

**Analyse des Transkriptionsfaktors
TGA2.1 aus *Nicotiana tabacum***

Dissertation

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

vorgelegt von
Carsten Kegler
aus Bremen

Göttingen, 2001

D7

Referent: Prof. Dr. C. Gatz

Korreferent: Prof. Dr. R. Tischner

Tag der mündlichen Prüfung:

1	EINLEITUNG	1
1.1	TGA-Faktoren, eine Klasse von bZIP-Transkriptionsfaktoren	1
1.2	' <i>Activation Sequence-1</i> '	2
1.3	<i>as-1</i> -Elemente in Promotoren pflanzlicher Gene	5
1.4	'Activating Sequence Factor 1' (ASF-1)	7
1.5	Fragestellung	10
2	MATERIAL	11
2.1	Organismen	11
2.1.1	Pflanzenausgangsmaterial	11
2.1.2	Transgene Tabakpflanzen	11
2.1.3	Bakterienstämme	12
2.2	Nukleinsäuren	12
2.2.1	Plasmide	12
2.2.2	Primer	14
2.2.3	DNA-Sonden	15
2.3	Radiochemikalien	15
2.4	Antikörper	15
2.5	Proteinstandard	16
2.6	Nährmedien und Zusätze	16
2.6.1	Pflanzenmedien	16
2.6.2	Bakterienmedien	17
2.6.3	Antibiotika und andere Zusätze	17
2.7	Puffer und Lösungen	18
2.8	Geräte, Verbrauchsmittel, Chemikalien	20
2.8.1	Geräte	20
2.8.2	Verbrauchsmittel	21
2.8.3	Chemikalien	22
2.9	Enzyme und Kits	23
2.9.1	Enzyme	23
2.9.2	Kits	24
2.10	DNA-Fragmente für EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)	24
3	METHODEN	26

3.1	Pflanzenanzucht	26
3.2	Anzucht und Lagerung von <i>Escherichia coli</i> und <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	26
3.3	Transformation von <i>E. coli</i>, <i>A. tumefaciens</i> und <i>N. tabacum</i>	27
3.3.1	Transformation gefrierkompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	27
3.3.2	Transformation elektroporationskompetenter <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -Zellen	27
3.3.3	Transformation von <i>Nicotiana tabacum</i>	28
3.4	Isolierung, Reinigung, Darstellung und Quantifizierung von Nucleinsäuren	29
3.4.1	Präparation von Plasmid-DNA	29
3.4.1.1	Präparation von Plasmid-DNA für die Sequenzierung	29
3.4.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA in analytischen Mengen (Mini-Präparation) durch modifizierte alkalische Lyse	29
3.4.1.3	Isolierung von Plasmid-DNA in präparativen Mengen	29
3.4.1.4	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>N. tabacum</i>	30
3.4.1.5	Isolierung von polyA-RNA	30
3.4.2	Fällung von DNA aus wässrigen Lösungen	30
3.4.3	Quantifizierung von Nucleinsäuren	30
3.4.4	Agarose-DNA-Gelelektrophorese	31
3.4.5	Auftrennung von DNA in Polyacrylamid-Gelen	31
3.4.6	Denaturierende RNA-Gelelektrophorese	31
3.5	Enzymatische Manipulationen an DNA	32
3.5.1	DNA-Spaltungen mit Restriktionsendonukleasen	32
3.5.2	Dephosphorylierung von DNA-Enden	32
3.5.3	Ligationen von DNA-Fragmenten	32
3.5.4	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	32
3.6	Polymerasekettenreaktion PCR	33
3.7	<i>in vitro</i>-Translation	33
3.8	³²P-Markierung von DNA-Fragmenten	34
3.8.1	Radioaktive Markierung der 5'-Enden von Gelshiftsonden	34
3.8.2	Radioaktive Markierung mit der "Random-Prime-Labeling" Methode	35
3.9	Northern Blot	35
3.9.1	Transfer der RNA	35
3.9.2	Hybridisierung der Northern-Blots	36
3.9.3	Rehybridisierung der Blots	36
3.10	Gesamtzellextrakte	37
3.10.1	FixProt: Methode zur schnellen Extraktion von Gesamtzellproteinen	37
3.10.2	Denaturierender Aufschluss	37
3.11	Kernproteinextrakte	37
3.11.1	Denaturierte Zellkernextrakte	38
3.11.2	Native Zellkernextrakte	38
3.12	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen	38
3.12.1	Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen	39

