß nur bestimmte durch Auxin regulierte Gene von BZI-1 reguliert werden.

## **6.8 BZI-1 reguliert in Abhängigkeit von Auxin die Expression des GH3-Gens**

Die in den BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen verminderte Fähigkeit auf exogene Auxingabe zu reagieren, manifestiert sich auch auf molekularer Ebene. Die auxinregulierten Gene *PARA*, *PARC*, *ARCA* und *GH3* wurden in Northern Blot Analysen auf ihre Induzierbarkeit durch exogen appliziertes Auxin getestet. Dem Protein *PARA* wird eine Rolle bei der Transkription zugeschrieben (Takahashi et al., 1995), zusätzlich wird für Mitglieder der *PAR*-Genfamilie eine Funktion als Glutathion S-Transferase (GST) diskutiert (Droog et al.,

1993). *ARCA* gehört zu einer Genfamilie, die für die  $\beta$ -Untereinheit von G-Proteinen codiert (Ishida et al., 1993). Die biologische Funktion der GH3-Proteine in Soja oder Tabak ist bislang ungeklärt. In Arabidopsis gibt es eine *GH3*-Genfamilie mit zehn Mitgliedern (Nakazawa et al., 2001). Wird ein Mitglied dieser Genfamilie, *DFL1* (dwarf in light 1), in Arabidopsis überexprimiert, resultiert daraus ein auxinresistenter Phänotyp, in dem die Hypokotylstreckung im Licht negativ reguliert ist. *DFL1*-antisense Pflanzen zeigen ein verlängertes Sproßwachstum und eine vermehrte Bildung von Seitenwurzeln (Nakazawa et al., 2001).

Für die transkriptionelle Regulation auxininduzierbarer Gene sind "Auxin-responsive" Promotorelemente (AuxRE) und daran bindende Transkriptionsfaktoren verantwortlich (Ulmasov et al., 1999). In den Promotorbereichen von *PAR*- oder *GST*-Genen wurden TGACG Motive, wie sie im as-1 Element vorhanden sind, und daran bindende Transkriptionsfaktoren der TGA-Familie als notwendige Komponenten für eine Auxinantwort beschrieben (Niggeweg et al., 2000). Zur Induktion der *PAR*- und *GST*-Gene sind allerdings relativ hohe Auxinkonzentrationen notwendig (Sakai et al., 1998), darüberhinaus sind die Gene *PARA*, *PARB* und *ARCA* auch durch einige nicht aktive Auxinanaloga, Schwermetalle und verschiedene Streßbedingungen induzierbar (Ulmasov et al., 1994; Droog et al., 1995). Diesen Genen wird daher eine Beteiligung an einer generellen Streßantwort zugeschrieben (Johnson et al., 2001).

*GH3* ist dagegen spezifisch nur durch aktive Auxine induzierbar (Roux et al., 1997). Die dafür notwendigen *cis*-Elemente wurden im Soja *GH3*-Promotor ausführlich untersucht (Liu et al., 1994; Ulmasov et al., 1995). Es wurden drei unabhängig voneinander wirkende AuxREs, D1, D4 und E1 gefunden. D1 und D4 beinhalten ein konserviertes TGTCTC Element, welches die Auxininduzierbarkeit vermittelt und ein stromaufwärts gelegenes Element, das für eine konstitutive Promotoraktivität verantwortlich ist. An die TGTCTC-Box binden Mitglieder der Familie der ARF-Transkriptionsfaktoren (Ulmasov et al., 1997). Das E1 Element beinhaltet eine G/C-Hybridbox (GACGTG), die unabhängig von D1 und D4 eine Auxininduzierbarkeit vermittelt (Liu et al., 1994). Die bZIP-Transkriptionsfaktoren SGBF1 und SGBF2 aus Soja binden *in vitro* an die G/C-Box im *GH3*-Promotor. In transienten Analysen unterdrückt SGBF2 die auxininduzierte Expression eines G-box Reporterkonstruktes (Liu et al., 1997). In den Promotoren von Arabidopsis *GH3*-Genen wurde ebenfalls eine G-Box als auxininduzierbares Element identifiziert (Nakazawa et al., 2001). BZI-1 erkennt sowohl G- wie auch G/C-Boxen spezifisch *in vitro* (Kuhlmann, 2002) und *in vivo*.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß in den BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen besonders die Induktion des *GH3*-Gens vermindert ist. Auch die Gene *PARA*, *PARC* und *ARCA* zeigen eine, allerdings weniger stark ausgeprägte, reduzierte Auxininduzierbarkeit. Da BZI-1 und BZI-1- $\Delta$ N *in vitro* nicht effizient an das as-1 Motiv, wie es in den *PAR* und *ARCA* Promotoren vorkommt, binden können (Kuhlmann, 2002), könnte dieser Effekt allerdings auch indirekt sein.

Die Reprimierung der *GH3*-Expression in BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen kann dadurch erklärt werden, daß das BZI-1- $\Delta$ N-Protein als Homodimer deutlich besser an diese *cis*-Elemente bindet als das vollständige BZI-1-Protein. Da dem BZI-1- $\Delta$ N-Derivat die Aktivierungsdomäne fehlt, wird die Expression von *GH3* unterdrückt. BZI-1- $\Delta$ N-Proteine besetzen dabei die Bindestellen im *GH3*-Promotor und blockieren so die Induktion durch Heterodimere aus BZI-1 und anderen bZIP-Proteinen. Die BZI-1-Expression selbst wird nicht durch Auxin induziert, daher kann es auch nicht zu einer vermehrten Bildung von BZI-1/BZI- $\Delta$ N-Heterodimeren kommen, die die transdominant negative Wirkung der BZI- $\Delta$ N-Derivate ausgleichen könnte.

In einem Ansatz, in dem die Aktivierungseigenschaft von BZI-1 verstärkt werden sollte, exprimieren Pflanzen den konstitutiven Aktivator VP16-BZI-1. Durch transiente Expression des Fusionsproteins in Protoplasten konnte sein Aktivierungspotential bestätigt werden. Die einzige konstitutiv VP16-BZI-1 exprimierende Pflanze, die im Rahmen der Pflanzentransformation regeneriert werden konnte, entwickelt deutliche Störungen im Wachstum, die Wurzelbildung ist unterdrückt, sie bildet viele Seitensprosse und sehr kleine Blätter. Auch in HöVP16-BZI-1-Pflanzen, in denen die Expression des Fusionsproteins durch Tc induziert wurde, zeigen deutliche phänotypische Veränderungen. Sie wachsen gedrunken und zeigen Anzeichen einer verfrühten Seneszenz.

Lenk (2001) konnte an Pflanzen, die konstitutiv ein Fusionsprotein aus VP16 und den bZIP-Faktoren TGA2.1 bzw. TGA2.2 exprimieren, einen gedrunkenen Wuchs und einen verkürzten Internodienabstand beobachten. Dieser Phänotyp könnte ebenfalls durch einen Einfluß auf die Auxinantwort begründet sein, da TGA Faktoren an as-1 Elemente binden, wie man sie in den Promotoren auxininduzierbarer Gene wie *PAR* und *GST* findet. Die Auswirkungen auf das Wachstum waren aber nicht so dramatisch wie durch Expression von VP16-BZI-1. Tabakpflanzen, die ein Tetracyclinrepressor-VP16-Fusionsprotein exprimieren, zeigen keine phänotypischen Veränderungen (Böhner et al., 2001), die auf eine unspezifische Wirkung der VP16 Domäne hindeuten könnten. Auch transgene Pflanzen, die ein VP16-BZI-1-Konstrukt mit einer Leserasterverschiebung exprimieren



(VP16-BZI-1 $\Delta$ ATG), so daß zwar mRNA, aber kein Protein gebildet wird, verhalten sich wie Wildtyppflanzen. Daher ist es wahrscheinlich, daß der beobachtete Phänotyp in den VP16-BZI-1-Pflanzen auf eine spezifische DNA-Bindung des VP16-BZI-1-Proteins und die durch die VP16-Domäne vermittelte Aktivierung von BZI-1-regulierten Genen zurückzuführen ist.

Es ergibt sich die Schlußfolgerung, daß das BZI-1-Aktivierungspotential in der Pflanze genau reguliert werden muß, um eine definierte Steuerung der BZI-1-Zielgene zu gewährleisten.

Um zu zeigen, daß der *GH3*-Promotor direkt von BZI-1 reguliert wird, wurde die *GH3*-Expression nach Tc-induzierter VP16-BZI-1-Expression in Northern Blot Analysen untersucht. Dabei ergab sich bei gleichzeitiger Auxininduktion eine verstärkte *GH3*-Transkription in VP16-BZI-Blattscheiben. Diese Verstärkung ist allerdings erst 4 h nach Auxininduktion zu erkennen. Zu einem früheren Zeitpunkt konnte zwar eine Auxininduktion beobachtet werden, diese ist aber unabhängig von der VP16-BZI-1-Expression, da sie in Wildtypblattscheiben mit der gleichen Signalstärke auftritt. Das bedeutet, daß die Expressionsstärke, aber nicht die Induktionsgeschwindigkeit, der Auxininduktion durch VP16-BZI-1 beeinflusst wird.

Durch Expression von VP16-BZI-1 ohne zusätzlichen Auxinstimulus konnte kein Effekt auf die *GH3*-Expression festgestellt werden. Die ebenfalls auxininduzierbare Genexpression von *PARA*, *PARC* und *ARCA* wurde nicht durch VP16-BZI-1 aktiviert, was einen weiteren Hinweis darauf liefert, daß die in den BZI-1- $\Delta$ N-Pflanzen beobachteten Effekte auf diese Gene indirekt sind.

Da die verstärkte Induktion des *GH3*-Gens durch VP16-BZI-1 nur bei gleichzeitiger Auxingabe auftritt, könnte das bedeuten, daß für eine effektive Bindung von VP16-BZI-1 posttranslationale Modifikationen, wie z.B. eine Phosphorylierung, notwendig sind. Diese könnten erst durch einen Stimulus, wie z.B. Auxin, induziert werden und auch den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Regulation von *GH3* durch VP16-BZI-1 darstellen. Dadurch wäre zu erklären, warum zu einem frühen Zeitpunkt noch keine Verstärkung der *GH3*-Transkription zu erkennen ist.

BZI-1 könnte allerdings auch durch Interaktion mit anderen auxininduzierten Transkriptionsfaktoren die *GH3*-Transkription regulieren. Für den BZI-1-Heterodimerisierungspartner TBFZ/BZI-3 wurde kürzlich nachgewiesen, daß er durch Auxin induzierbar ist (Yang et al., 2001). Als bevorzugtes Bindemotiv für TBZF/BZI-3

wurde u.a. eine G/C-Hybridbox (GACGTG) durch EMSAs identifiziert (Yang et al., 2001; Strathmann, unveröffentlicht). Es konnte weiter gezeigt werden, daß BZI-1- und BZI-3-Homodimere und BZI-1/BZI-3-Heterodimere an die G/C-Box des GH3-Promotors binden, wobei die Bindung der Heterodimere deutlich bevorzugt ist.

Da die *GH3*-Transkription durch BZI-1-Derivate reguliert wird und der *GH3*-Promotor ein durch Auxin induzierbares *cis*-Element enthält, an das BZI-1 bindet, wird postuliert, daß *GH3* ein von BZI-1 reguliertes Zielgen darstellt.

In zukünftigen Experimenten wäre es von Interesse, durch Chromatinimmunopräzipitation zu analysieren, welche Heterodimerisierungspartner an der Erkennung spezifischer Zielpromotoren beteiligt sind.

## 6.9 Modell

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit läßt sich ein vereinfachtes Modell zur BZI-1 vermittelten Expression möglicher Zielgene aufstellen.

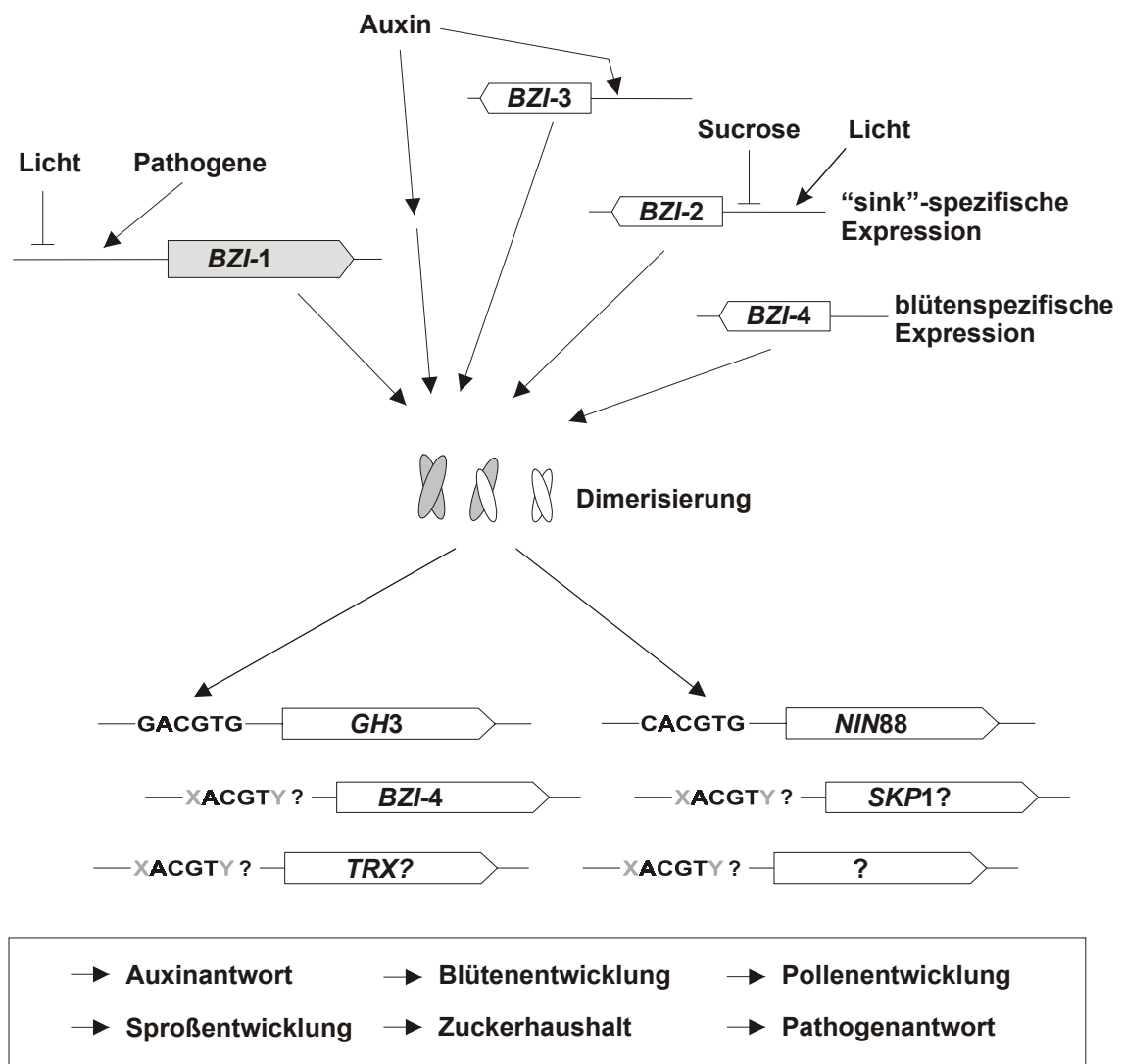


Abbildung 6.2 Modell der BZI-1 regulierten Genexpression. Details siehe Text.

BZI-1 wird ubiquitär in allen Pflanzengewebe transkribiert, seine Expression wird aber durch Pathogene und durch Licht moduliert. Da BZI-1 Homodimere nicht effektiv an G-Box, C-Box oder G/C-Hybridbox *cis*-Elemente binden, wird postuliert, daß die DNA-Bindung erst durch Interaktion mit einem Heterodimerisierungspartner, z.B. den Transkriptionsfaktoren BZI-2, BZI-3 oder BZI-4, ermöglicht wird. Diese bZIP-Proteine unterliegen einer gewebespezifischen bzw. stimulusinduzierten Expression. Durch Bildung

spezifischer BZI-Dimere wird die Expression verschiedener Zielgene reguliert. Als mögliche Zielgene kommen z.B. *GH3*, *NIN88*, *BZI-4* und die im Differential Display isolierten Gene *SKP-1* und *TRX* in Betracht. Durch direkte oder indirekte Regulation dieser Gene durch verschiedene BZI-Dimere sind Einflüsse auf die Auxinantwort, die Blüten- und Pollenentwicklung, den Zuckerhaushalt, die Pathogenabwehr und die Sproßentwicklung zu erklären. So könnten BZI-1/BZI-3-Heterodimere an der Auxinantwort durch Regulation der *GH3*-Transkription beteiligt sein. BZI-1/BZI-2- bzw. BZI-1/BZI-4-Heterodimere könnten, z.B. durch Regulation der Invertase *NIN88*, an der Regulation des Zuckerhaushaltes beteiligt sein.

In zukünftigen Experimenten muß die Expression der möglichen BZI-1-Zielgene näher untersucht werden. Promotoranalysen dieser Gene und weitergehende DNA-Bindestudien der BZI Homo- bzw. Heterodimere würden zum weiteren Verständnis der BZI-1-vermittelten Genregulation beitragen.