3.13	Bestimmung von Proteinkonzentrationen / Proteinabgleich	39
3.13.1	Bestimmung nach Bradford (1976)	39
3.13.2	Proteinabgleich über Coomassiegele	39
3.14	Affinitätsaufreinigung der Antiseren	40
3.15	Immunochemischer Nachweis von Proteinen	40
3.15.1	Transfer von Proteinen auf Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membranen	40
3.15.2	Immunochemische Detektion transferierter Proteine im Western-Blot	41
3.16	Gelshift/'Electrophoretic mobility shift assay' (EMSA)	41
3.16.1	Quantifizierung von EMSA-Daten	42
3.17	Induktion von Tabakblättern	43
4	ERGEBNISSE	44
4.1	Klonierung der TGA2.1-Derivate	44
4.2	Charakterisierung der transgenen Pflanzen	51
4.3	Weiterentwicklung des Protokolls zur Isolierung von Zellkernen aus <i>N. tabacum</i>	52
4.4	Akkumulation von TGA-Faktoren in den Zellkernen transgener Pflanzen	55
4.5	Gelshiftanalyse	57
4.5.1	Vorarbeiten zur EMSA	57
4.5.2	EMSA der transgenen Pflanzen im Vergleich zum w.t.	60
4.5.3	Quantitative Auswertung der EMSA	63
4.6	SA-Induktion: Untersuchungen von Zellkernproteinextrakten	66
4.7	Das transkriptionale Aktivierungspotential von TGA-Faktoren in Induktionsversuchen	67
4.7.1	Der Einfluss von TGA-Faktoren auf <i>Nt103</i> bei Salizylsäure-Induktionsversuchen	68
4.7.2	Der Einfluss von TGA-Faktoren auf <i>Nt103</i> bei Methyljasmonatgabe	72
4.7.3	Der Einfluss von TGA-Faktoren auf <i>Nt103</i> bei 2,4-D Induktionsversuchen	75
4.7.4	Der Einfluss von TGA-Faktoren auf <i>IEGT</i> , <i>parA</i> und <i>PR1a</i> bei MeJA-, SA- und 2,4-D-Induktionsversuchen	77
5	DISKUSSION	78
5.1	Erstellung und Charakterisierung transgener Pflanzen	78
5.2	Protokolle zur Anreicherung von TGA-Faktoren	78
5.3	Gelshift	81
5.4	Wirkung der Änderung der TGA-Faktoren-Konzentration auf Zielgene	83
5.4.1	TGA2.1-Überexpression moduliert die <i>Nt103</i> -Expression	84

5.4.2	Transdominante Suppression von TGA2.1 moduliert die <i>Nt103</i> -Expression, nicht aber die Expression von anderen Zielgenen	87
5.4.3	Unterschiedliche Wirkung von TGA2.1- und TGA2.2-Überexpression auf Zielgene	89
5.5	Abschließende Bemerkungen	90
6	ZUSAMMENFASSUNG	93
7	LITERATURVERZEICHNIS	94
8	ANHANG	94
8.1	Abkürzungen	103
8.2	Danksagung	106
8.3	Erklärung	108
8.4	Lebenslauf/Curriculum vitae	109

When They Cry....

When they cry: 'Man overboard'
An ocean liner, huge, like a house,
Stops suddenly
And they try to catch the man with ropes.

But when the soul of a man is overboard,
When he is choking from horror
from despair.
Even his own house On some fine building's silhouette.
does not stop and sails on.

by Sergey Chudakov

I Don't Enclose....

I don't enclose the universe in my grasp.
No matter how I grieve or jest,
I am confined in an obscure droplet.
To a different droplet there is no path.

by Vladimir Shchirovsky

What I Really Wanted...

What I really wanted
Was cities in the night
And clouds that rolled across the sky
And a shadow over the earth.

A park still looming faintly green
Through the dusk beyond the railings
And only a spire touched with light

...

And for a whole range of reasons
Of love that grabbed me with sadness
I would have wanted greater proofs
Than those that were to hand.

by Aleksandr Kushner

'I mind how I said to you once that there is a price being good the same as for being bad; a cost to pay. And it's the good men that cant deny the bill when it comes around. They cant deny it for the reason that there aint any way to make them pay it, like a honest man that gambles. The bad men can deny it; that's why don't anybody expect them to pay on sight or any other time. But the good cant. Maybe it takes longer to pay for being good than for being bad. And it wont be like you haven't done it before, haven't already paid a bill like it once before...'