## 7 Literatur

- Akada, S., Dube, S.K. (1995). Organization of soybean chalcone synthase gene clusters and characterization of a new member of the family. *Plant Mol. Biol.* 29, 189-199
- Albani, D., Hammond Kosack, M.C., Smith, C., Conlan, S., Colot, V., Holdsworth, M., Bevan, M.W. (1997). The wheat transcriptional activator SPA: a seed-specific bZIP protein that recognizes the GCN4-like motif in the bifactorial endosperm box of prolamin genes. *Plant Cell* 9, 171-184
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402
- Armstrong, G.A., Weisshaar, B., Hahlbrock, K. (1992). Homodimeric and heterodimeric leucine zipper proteins and nuclear factors from parsley recognize diverse promoter elements with ACGT cores. *Plant Cell* 4, 525-553
- Arner, E.S., Holmgren, A. (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.* 267,6102-6109
- 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
- Bereterbide, A., Hernould, M., Castera, S., Mouras, A. (2001). Inhibition of cell proliferation, cell expansion and differentiation by the Arabidopsis SUPERMAN gene in transgenic tobacco plants. *Planta* 214, 22-29
- Berleth, T., Sachs, T. (2001). Plant morphogenesis: long-distance coordination and local patterning. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 4, 57-62
- Bodeau, J.P., Walbot, V. (1996). Structure and regulation of the maize Bronze2 promoter. *Plant Mol. Biol.* 32, 599-609.
- Böhner, S., Gatz, C. (2001). Characterisation of novel target promoters for the dexamethasone-inducible/tetracycline-repressible regulator TGV using luciferase and isopentenyl transferase as sensitive reporter genes. *Mol. Gen. Genet.* 264, 860-870
- Bolton, E.T., McCarthy, B.J., (1962). A general method for the isolation of RNA complementary to DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48, 1390-1397,.
- Bradford, M.M. (1979). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254
- Choi, H., Hong, J., Ha, J., Kang, J., Kim, S.Y. (2000). ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J Biol Chem.* 275, 1723-1730
- Christie, J.M., Jenkins, G.I. (1996). Distinct UV-B and UV-A/blue light signal transduction pathways induce chalcone synthase gene expression in Arabidopsis cells. *Plant Cell* 8, 1555-1567
- Church, G.M., Gilbert, W. (1984). Genomic Sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81 1991-1995
- Ciceri, P., Gianazza, E., Lazzari, B., Lippoli, G., Genga, A., Hoscheck, G., Schmidt, R.J., Viotti, A. (1997). Phosphorylation of Opaque2 changes diurnally and impacts its DNA binding activity. *Plant Cell* 9, 97-108

- Ciceri, P., Locatelli, F., Genga, A., Viotti, A., Schmidt, R.J. (1999). The activity of the maize Opaque2 transcriptional activator is regulated diurnally. *Plant Physiol.* 121, 1321-1328
- Clement, C., Audran, J.C. (1999). Anther and pollen. From Biology to Biotechnology. Springer, Heidelberg, pp. 69-90
- Cramer, C.L., Edwards, K., Dron, M., Liang, X., Dildine, S.L., Bolwell, G.P., Dixon, R.A., Lamb, C.J., Schuch, W. (1989). Phenylalanine ammonia-lyase gene organization and structure. *Plant Mol. Biol.* 12, 367-383
- 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 Res.* 16, 9861
- Davies, B., Di Rosa, A., Eneva, T., Saedler, H., Sommer, H. (1996). Alteration of tobacco floral organ identity by expression of combinations of Antirrhinum MADS-box genes. *Plant J.* 10, 663-677
- De Pater, S., Katagiri, F., Kijne, J., Chua, N.-H. (1994). bZIP proteins bind to a palindromic sequence without a ACGT core located in a seed-specific element of the pea lectin promoter. *Plant J.* 6, 133-140
- Dempsey, D., A., Shah, J., Klessig, D. (1999). Salicylic acid and disease resistance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 18, 547-575
- Dixon, R.A., Howles, P.A., Lamb, C., He, X.Z., Reddy, J.T. (1998). Prospects for the metabolic engineering of bioactive flavonoids and related phenylpropanoid compounds. *Adv. Exp. Med. Biol.* 439, 55-66
- Dixon, R.A., Paiva, N.L. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7, 1085-1097
- Drews, G.N., Beals, P.B., Bui, A.Q., Goldberg, R.B. (1992). Regional and cell-specific gene expression patterns during petal development. *Plant Cell* 4, 1383-1404
- Dröge-Laser, W., Kaiser, A., Lindsay, W.P., Halkier, B., Loake, G., Doerner, P., Dixon, R.A., Lamb, C.J. (1997). Rapid stimulation of a soybean protein-serine kinase that phosphorylates a novel bZIP transcription factor, G/HBF-1, in the induction of early transcription-dependent defenses. *EMBO J.* 16, 726-738
- 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.* 29,413-429
- 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, 965-972
- Eick, A. (1999). Der Transkriptionsfaktor N.t.G/HBF-1 aus Tabak: cDNA-Klonierung und genomische Analyse. Diplomarbeit, Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen
- Faktor, O., Kooter, J.M., Dixon, R.A., Lamb, C.J. (1996). Functional dissection of a bean chalcone synthase gene promoter in transgenic tobacco plants reveals sequence motifs essential for floral expression. *Plant Mol. Biol.* 32, 849-859
- Faktor, O., Loake, G., Dixon, R.A., Lamb, C.J. (1997). The G-box and H-box in a 39 bp region of French bean chalcone synthase promoter constitute a tissue-specific regulatory element. *Plant J.* 11 (5), 1105-1113
- Feinberg, A.P., Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132, 6-13

- Feldbrügge, M., Hahlbrock, K., Weisshaar, B. (1996). The transcriptional regulator CPRF1: expression analysis and gene structure. *Mol. Gen. Genet.* 251, 619-627
- Feldbrügge, M., Sprenger, M., Dinkelbach, M., Yazaki, K., Harter, K., Weisshaar, B. (1994). Functional analysis of a light-responsive plant bZIP transcriptional regulator. *Plant Cell* 6, 1607-1621
- Feldbrügge, M., Sprenger, M., Hahlbrock, K., Weisshaar, B. (1997). PcMYB1, a novel plant protein containing a DNA-binding domain with one MYB repeat, interacts in vivo with a light-regulatory promoter unit. *Plant J.* 11(5), 1079-1093
- Foster, R., Izawa, T., Chua, N.H. (1994). Plant bZIP proteins gather at ACGT elements. *Faseb J.* 8, 192-200
- Fukazawa, J., Sakai, T., Ishida, S., Yamaguchi, I., Kamiya, Y., Takahashi, Y. (2000). Repression of shoot growth, a bZIP transcriptional activator, regulates cell elongation by controlling the level of gibberellins. *Plant Cell* 12, 901-915
- Gaedeke, N., Klein, M., Kolukisaoglu, U., Forestier, C., Muller, A., Ansoerge, M., Becker, D., Mamnun, Y., Kuchler, K., Schulz, B., Mueller-Roeber, B., Martinoia, E. (2001). The Arabidopsis thaliana ABC transporter AtMRP5 controls root development and stomata movement. *EMBO J.* 20, 1875-1887
- Gatz, C., Kaiser, A., Wendenburg, R. (1992). Regulation of a modified CaMV 35S promoter by the Tn10-encoded Tet repressor in transgenic tobacco. *Mol. Gen. Genet.* 227, 229-237
- Geballe, A.P., Morris, D.R. (1994). Initiation codons within 5'-leaders of mRNAs as regulators of translation. *Trends Biochem Sci.* 19, 159-164
- Godt, D.E., Roitsch, T. (1997). Regulation and tissue-specific distribution of mRNAs for three extracellular invertase isoenzymes of tomato suggests an important function in establishing and maintaining sink metabolism. *Plant Physiol.* 115, 273-282
- Goetz, M., Godt, D.E., Guivarch, A., Kahmann, U., Chriqui, D., Roitsch T. (2001). Induction of male sterility in plants by metabolic engineering of the carbohydrate supply. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 6522-6527
- Gray, W.M., del Pozo, J.C., Walker, L., Hobbie, L., Risseeuw, E., Banks, T., Crosby, W.L., Yang, M., Ma, H., Estelle, M. (1999). Identification of an SCF ubiquitin-ligase complex required for auxin response in Arabidopsis thaliana. *Genes Dev.* 13, 1678-1691
- Gray, W.M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O., Estelle, M. (2001). Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* 414, 271-276
- Guiliano, G., Pichersky, E., Malik, V.S., Timko, M.P., Scolnik, P.A., Cashmore, A.R. (1988). An evolutionary conserved protein binding sequence upstream of a plant light-regulated gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 7089-7093
- Hahlbrock, K., Scheel, D., Loggemann, E., Nürnberger, T., Parniske, M., Reinhold, S., Sacks, W., Schmelzer, E. (1995). Oligopeptides elicitor-mediated defense gene activation in cultured parsley cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 4051-4057
- Halazonetis, T.D., Georgopoulos, K., Greenberg, M.E., Leder, P. (1988). c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities. *Cell* 55, 917-924
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580

- Hatton, D., Sablowski, R., Yung, M.-H., Smith, C., Schuch, W., Bevan, M. (1995). Two classes of cis-sequences contribute to tissue-specific expression of PAL2 promoter in transgenic tobacco. *Plant J.* 7, 859-876
- Hatton, D., Smith, C., Bevan, M. (1996). Tissue-specific expression of the PAL3 promoter in interaction of two conserved cis elements. *Plant Mol. Biol.* 31, 393-397
- Heinekamp, T. (1997). Funktionelle Analyse des pflanzlichen bZIP-Transkriptionsfaktors G/HBF-1. Diplomarbeit, Universität Bielefeld
- Heinekamp, T., Kuhlmann, M., Lenk, A., Strathmann, A., Dröge-Laser, W. (2002). The tobacco bZIP transcription factor BZI-1 binds to G-box promoter cis-elements of phenylpropanoid pathway genes in vitro, but it is not involved in their regulation in vivo. *Mol. Gen. Genom.*, in press
- Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J., Schilperoort, R.A. (1983). A binary plant vector strategy based on separation of vir and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303, 179-180
- Horsch R.B., Fry, J.E., Hoffmann, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G., Fraley, R.T. (1985). A simple and general method for transforming genes into plants. *Science* 227, 1229-1231
- Horvay, K. (2000). Isolierung und Analyse von Proteininteraktionspartnern des bZIP-Transkriptionsfaktors BZI-1 aus *Nicotiana tabacum*. Diplomarbeit, Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen
- Hunter, T., Karin, M. (1992). The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell* 70, 375-387
- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28
- Ishida, S., Takahashi, Y., Nagata, T. (1993). Isolation of cDNA of an auxin-regulated gene encoding a G protein beta subunit-like protein from tobacco BY-2 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 11152-11156
- Izawa, T., Foster, R., Chua, N.H. (1993). Plant bZIP protein DNA binding specificity. *J. Mol. Biol.* 230, 1131-1144
- Izawa, T., Foster, R., Nakajima, M., Shimamoto, K., Chua, N.H. (1994). The rice bZIP transcriptional activator RITA-1 is highly expressed during seed development. *Plant Cell* 6, 1277-1287
- Jakoby, M., Weisshaar, B., Dröge-Laser, W., Tiedemann, J., Kroij, T., Parcy, F. (2002). The family of bZIP transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *Trends Plant Sci.* in press
- Jefferson, R.A. (1987). Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant. Mol. Biol. Report.* 5, 387-405
- Johnson, C., Boden, E., Desai, M., Pascuzzi, P., Arias, J. (2001). In vivo target promoter-binding activities of a xenobiotic stress-activated TGA factor. *Plant J.* 28, 237-243
- Kater, M.M., Franken, J., van Aelst, A., Angenent, G.C. (2000). Suppression of cell expansion by ectopic expression of the *Arabidopsis* SUPERMAN gene in transgenic petunia and tobacco. *Plant J.* 23, 407-413
- King, E.O., Ward, M.K., Raney, D.E. (1954). Two simple media for the demonstration of phycocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44, 301-307



- Kircher S, Ledger S, Hayashi H, Weisshaar B, Schafer E, Frohnmeyer H (1998). CPRF4a, a novel plant bZIP protein of the CPRF family: comparative analyses of light-dependent expression, post-transcriptional regulation, nuclear import and heterodimerisation. *Mol Gen Genet* 257, 595-605
- Kircher S, Wellmer F, Nick P, Rügner A, Schafer E, Harter K (1999). Nuclear import of the parsley bZIP transcription factor CPRF2 is regulated by phytochrome photoreceptors. *J Cell Biol* 144, 201-211
- Kobrehel, K., Wong, J.H., Balogh, A., Kiss, F., Yee, B.C., Buchanan, B.B. (1992). Specific reduction of wheat storage proteins by thioredoxin h. *Plant Physiol.* 99, 919-924
- Koornneef, M., Benstink, L., Hilhorst, H. (2002). Seed dormancy and germination. *Curr. opin. Plant Biol.* 5, 33-36
- Krylov, D., Olive, M., Vinson, C. (1995). Extending dimerization interfaces: the bZIP basic region can form a coiled coil. *EMBO J.* 14, 5329-5337
- Kuhlmann, M. (2002). Charakterisierung der konservierten Domänen des Transkriptionsfaktors N.t.BZI-1. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen
- Kyhse-Anderson, J. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 10, 203-209
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 690-685
- Laloi, C., Rayapuram, N., Chartier, Y., Grienenberger, J.M., Bonnard, G., Meyer, Y. (2001). Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 14144-14149
- Lamb, P., McKnight, S.L. (1991). Diversity and specificity in transcriptional regulation: the benefits of heterotypic dimerization. *Trends Biochem. Sci.* 16, 417-422
- 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, 1759-1764
- Laskowski, M.J., Williams, M.E., Nusbaum, H.C., Sussex, I.M. (2000). Formation of lateral root meristems is a two-stage process. *Development* 121, 3303-3310
- Le Gouill, C., Parent, J.L., Rola-Pleszczynski, M., Stankova, J. (1994). Analysis of recombinant plasmids by a modified alkaline lysis method. *Anal. Biochem.* 219, 164
- Leborgne-Castel, N., Jelitto-Van Dooren, E.P., Crofts, A.J., Denecke, J. (1999). Overexpression of BiP in tobacco alleviates endoplasmic reticulum stress. *Plant Cell* 11, 459-470
- Lenk, I. (2001). Analyse der in vivo Funktion der Transkriptionsfaktoren TGA2.1 und TGA2.2 aus Tabak nach Fusion mit einer konstitutiven Aktivierungsdomäne. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen
- Leyva, A., Liang, X., Pintor-Toro, J., Dixon, R.A., Lamb, C.J. (1992). Cis-element combinations determine phenylalanine ammonia-lyase gene tissue-specific expression patterns. *Plant Cell* 4, 263-271
- Li, Y., Liu, Z.B., Shi, X., Hagen, G., Guilfoyle, T.J. (1994). An auxin-inducible element in soybean SAUR promoters. *Plant Physiol.* 106, 37-43
- Liang, X., Dron, M., Cramer, C.L., Dixon, R.A., Lamb, C.J. (1989a). Differential regulation of phenylalanine ammonia-lyase genes during plant development and environmental cues. *J. Biol. Chem.* 264, 14486-14492

- Liang, X.W., Dron, M., Schmid, J., Dixon, R.A., Lamb, C.J. (1989b). Developmental regulation of a phenylalanine ammonia-lyase- $\beta$ -glucuronidase gene fusion in transgenic tobacco plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 9284-9288
- Lincoln, C., Britton, J.H., Estelle, M. (1990). Growth and development of the *axr1* mutants of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2, 1071-1080
- Liu, Z.B., Hagen, G., Guilfoyle, T.J. (1997). A G-box-binding protein from soybean binds to the E1 auxin-response element in the soybean GH3 promoter and contains a proline-rich repression domain. *Plant Physiol.* 115, 397-407
- Liu, Z.B., Ulmasov, T., Shi, X., Hagen, G., Guilfoyle, T.J. (1994). Soybean GH3 promoter contains multiple auxin-inducible elements. *Plant Cell* 6, 645-657
- Lohmer, S., Maddaloni, M., Motto, M., Salamini, F., Thompson, R.D. (1993). Translation of the mRNA of the maize transcriptional activator Opaque-2 is inhibited by upstream open reading frames present in the leader sequence. *Plant Cell* 5, 65-73
- Lois, R., Dietrich, A., Hahlbrock, K., Schulz, W. (1989). A phenylalanine ammonia-lyase gene from parsley: structure, regulation and identification of elicitor- and light- responsive cis-elements. *EMBO J.* 8, 1641-1648
- Ma, J., Ptashne, M. (1987). A new class of yeast transcriptional activators. *Cell* 51, 13-19
- Malamy, J., Hennig, J., Klessig, D.F. (1992). Temperature dependend induction of salicylic acid and its conjugates during response to tobacco mosaic virus infection. *Plant Cell* 4, 359-365
- Martinez-Garcia, J.F., Moyano, E., Alcocer, M.J., Martin, C. (1998). Two bZIP proteins from *Antirrhinum* flowers preferentially bind a hybrid C-box/G-box motif and help to define a new sub-family of bZIP transcription factors. *Plant J.* 13, 489-505
- Menkens, A.E., Cashmore, A.R. (1994). Isolation and characterization of a fourth *Arabidopsis thaliana* G-box-binding factor, which has similarities to Fos oncoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 2522-2526
- Menkens, A.E., Schindler, U., Cashmore, A.R. (1995). The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins. *TIBS* 20, 506-510
- Metallo, S.J., Schepartz, A. (1997). Certain bZIP peptides bind DNA sequentially as monomers and dimerize on the DNA. *Nat Struct Biol.* 4, 115-117
- Moalem-Beno, D. (1997). Sugar-dependent gibberellin-induced chalcone synthase gene expression in *petunia* corollas. *Plant Physiol.*, 113, 419-424
- Mol, J., Jenkins, G.I., Schäfer, E., Weiss, D. (1996). Signal perception, transduction, and gene expression involved in anthocyanin biosynthesis. *Crit. Rev. Plant Sci.* 15, 525-557
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497
- Nakase, M., Aoki, N., Matsuda, T., Adachi, T. (1997). Characterization of a novel rice bZIP protein which binds to the alpha-globulin promoter. *Plant Mol. Biol.* 33, 513-522
- Nakazawa, M., Yabe, N., Ichikawa, T., Yamamoto, Y.Y., Yoshizumi, T., Hasunuma, K., Matsui, M. (2001). DFL1, an auxin-responsive GH3 gene homologue, negatively regulates shoot cell elongation and lateral root formation, and positively regulates the light response of hypocotyl length. *Plant J.* 25, 213-221