'With all air, all heaven, filled with the lost and unheeded crying of all the living who ever lived, wailing still like lost children among the cold and terrible stars. ...I wanted so little. I asked sol little. It would seem...'

by William Faulkner 'Light in August'

'There is a limit to what a child can accept, assimilate; not to what it can believe because a child can believe anything, given time, but to what it can accept, a limit in time, in the very time which nourishes the believing of the incredible.'

by William Faulkner 'The Unvanquished'

1 Einleitung

Pflanzliche Entwicklung basiert auf differenzieller Genexpression, die durch Transkriptionsfaktoren reguliert und moduliert wird. Exogene biotische und abiotische Stimuli aktivieren darüber hinaus in der Pflanze Signalketten, die in einer Änderung der Genexpressionsmuster münden. Ein Pathogenangriff stellt einen typischen biotischen Einfluss dar und hat die Aktivierung von Gruppen von Genen zur Folge. Salizylsäure (SA) spielt dabei als Signalmolekül eine Schlüsselrolle in der Weiterleitung des Signals des Pathogenangriffs zur Transkriptionsmaschinerie. Die Reaktion auf abiotische Faktoren ist für den Organismus Pflanze ebenfalls lebenswichtig. So werden z.B. viele Gene der Photosynthese erst in Reaktion auf Licht exprimiert.

1.1 TGA-Faktoren, eine Klasse von bZIP-Transkriptionsfaktoren

Die TGA-Transkriptionsfaktoren gehören zur Familie der bZIP-Proteine (sogenannte 'basic-zipper'). Die Zuordnung zu dieser Familie gründet sich auf das Vorkommen von zwei Subdomänen. Beim Leucin-Zipper, der einen Subdomäne, findet man Leucinreste in einem Abstand von 7 Aminosäuren in einer α -Helix. Dieses Motiv erlaubt die Aneinanderlagerung zweier solcher bZIP-Proteine in einer sogenannten 'coiled-coiled'-Struktur, die durch die intermolekulare Wechselwirkung der Leucinreste vermittelt wird (Landschulz et al., 1988; Vinson et al., 1989). Dem sogenannten 'leucine-zipper' geht ohne Ausnahme eine basische Domäne voraus, die immer die DNA-Bindung vermittelt (siehe auch Abb. 1.1; 'scissor-grip model': O'Shea et al., 1991; Vinson et al., 1989). Voraussetzung für eine Bindung an DNA ist dabei die Dimerisierung zweier bZIP-Proteine. Im gebundenen Zustand liegen die basische Domäne und die Leucin-Zipper-Domäne als ununterbrochene α -Helix vor (Ellenberger et al., 1992).

In der Abb. 1.1 ist der typische Aufbau eines TGA-bZIP-Proteins schematisch am Beispiel des TGA1a dargestellt. Die TGA-Faktoren stellen eine pflanzenspezifische Klasse der bZIP-Proteine dar. Die TGA-Transkriptionsfaktoren besitzen lediglich drei Leucinwiederholungen. Für die Aneinanderlagerung zweier bZIP-Proteine als notwendige Voraussetzung einer Bindung an DNA ist dieser verkürzte 'leucine-zipper' alleine nicht ausreichend. Bei dieser Klasse der bZIP-Proteine findet man jedoch eine Dimerisierungsstabilisierungsdomäne, die im C-Terminus lokalisiert ist (Johnson et al., 2001; Katagiri et al., 1992). Die basische

Domäne dieser Klasse ist zwischen monocotylen und dicotylen Pflanzen vollständig konserviert.

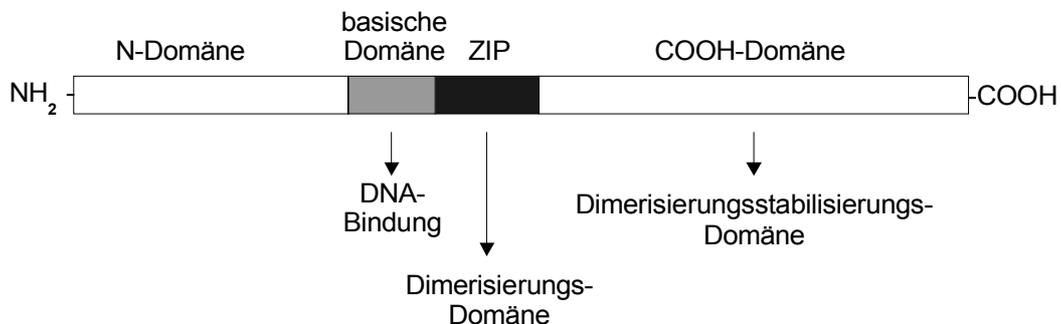


Abb. 1.1: Domänenstruktur des bZIP-Transkriptionsfaktors TGA1a aus *Nicotiana tabacum*. Die basische Domäne, N-, C-Terminus und die Region des Leucin-Zippers (ZIP) sind entsprechend gekennzeichnet. Unterhalb der schematischen Darstellung befinden sich die Funktionen der einzelnen Domänen.

Von *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) sind bisher sieben TGA-Faktoren veröffentlicht worden (TGA1, TGA2, TGA3, TGA4, TGA5, TGA6 und Perianthia; Chuang et al., 1999; Kawata et al., 1992; Miao et al., 1994; Schindler et al., 1992; Xiang et al., 1995; Xiang et al., 1997; Zhang et al., 1993). Bei der Analyse der veröffentlichten genomischen Sequenz von *A. thaliana* konnten drei weitere Angehörige dieser Klasse identifiziert werden, zu denen auch ESTs vorliegen (REGIA-Projekt, W. Dröge-Laser persönliche Mitteilung). In *Nicotiana tabacum* (*N. tabacum*) konnten bisher fünf TGA-Faktoren isoliert werden (TGA1a, Katagiri et al., 1989; PG13, Fromm et al., 1991; TGA2.1 und TGA2.2, Niggeweg und Gatz, 1997; Niggeweg et al., 2000b; TGA7, A. Schiermeyer, persönliche Mitteilung). Entsprechend der Aminosäurehomologie werden die Transkriptionsfaktoren in vier Subklassen eingeteilt (Xiang et al., 1997). Zu der Subklasse I zählten TGA1a, PG13, TGA1 und TGA4, zu der Subklasse II TGA2.1, TGA2.2, TGA2, TGA5, TGA6 und Perianthia, während TGA3 die Subklasse III ausmacht und TGA7 eine weitere eigenständige Klasse darstellt.

1.2 'Activation Sequence-1'

Das *cis*-Element 'activation sequence-1' (*as-1*), an das die TGA-Faktoren binden (u. a. Katagiri et al., 1989; Niggeweg, 1999; Schindler et al., 1992), wurde aus dem 35S-Promotor des Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) isoliert und funktionell beschrieben (Benfey et al., 1989). Während der CaMV35S-Promotor konstitutiv in fast allen Geweben der Pflanze nachgeschaltete Reportergene aktiviert (Benfey und Chua, 1990; Odell et al., 1985), vermittelt das isolierte *as-1*-Element konstitutiv Reportergenaktivität in Wurzelspitzen (Benfey und

Chua, 1990; Benfey et al., 1989; Fromm et al., 1989). Analoge *cis*-Elemente wurden später ebenso in Promotoren von Genen des pflanzenpathogenen Bakteriums *Agrobacterium tumefaciens* (Feltkamp et al., 1994; Fromm et al., 1989; Lam et al., 1990) sowie in pflanzlichen Promotoren gefunden (siehe weiter unten) und werden als *as-I*-ähnliche Elemente bezeichnet. Im Rahmen dieser Arbeit werden alle *cis*-Elemente dieser Klasse als *as-I*-Element bezeichnet. Die Konsensussequenz des *as-I*-Elementes besteht aus zwei TGACG-Motiven, deren Achsenabstand genau 12 bp beträgt (siehe Abb. 1.2). Der Abstand der beiden TGACG-Sequenzblöcke ist essentiell für die Funktion des *cis*-Elementes (Ellis et al., 1993; Krawczyk, 1999). Bisher charakterisierte *as-I*-Elemente und die daraus abgeleitete Konsensussequenz sind aus der Abb. 1.2 zu entnehmen.