- Nemhauser, J.L., Zambryski, P.C., Roe, J.L. (1998). Auxin signaling in Arabidopsis flower development? *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 531-535
- Niggeweg, R. (1999). Salizylsäure- und Auxin-induzierte Genexpression in *Nicotiana tabacum*: Funktionelle Bedeutung der TGA-Faktoren der Subklasse II. Dissertation, Universität Bielefeld
- Niggeweg, R., Thurow, C., Kegler, C., Gatz, C. (2000). 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, 19897-19905
- Niu, X., Renshaw Gegg, L., Miller, L., Guiltinan, M.J. (1999). Bipartite determinants of DNA-binding specificity of plant basic leucine zipper proteins. *Plant Mol. Biol.* 41, 1-13
- Onate, L., Vicente-Carbajosa, J., Lara, P., Diaz, I., Carbonero, P. (1999). Barley BLZ2, a seed-specific bZIP protein that interacts with BLZ1 in vivo and activates transcription from the GCN4-like motif of B-hordein promoters in barley endosperm. *J. Biol. Chem.* 274, 9175-9182
- O'Shea, E.K., Rutkowski, R., Kim, P.S. (1989). Evidence that the leucine zipper is a coiled coil. *Science* 243, 538-542
- Oyama, T., Shimura, Y., Okada, K. (1997). The Arabidopsis HY5 gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. *Genes. Dev.* 11, 2983-2995
- Pellegrini L, Rohfritsch O, Fritig B, Legrand M (1994). Phenylalanine ammonia-lyase in tobacco. Molecular cloning and gene expression during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus and the response to a fungal elicitor. *Plant Physiol.* 106, 877-886
- Pepper, A., Delaney, T., Washburn, T., Poole, D., Chory, J. (1994). DET1, a negative regulator of light-mediated development and gene expression in Arabidopsis, encodes a novel nuclear-localized protein. *Cell* 78, 109-116
- Peters, J.M. (1998). SCF and APC: the Yin and Yang of cell cycle regulated proteolysis.
- Pysh LD, Schmidt RJ (1996). Characterization of the maize OHP1 gene: evidence of gene copy variability among inbreds. *Gene* 177, 203-208
- Pysh, L.D., Aukerman, M.J., Schmidt, R.J. (1993). OHP1: a maize basic domain/leucine zipper protein that interacts with Opaque2. *Plant Cell* 5, 227-236
- Randall, P.J., Bourma, D. (1973). Zinc deficiency, carbonic anhydrase, and photosynthesis in leaves of spinach. *Plant Physiol.* 52, 229-239
- Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C.-Z., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R.R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J.Z., Ghandehari, D., Sherman, B.K., Yu, G.-L. (2000). Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eucaryotes. *Nature* 290, 2105-2109.
- 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, 1087-1098
- Rook, F., Gerrits, N., Kortstee, A., van Kampen, M., Borrias, M., Weisbeek, P., Smeeckens, S. (1998b). Sucrose-specific signalling represses translation of the Arabidopsis ATB2 bZIP transcription factor gene. *Plant J.* 15, 253-263

- Rook, F., Weisbeek, P., Smeeckens, S. (1998a). The light-regulated Arabidopsis bZIP transcription factor gene ATB2 encodes a protein with an unusually long leucine zipper domain. *Plant Mol. Biol.* 37, 171-178
- Roux, C., Perrot-Rechenmann, C. (1997). Isolation by differential display and characterization of a tobacco auxin-responsive cDNA Nt-gh3, related to GH3. *FEBS Lett.* 419, 131-136
- Rügner, A., Frohnmeyer, H., Nake, C., Wellmer, F., Kircher, S., Schafer, E., Harter, K. (2001). Isolation and characterization of four novel parsley proteins that interact with the transcriptional regulators CPRF1 and CPRF2. *Mol Genet Genomics* 265, 964-976
- Ryder, T.B., Hedrick, S., Bell, J.N., Liang, X., Clouse, S.D. (1987). Organization and differential activation of a gene family encoding the plant defense enzyme chalcone synthase in *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Gen. Genet.* 210, 219-233
- Sablowski, R.W., Baulcombe, D.C., Bevan, M. (1995). Expression of a flower-specific Myb protein in leaf cells using a viral vector causes ectopic activation of a target promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 6901-6905
- Sablowski, R.W., Meyerowitz, E.M. (1998). A homolog of NO APICAL MERISTEM is an immediate target of the floral homeotic genes APETALA3/PISTILLATA. *Cell* 92, 93-103
- Sablowski, R.W., Moyana, E., Culianez-Macia, A.C., Schuch, W., Martin, C., Bevan, M. (1994). A flower-specific Myb protein activates transcription of phenylpropanoid biosynthetic genes. *EMBO J.* 13, 128-137
- 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, 731-739
- Samach, A., Klenz, J.E., Kohalmi, S.E., Risseuw, E., Haughn, G.W., Crosby, W.L. (1999). The UNUSUAL FLORAL ORGANS gene of Arabidopsis thaliana is an F-box protein required for normal patterning and growth in the floral meristem. *Plant J.* 20, 433-45
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A Laboratory Manual* 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring Harbour: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Schindler, U., Menkens, A.E., Beckmann, H., Ecker, J.R., Cashmore, A.R. (1992a). Heterodimerization between light-regulated and ubiquitously expressed Arabidopsis GBF bZIP proteins. *EMBO J.* 11, 1261-1273
- Schindler, U., Terzaghi, W., Beckmann, H., Kadesch, T., Cashmore, A.R. (1992b). DNA binding site preference and transcriptional activation properties of the Arabidopsis transcription factor GBF 1. *EMBO J.* 11, 1275-1289
- Schmid, J., Doerner, P.W., Clouse, S.D., Dixon, R.A., Lamb, C.J. (1990). Developmental and environmental regulation of a bean chalcone synthase promoter in transgenic tobacco. *Plant Cell* 2, 619-631
- Schmidt, R.J., Ketudat, M., Aukerman, M.J., Hoschek, G. (1992). Opaque-2 is a transcriptional activator that recognizes a specific target site in 22-kD zein genes. *Plant Cell* 4, 689-700.
- Schulze-Lefert, P., Becker Andre, M., Schulz, W., Hahlbrock, K., Dangl, J.L. (1989a). Functional architecture of the light-responsive chalcone synthase promoter from parsley. *Plant Cell* 1, 707-714
- Schulze-Lefert, P., Dangl, J.L., Becker Andre, M., Hahlbrock, K., Schulz, W. (1989b). Inducible in vivo DNA footprints define sequences necessary for UV light activation of the parsley chalcone synthase gene. *EMBO J.* 8, 651-656