Neben der Vermittlung von Promotoraktivität in Wurzelspitzen zeigten Versuche mit den isolierten *as-I*-Elementen aus dem CaMV35S-, dem *ocs*-, dem *nos*- und weiteren Genen fusioniert an einen Minimalpromotor mit Reporter gen, dass dieses *cis*-Element die Transkriptionsaktivierung in Reaktion auf die Stimuli SA und Auxin bewirkt (Guevara-Garcia et al., 1998; Kim et al., 1993b; Liu und Lam, 1994; Qin et al., 1994; Ulmasov et al., 1994; van der Zaal et al., 1996; Zhang und Singh, 1994). Im Gegensatz zu Wurzelgewebe, in dem das *as-I*-Element eine Grundaktivität des Promotors vermittelt, ist die Aktivität des Reporter gens in Tabakblättern im uninduzierten Zustand nicht detektierbar (Liu und Lam, 1994; Qin et al., 1994). Bei Induktionsexperimenten mit *as-I*-Reporter genkonstrukten in Tabaksuspensionskulturen (BY2-Zellen) und mit Protoplasten von *Daucus carota* wurde die *as-I*-Aktivität des Promotors auch durch physiologisch inaktive Auxin-Analoga ausgelöst (Pascuzzi et al., 1998; Ulmasov et al., 1994; van der Zaal et al., 1996).

A)	erste	zweite	Halbseite
	1234 5678	1234 5678	Position
<i>CaMV35S</i>	<u>TGAC/GTAAGG</u>	GATGAC/GCAC	
<i>nos</i>	<u>TGAG/CTAAGC</u>	ACATAC/GTCA	
<i>ocs</i>	<u>TGAC/GTCAGC</u>	GCTGAC/GTCA	
<i>mas1</i>	<u>TGAC/GTAAGT</u>	ATCCGA/GTCA	
<i>mas2</i>	<u>TGAC/GCTCGC</u>	GG <u>TGAC/GCCA</u>	
<i>GNT35</i>	<u>TTAG/CTAAGT</u>	GCTTAC/GTAT	
<i>Nt103</i>	<u>ATAG/CTAAGT</u>	GCTTAC/GTAT	
<i>parA</i>	<u>TTAC/GCAAGC</u>	AATGAC/ATCT	
<i>Gmhsp26A</i>	<u>TGAT/GTAAGA</u>	GAT <u>TAC/GTAA</u>	
<i>gst6 Arabidopsis</i>	TTAT/GTCATT	GATGAC/GACC-3'	
	<u>AATA/CAGTAA</u>	CTACTG/CTGG-5'	
<i>PR1a</i>	C/GTCATCGAG	ATGAC/GGCC-3'	
	<u>G/CAGTAGCTC</u>	TACTG/CCGG-5'	

B) Konsensussequenz

erste Halbseite

Position	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
Nukleotid	T	G/T	A	C/G	G/C	T	A	A
Anteil	0.89	1.0	1.0	0.89	1.0	0.78	0.78	0.89

zweite Halbseite

Position	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
Nukleotid	T	G/T	A	C	G	T	C/A	A/C/T
Anteil	0.82	0.91	0.91	0.91	0.91	0.64	1.0	1.0

Abb. 1.2: Sequenzen von as-1-Elementen. In Teil A) der Abb. sind die Sequenzen beschriebener as-1-Elemente dargestellt. Die Achsen der Halbseiten sind durch einen Bruchstrich angezeigt. Die Kernsequenz der Halbseiten ist durch Fettdruck hervorgehoben. Im Falle der as-1-Sequenzen aus *PR1a* und *gst6* ist die erste Halbseite anders orientiert (blau hervorgehoben). Palindromische Elemente der Halbseiten sind durch Unterstreichung gekennzeichnet. In Teil B) der Abb. findet sich eine tabellarische Darstellung der Konsensussequenz gebildet aus den in Teil A) gezeigten Sequenzen. Die Halbseiten in anderer Orientierung wurden bei der Konsensussequenz nicht berücksichtigt. Die Sequenzen wurden entnommen: *CaMV35S* (Lam et al., 1989), *ocs*, *nos* (Bouchez et al., 1989), *mas 1 + 2* (Feltkamp et al., 1994), *GNT35*, *Nt103* (van der Zaal et al., 1991), *parA* (Sakai et al., 1998), *Gmhsp26A* (Ellis et al., 1993), *gst6 Arabidopsis* (Chen et al., 1996) und *PR1a* (Strompen et al., 1998).

1.3 *as-1*-Elemente in Promotoren pflanzlicher Gene

Das *as-1*-Element wurde ebenfalls als Bestandteil von pflanzlichen Promotoren beschrieben. Hierzu gehört in *N. tabacum* *Nt103* (eine Glutathion S-Transferase = GST, van der Zaal et al., 1991; van der Zaal et al., 1987), *parA* ('*protoplast auxin-regulated*', Takahashi et al., 1989), *IEGT* ('*immediate early-induced glucosyltransferase*', eine Flavonoid-Glucosyltransferase, Horvath und Chua, 1996) und *PR1a* ('*pathogen related 1a*', Cornelissen et al., 1987; Ohshima et al., 1987).