- Schwechheimer, C., Bevan, M. (1998). The regulation of transcription factor activity in plants. *Trends in Plant Sci.* 3, 378-383
- Shufflebottom, D., Edwards, K., Schuch, W., Bevan, M. (1993). Transcription of two members of a gene family encoding phenylalanine ammonia-lyase leads to remarkably different cell specificities and induction patterns. *Plant J.* 3(6), 835-845
- Siberil, Y., Doireau, P., Gantet, P. (2001). Plant bZIP G-box binding factors. Modular structure and activation mechanisms. *European Journal of biochemistry FEBS* 268, 5655-5666.
- Sprenger-Haussels, M., Weisshaar, B. (2000). Transactivation properties of parsley proline-rich bZIP transcription factors. *Plant J.* 22, 1-8.
- Stermer, B.A., Schmidt, J., Lamb, C.J., Dixon, R.A. (1990). Infection and stress activation of bean chalcon synthase promoters in transgenic tobacco. *Mol. Plant Microb. Interact.* 3, 381-388
- Strathmann, A., Kuhlmann, M., Heinekamp, T., Droge-Laser, W. (2001). BZI-1 specifically heterodimerises with the tobacco bZIP transcription factors BZI-2, BZI-3/TBZF and BZI-4, and is functionally involved in flower development. *Plant J.* 28, 397-408
- Szekeres, M., Haizel, T., Adam, E., Nagy, F. (1995). Molecular characterization and expression of a tobacco histone H1 cDNA. *Plant Mol. Biol.* 27, 597-605
- Takahashi, Y., Nagata, T. (1992). Differential expression of an auxin-regulated gene, parC, and a novel related gene, C-7, from tobacco mesophyll protoplasts in response to external stimuli and in plant tissues. *Plant Cell Physiol.* 33, 779-787
- 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.* 86, 9279-9283
- Thanos, D., Maniatis, T. (1995). NF-kappa B: a lesson in family values. *Cell* 80, 529-532
- Triezenberg, S.J., Kingsbury, R.C., McKnight, S.L. (1988). Functional dissection of VP16, the trans-activator of herpes simplex virus immediate early gene expression. *Genes. Dev.* 2, 718-729
- Ulmasov, T., Hagen, G., Guilfoyle, T.J. (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, 1055-1064
- Ulmasov, T., Hagen, G., Guilfoyle, T.J. (1997). ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science* 276, 1865-1868
- Ulmasov, T., Hagen, G., Guilfoyle, T.J. (1999). Activation and repression of transcription by auxin-response factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 5844-5849
- Ulmasov, T., Liu, Z.B., Hagen, G., Guilfoyle, T.J. (1995). Composite structure of auxin response elements. *Plant Cell* 7, 1611-1623
- Varagona, M.J., Raikhel, N.V. (1994). The basic domain in the bZIP regulatory protein Opaque2 serves two independent functions: DNA binding and nuclear localization. *Plant J.* 5, 207-214
- Vicente-Carbajosa J, Onate L, Lara P, Diaz I, Carbonero P (1998). Barley BLZ1: a bZIP transcriptional activator that interacts with endosperm-specific gene promoters. *Plant J.* 13, 629-640
- Vicente-Carbajosa, J., Moose, S.P., Parsons, R.L., Schmidt, R.J. (1997). A maize zinc-finger protein binds the prolamin box in zein gene promoters and interacts with the basic leucine zipper transcriptional activator Opaque2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 7685-7690

- Vinson, C.R., Sigler, P.B., McKnight, S.L. (1989). Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science* 246, 911-916
- Walker, L., Estelle, M. (1998). Molecular mechanisms of auxin action. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 434-439
- Weisshaar, B., Armstrong, G.A., Block, A., da Costa e Silva, O., Hahlbrock, K. (1991). Light-inducible and constitutively expressed DNA-binding proteins recognizing a plant promoter element with functional relevance in light responsiveness. *EMBO J.* 10, 1777-1786
- Weisshaar, B., Jenkins, G.I. (1998). Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 251-257
- Wellmer, F., Kircher, S., Rügner, A., Frohnmeyer, H., Schafer, E., Harter, K. (1999). Phosphorylation of the parsley bZIP transcription factor CPRF2 is regulated by light. *J Biol Chem.* 274, 29476-29482
- Yalpani, N., Silverman, P., Wilson, T.M., Kleier, D.A., Raskin, I. (1991). Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco. *Plant Cell* 3, 809-818
- Yang, M., Hu, Y., Lodhi, M., McCombie, W.R., Ma, H. (1999). The Arabidopsis SKP1-LIKE1 gene is essential for male meiosis and may control homologue separation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 11416-11421
- Yang, S.H., Berberich, T., Sano, H., Kusano, T. (2001). Specific association of transcripts of *tbzF* and *tbz17*, tobacco genes encoding basic region leucine zipper-type transcriptional activators, with guard cells of senescing leaves and/or flowers. *Plant Physiol.* 127, 23-32
- Yun, J.Y., Weigel, D., Lee, I. (2002). Ectopic Expression of SUPERMAN Suppresses Development of Petals and Stamens. *Plant Cell Physiol.* 43, 52-57
- Zhao, D., Yang, M., Solava, J., Ma, H. (1999). The ASK1 gene regulates development and interacts with the UFO gene to control floral organ identity in Arabidopsis. *Dev. Genet.* 25, 209-223
- Zhao, D., Yu, Q., Chen, M., Ma, H. (2001). The ASK1 gene regulates B function gene expression in cooperation with UFO and LEAFY in Arabidopsis. *Development* 128, 2735-2746
- 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 Sequenzen

Im Folgenden sind Sequenzen, Primerbindestellen und Erkennungsstellen relevanter Restriktionsenzyme der in dieser Arbeit hergestellten Nukleinsäuren dargestellt.

### 8.1.1 BZI-1

```
~~~~~P51~~~~~
1  M E R V F S M E D D I G D H F W S T P P T A D L
   ATG GAG CCG GTC TTC TCC ATG GAG GAT GAC ATT GGC GAC CAC TTC TGG TCG ACG CCG CCG ACG GCG GAC TTA
73  G V D S P T A A A A V S Y S K M M N R S S S E W
   GGC GTT GAT TCC CCA ACC GCT GCC GCC GTC TCC TAC TCA AAG ATG AAT CGA AGC TCT TCC GAA TGG
145  A F Q R F L Q E A T A A G T S T S S P P Q P P T
   GCT TTC CAG GCG TTC CTC CAA GAA GCC ACC GCC GCC GGT ACC TCC ACT TCA TCT CCC CCC CAG CCA CCT ACA
                                     RpnI
217  *M T A S S S S S S H Q N D V V E I K D E N L S I
   ATG ACG GCG TCT TCC TCG TCA TCT TCG CAC CAA AAC GAC GTC GTG GAG ATC AAG GAT GAG AAT CTT TCT ATT
                                     P47
289  P N L N P S T A L N S K P A S S F G L A P P P N
   CCT AAT TTA AAT CCC AGT ACG GCG TTG AAT TCG AAG CCG GCG TCG TCG TTT GGC CTC GCA CCT CCG CCG AAT
361  I A V D S E E Y Q A F L K S Q L H L A C A A V A
   ATT GCC GTT GAT TCC GAA GAG TAT CAA GCA TTC CTC AAA AGC CAA CTC CAT TTG GCT TGC GCC GCC GTT GCT
433  L T R G K S L N P Q D S G S T A H D K G S E T A
   TTG ACT CGC GGC AAG AGT TTA AAC CCT CAG GAT TCA GGC TCT ACA GCT CAC GAC AAA GGA TCA GAG ACT GCT
                                     P49
                                     P48
505  S A A Q S G S H V S T L G S G Q E V A K I Q D K
   AGT GCA GCT CAA TCA GGA TCT CAC GTC TCC ACT TTA GGA TCT GGT CAG GAA GTG GCA AAA ATT CAA GAT AAG
577  D A G G P V G I P S L P P V Q K K P V V Q V R S
   GAT GCT GGT GGA CCA GTT GGA ATT CCC TCC TTG CCC CCG GTG CAA AAG AAA CCT GTG GTG CAG GTG AGG TCA
649  T T S G S S R E Q S D D D E A E G E A E T T Q G
   ACA ACC AGT GGT TCA TCT AGA GAG CAA TCT GAT GAT GAT GAT GAA GCT GAA GGA GAA GAA ACA ACT CAA GGC
721  M D P A D A K R V R R M L S N R E S A R R S R R
   ATG GAT CCA GCT GAT GCA AAA CGT GTA AGG AGA ATG CTT TCA AAT AGA GAA TCA GCC AGA CGT TCA AGG AGA
   BamHI ~~~~~P45~~~~~
793  R K Q A H L T E L E T Q V S Q L R V E N S S L L
   AGA AAG CAG GCC CAT CTG ACA GAA CTC GAG ACA CAG GTT TCT CAA CTC AGA GTA GAA AAC TCC TCT CTA CTG
                                     XhoI ~~~~~BZI-1-ZIP-for~~~~~
                                     BZI-1-ZIP-rev~~~~~
865  K R L T D I S Q K Y N E A A V D N R V L K A D V
   AAA CGT CTG ACT GAC ATA AGC CAG AAA TAC AAT GAA GCA GCG GTT GAT AAT CGA GTC TTG AAA GCA GAT GTT
937  E T L R T K V K M A E E T V K R V T G L N P L F
   GAG ACA TTA AGA ACG AAG GTA AAG ATG GCT GAA GAA ACT GTT AAA AGA GTT ACT GGG TTA AAT CCG TTA TTC
1009  Q A M S E I S S M V M P S Y S G S P S D T S A D
   CAA GCT ATG TCA GAG ATT TCC TCA ATG GTA ATG CCA TCC TAC TCT GGT AGT CCT TCA GAC ACA TCG GCA GAC
1081  A A V P V Q D D P K H H Y Y Q Q P P N N L M P T
   GCT GCT GTA CCT GTG CAA GAT GAT CCA AAA CAT CAC TAC TAC CAA CAG CCG CCA AAT AAT CTT ATG CCA ACC
1153  H D P R I Q N G M V D V P P I E N V E Q N P A T
   CAT GAT CCT AGA ATC CAA AAT GGT ATG GTA GAT GTT CCT CCA ATA GAA AAT GTA GAG CAG AAT CCT GCA ACG
1225  A A V G G N K M G R T T S M Q R V A S L E H L Q
   GCA GCA GTT GGG GGG AAC AAG ATG GGT AGA ACA ACT TCA ATG CAG CGG GTT GCT AGC TTG GAG CAT CTG CAG
                                     P57 ~~~~~P51~~~~~
1297  K R I R G E V S S C G T Q G R G E Q -
   AAG CGC ATC CGT GGT GAA GTG AGT TCC TGT GGA ACT CAA GGC AGG GGA GAG CAA TAA
```

Abbildung 8.1 Aminosäure- und Nukleotidsequenz von BZI-1 mit Angabe der relevanten Primerbindestellen. Der neu amplifizierte 5'-Bereich ist grau unterlegt. Die Sequenz des sich dadurch neu ergebenden N-Terminus ist kursiv dargestellt. Der ursprüngliche Translationsstart ist mit einem Stern gekennzeichnet. Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme sind kursiv und unterstrichen.

### 8.1.2 pUC-5'BZI-1

Restsequenz: pUC57-T

*KpnI* (pUC57-T)  
CGGTACCTCG CGAATGCATC TAGATGATTC TCATCGTTGA TCTCCACGAC  
GTCGTTCTGG TGCGAAGATG ACGAGGAAGG CGCCGTCATT GTAGGTGGCT

*KpnI* (BZI-1)  
GGGGGGGAGA TGAAGTGGAG GTACCGGCGG CGGTGGCTTC TTGGAGGAAG  
CGCTGGAAAG CCCATTCGGA AGAGCTTCGA TTCATCATCT TTGAGTAGGA  
GACGGCGGCG GCAGCGGTTG GGAATCAAC GCCTAAGTCC GCCGTCGGCG  
GCGTCGACCA GAAGTGGTCG CCAATGTCAT CCTCCATGGA GAAGACCCGC

← *BamHI SmaI* (pUC57-T)  
TCCATATCGG ATCCCGGGCC CGTCGACTGC

**Abbildung 8.2** Darstellung der Sequenzübergänge und Erkennungssequenzen relevanter Restriktionsenzyme im Plasmid pUC5'BZI-1. Das aus der PCR mit genomischer Tabak DNA und den Primern P51 und P47 resultierende 279 bp Fragment ist grau unterlegt. Das Startcodon ist fett und die Translationsrichtung durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die Restriktionsschnittstellen sind kursiv und unterstrichen.

### 8.1.3 pBZI-1-ΔN

Restsequenz: pUC

*HpaI KpnI*  
Tx-TAGAGTTAAC GGTACCTCCA CTTTCATCTC CCCCCAGCC ACCTACA**ATG**//--  
BZI-1-ΔN--//polyAocs

**Abbildung 8.3** Darstellung der Sequenzübergänge und Erkennungssequenzen relevanter Restriktionsenzyme im Plasmid pBZI-1-ΔN. Das Startcodon ist fett dargestellt, die Restriktionsschnittstellen sind kursiv und unterstrichen. Tx, Tx-Promotor; polyAocs, ocs Polyadenylierungssignal.

### 8.1.4 pBZI-1

Restsequenz: pBZI-1-ΔN

*BamHI KpnI*  
Tx-GTTGGGATCC GAT**ATG**//--5'-BZI-1--//CACCGCCGCC GGTACCTCCA  
CTTCATCTCC CCCCCAGCCA CCTACA**ATG**//--BZI-1-ΔN--//polyAocs

**Abbildung 8.4** Darstellung der Sequenzübergänge und Erkennungssequenzen relevanter Restriktionsenzyme im Plasmid pBZI-1. Das Startcodon und der ehemalige Translationsstart sind jeweils fett dargestellt, die aus der Ligation der *HpaI*- und *SmaI*-Restriktionsschnittstellen resultierende Sequenz ist gepunktet unterstrichen, Restriktionsschnittstellen sind kursiv und unterstrichen. Tx, Tx-Promotor; polyAocs, ocs Polyadenylierungssignal





### 8.1.7 pBin-VP16-BZI-1

Restvektor: pBinHygTx

*KpnI*  
Tx- GGTACCA **TGACGAAAAA** CAATTACGGG TCTACCATCG AGGGCCTGCT  
CGATCTCCCG GACGACGACG CCCCCGAAGA GGCGGGGCTG GCGGCTCCGC  
GCCTGTCCTT TCTCCCCGCG GGACACACGC GCAGACTGTC GACGGCCCCC  
CCGACCGATG TCAGCCTGGG GGACGAGCTC CACTTAGACG GCGAGGACGT  
GGCGATGGCG CATGCCGACG CGCTAGACGA TTTCGATCTG GACATGTTGG  
GGGACGGGGA TTCCCCGGGT CCGGGATTTA CCCCCACGA CTCCGCCCCC  
TACGGCGCTC TGGATATGGC CCACTTCGAG TTTGAGCAGA TGTTTACCGA  
TGCCCTCGGA ATTGACGAGT ACGGTGGGGG AGGAGGTGGT TCAGGTGGAG  
*BamHI*  
GTGGATCCGA **TATG** / / --BZI-1-- / / polyAocs

**Abbildung 8.7** Darstellung der Sequenzübergänge und Erkennungssequenzen relevanter Restriktionsenzyme im Plasmid pBin-VP16-BZI-1. Das Startcodon ist fett und die VP16-Sequenz ist grau unterlegt. Die Restriktionsschnittstellen sind kursiv und unterstrichen. Tx, Tx-Promotor; polyAocs, ocs Polyadenylierungssignal.

### 8.1.8 pHBT-sGFP

Restsequenz: pUC18

AAGCTT- -389 bis -46 Region des *CaMV 35S* Promotors -CCCAAGCTTGGGCCCAAGCT  
TG- 188 bp des 5'-Bereichs des *C4ppdkZm1*-Gens (*Z.m.*) mit TATA-Box und Teilen des  
*KpnI* *BamHI*  
5'-UTR -GTGGATCAGGGTACCGGGCTGATATCGGGATCC**ATG** / / --sGFP-S65T-- / / **TAAA**  
*NotI*  
GCGGCCGCCCGGCTGCAG- polyAnos

**Abbildung 8.8** Darstellung wichtiger Sequenzübergänge des Plasmids pHBT-sGFP. Der HBT-Promotor ist grau unterlegt, Start- und Stoppcodon des sGFP-Gens sind fett dargestellt. Die Restriktionsschnittstellen sind kursiv und unterstrichen. polyAnos, nos Polyadenylierungssignal.

### 8.1.9 pHBT

Restsequenz: pUC18

*KpnI* *BamHI* *NcoI* *NotI*  
HBT- AGGTACCGGGCTGATATCGGGATCCATGGGCGGCCGCCCGGCTGCAG- polyAnos

**Abbildung 8.9** Darstellung wichtiger Sequenzübergänge des Plasmids pHBT. Der HBT-Promotor ist grau unterlegt, die Restriktionsschnittstellen sind kursiv und unterstrichen. HBT, HBT-Promotor; polyAnos, nos Polyadenylierungssignal.

### 8.1.10 pHBT-BZI-1

Restsequenz: pHBT

*KpnI* *BamHI* *NotI*  
HBT-AGGTACCGGGCTGATATCGGGATCCGAT**ATG**//--BZI-1--//GCGGCCGCCCGGCTG  
CAG- polyAnos

**Abbildung 8.10** Darstellung wichtiger Sequenzübergänge des Plasmids pHBT-BZI-1. Der HBT-Promotor ist grau unterlegt, die Restriktionsschnittstellen sind kursiv und unterstrichen. HBT, HBT-Promotor; polyAnos, nos Polyadenylierungssignal.

### 8.1.11 pHBT-BZI-1-ΔN

Restsequenz: pHBT

*KpnI* *NotI*  
HBT-AGGTACCTCCACTTCATCTCCCCCCAGCCACCTACA**ATG**//--BZI-1-ΔN--//GCG  
GCCGCCCGGCTGCAG- polyAnos

**Abbildung 8.11** Darstellung wichtiger Sequenzübergänge des Plasmids pHBT-BZI-1-ΔN. Der HBT-Promotor ist grau unterlegt, die Restriktionsschnittstellen sind kursiv und unterstrichen. HBT, HBT-Promotor; polyAnos, nos Polyadenylierungssignal.

### 8.1.12 pHBT-VP16-BZI-1

Restsequenz: pHBT

*KpnI* *NotI*  
HBT-AGGTACC**ATG**//--VP16-BZI-1--//GCGGCCGCCCGGCTGCAG- polyAnos

**Abbildung 8.12** Darstellung wichtiger Sequenzübergänge des Plasmids pHBT-VP16-BZI-1. Der HBT-Promotor ist grau unterlegt, die Restriktionsschnittstellen sind kursiv und unterstrichen. HBT, HBT-Promotor; polyAnos, nos Polyadenylierungssignal.

### 8.1.13 pTTL-GUS

Restsequenz: pUC19

*EcoRI* *SpeI*  
GGCCAGTGAATTCgagctcgggtacaactcccACTAGTCTTAGCAAGGCCTTTCCTCTATA  
TAAGGAAGTCATTTTCAATTTGGAGAAGATCCCCTAGTCTAGACTAGGGTAGGTCAGTCCCT  
**TATG**//--GUS/INT--// -polyA35S

**Abbildung 8.13** Darstellung des Plasmids pTTL-GUS mit wichtigen Sequenzübergängen. Die Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme sind unterstrichen und kursiv markiert. Das Startcodon des GUS/INT-Gens ist fett hervorgehoben. Die nach EcoRI und SpeI Spaltung durch G-Box, C-Box, Gm-Box, bzw. Cm-Box Oligonukleotide ersetzte Sequenz ist in Kleinbuchstaben dargestellt. GUS/INT, β-Glucuronidasegen mit Intron; polyA35S, 35S Polyadenylierungssignal.

### 8.1.14 pGEM-TRX

Restsequenz: pGEM-T

```
~~~~~0-Extension~~~~~  
gggatTACTG GTCTCGTATA CTGCGTACCC GAGAAACTAA AGTTAAGGGC  
TTGTTTGGTT GTTTGAGTTA TTTTGCTTCT AAGAACTTTG TGAGAAATGG  
CTGCTAACGA TGCTACTTCA TCCGAGGAGG GACAAGTGTT CGGCTGCCAC  
AAGGTTGAGG AATGGAACGA GACTTCAAG AAAGGCGTTG AGACTAAGAA  
~~~~~Eu29~~~~~  
ACTGGTGGTG CTCGGTCAGG ACTCATAatc act
```

**Abbildung 8.14** Darstellung der Sequenzübergänge und Primerbindestellen im Plasmid pGEM-TRX. Die zu dem *Thioredoxin (TRX)* Gen homologe Sequenz ist grau unterlegt. Die Sequenzanteile des pGEM-T Plasmids sind in Kleinbuchstaben angegeben.

### 8.1.15 pGEM-SKP1-like

Restsequenz: pGEM-T

```
~~~~~Eu35~~~~~  
gggatTATGA GTCCTGACCG AGGACGACTG CGCCGACACC AGCATCCCTT  
TACCTAACGT GACGAGCAAG ATCTTAGCTA AGGTGATTGA GTACTGCAAG  
CGCCACGTGG ACGCCACCTC TAAGACGGAA GTTAAGGCTG TCGGGTACGC  
~~~~~  
0-Extension~~~~~  
AGTCTACGAG ACCAGTAatc act
```

**Abbildung 8.15** Darstellung der Sequenzübergänge und Primerbindestellen im Plasmid pGEM-SKP-1-like. Die zu dem *SKP-1-like*-Gen homologe Sequenz ist grau unterlegt. Die Sequenzanteile des pGEM-T-Plasmids sind in Kleinbuchstaben angegeben.

## 8.2 Abkürzungen

4-MU	4-Methylumbelliferyl
4-MUG	4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Glucuronid
6-BAP	6-Benzylaminopurin
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>A.m.</i>	<i>Antirrhinum majus</i>
<i>A.t.</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Amp <sup>(r)</sup>	Ampicillin (resistent)
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	bidestilliert
BIS	N,N'-Methylenbisacrylamid
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
bZIP	basische Region und Leucin-Zipper-Domäne
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaMV	Blumenkohlmosaikvirus (Cauliflower Mosaic Virus)
cDNA	komplementäre DNA
CHS	Chalcon Synthase
cv.	Kultivar
d.h.	das heißt
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	Elektrophoretic Mobility Shift Assay
<i>et al.</i>	und andere (et alii)
EtBr	Ethidiumbromid
<i>G.m.</i>	<i>Glycine max</i>
GUS	$\beta$ -Glucuronidase
<i>H.v.</i>	<i>Hordeum vulgare</i>
HR	Hypersensitive Response
Hyg <sup>(r)</sup>	Hygromycin (resistent)
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
kb	kilo Basen(paare)
Km <sup>(r)</sup>	Kanamycin (resistent)
mcs	multiple cloning site
mRNA	messenger RNA
<i>N.t.</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
NAA	$\alpha$ -Naphthalinessigsäure
NLS	Kernlokalisierungssignal (nuclear localization signal)
<i>nos</i>	Nopalinsynthase
<i>O.s.</i>	<i>Oryza sativa</i>
<i>ocs</i>	Octopinsynthase
OD	optische Dichte

<i>P. syringae</i> pv. pisi	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. pisi
<i>P.c.</i>	<i>Petroselinum crispum</i>
pA oder polyA	Polyadenylierungssignal
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAL	Phenylalanin Ammonium Lyase
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
pv.	Pathovar
PVDF	Polyvinylendifluorid
RFDD	Restriction Fragment Differential Display
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
SA	Salizylsäure
SAR	Systemic Acquired Resistance
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodiumdodecylsulfate)
Sm <sup>(r)</sup>	Streptomycin (resistent)
SNN	<i>N.t.</i> cv Samsun NN
SSC	Standard Saline Citrat Puffer
<i>T.a.</i>	<i>Triticum aestivum</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris buffered saline
Tc	Chlor-Tetracyclin
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetraethylethylendiamin
TetR	Tetracyclin Repressor von <i>Tn</i> 10
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TMV	Tabakmosaikvirus
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u.a.	unter anderem
uORF	upstream open reading frame (offenes Leseraster im 5'-UTR)
UTR	untranslatierte Region
v/v	Volumenprozent (volume per volume)
Vol.	Volumen
VP16	<i>Herpes Simplex</i> Virion Protein 16 (Aktivierungsdomäne)
w/v	Gewichtsprozent (weight per volume)
Wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel
<i>Z.m.</i>	<i>Zea mays</i>

### 8.3 Präfixe

k	kilo (10 <sup>3</sup> )
m	milli (10 <sup>-3</sup> )
μ	mikro (10 <sup>-6</sup> )
n	nano (10 <sup>-9</sup> )
p	pico (10 <sup>-12</sup> )

## 8.4 Einheiten

$\Omega$	Ohm
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
Ci	Curie
D	Dalton
F	Farad
g	Gramm, Erdbeschleunigung
h	Stunde
l	Liter
m	Meter
M	Molar
min	Minute
s	Sekunde
U	definierte Einheit der Enzymaktivität (unit)
V	Volt

## 8.5 Nukleotide

A	Adenosin
C	Cytosin
G	Guanosin
K	Guanosin oder Thymin
M	Adenosin oder Cytosin
R	Guanosin oder Adenosin
S	Cytosin oder Guanosin
T	Thymin
U	Uracil

## 8.6 Aminosäuren

A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin



## Curriculum vitae

Thorsten Heinekamp

- 09/05/1969 geboren in Hamm, deutsche Staatsangehörigkeit
- 1979 – 1988 Gymnasium Hammonense, Hamm,  
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife
- 08/1988 – 01/1991 Berufsausbildung bei der Schering AG, Bergkamen  
Abschlußprüfung: Industriekaufmann
- 10/1991 – 01/1998 Biologiestudium an der Universität Bielefeld,  
Abschluß: Diplom
- 09/1996 – 01/1998 Diplomarbeit mit dem Titel "Funktionelle Analyse des  
pflanzlichen bZIP-Transkriptionsfaktors G/HBF-1"
- 04/1998 Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden  
Dissertation am Albrecht-von-Haller-Institut für  
Pflanzenwissenschaften, Abteilung "Allgemeine und  
Entwicklungsphysiologie der Pflanze"

Thorsten Heinekamp

Göttingen, 11/03/2002