Das Gen *Nt103* zählt zu einer Familie von Genen, die nach Zugabe von Auxin aus Tabakzellkulturen (BY2-Zellen) isoliert wurden. Für das Genprodukt von *Nt103* wurde eine enzymatische *in vitro*-GST-Aktivität mit dem Modellsubstrat 1-Chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) nachgewiesen (Droog et al., 1993). GST-Enzyme katalysieren dabei die Konjugation von Glutathion an das Modellsubstrat CDNB. In ihrer physiologischen Funktion sind GST's dazu in der Lage, eine ganze Reihe von Substraten zu erkennen, bei denen es sich immer um elektrophile Stoffe handelt, die durch die Konjugationsreaktion wasserlöslicher werden (Edwards et al., 2000; Marrs, 1996). Bei diesen Substraten handelt es sich oftmals um xenobiotische Substanzen. *Nt103*-Promotor-Reporterfusionen zeigen in Tabakpflanzen eine Expression ausschließlich in Wurzelspitzen. Bei Deletionsanalysen wurde das *as-1*-Element im *Nt103*-Promotor als *cis*-Element identifiziert, welches sowohl die Auxin- als auch die SA-Responsivität des Promotors vermittelt (Droog et al., 1995b). Die *Nt103*-Induktion durch xenobiotische Substanzen konnte nur in Tabaksuspensionskulturen gezeigt werden (van der Zaal et al., 1996). Im Tabakblattgewebe kommt es nicht zu einer xenobiotischen Induktion (Niggeweg, 1999).

Auch bei *parA* handelt es sich um ein durch Auxin und SA induzierbares Gen, dessen cDNA aus Tabakmesophyllzellen isoliert wurde (Niggeweg, 1999; Takahashi et al., 1989). Ein *as-1*-Element wurde in dem *parA*-Promotor identifiziert (Kusaba et al., 1996; Sakai et al., 1998; Takahashi et al., 1990). Wie beim *Nt103*-Genprodukt handelt es sich bei dem ParA um ein GST der Klasse III (Droog et al., 1995a; Marrs, 1996). Die GST-Nomenklatur wurde erweitert und die Klasse III der GST's wird inzwischen auch als die Tau-Klasse bezeichnet (Edwards et al., 2000). Im Gegensatz zum GST von *Nt103* wurde bisher für ParA nur eine sehr schwache GST-Aktivität nachgewiesen (Droog et al., 1993; Takahashi et al., 1995) und die Lokalisation von ParA im Nukleus deutet auf eine andere Funktion hin als bei der cytoplasmatisch lokalisierten GST des *Nt103*-Gens (Takahashi et al., 1995). Es wurde darauf hingewiesen, dass ParA möglicherweise eine analoge Rolle spielen könnte zu GST's aus dem

Reich der Säugetiere. Diese detoxifizieren cytotoxische Abbauprodukte der DNA, welche bei oxidativem Stress entstehen (Berhane et al., 1994; Marrs, 1996). Beim Pathogenbefall kommt es durch die Pflanze zu einer Produktion von 'reactive oxygen species' (ROS), denen im sogenannten 'oxidativ burst' eine Rolle bei der Pathogenabwehr zukommt (Baker und Orlandi, 1995; Sutherland, 1991). Durch Überexpression einer GST/Glutathion Peroxidase konnte z.B. der schädigende Effekt von ROS drastisch gesenkt werden (Roxas et al., 2000).

Das aus Tabaksuspensionskulturen (BY2-Zellen) isolierte Gen *IEGT* kodiert für eine Flavonoid-Glucosyltransferase und ist SA- und Auxin-induzierbar (Horvath und Chua, 1996). Die SA-Transkriptionskinetik der Gene *Nt103*, *parA* und *IEGT* entspricht der 'immediate early kinetics' (Qin et al., 1994; Xiang et al., 1996). Bei diesen Genen führt SA zu einer schnellen und 'transienten' Induktion, die unabhängig von der Proteinneusynthese ist (Horvath und Chua, 1996; Qin et al., 1994). Wie die Glutathion S-Transferasen spielen auch Glucosyltransferasen u. a. eine Rolle bei der Detoxifizierung von xenobiotischen Substanzen. Genauso wie GST's übertragen Glucosyltransferasen eine funktionelle Gruppe (einen Zucker) auf toxische Substanzen und machen sie somit wasserlöslicher und meist weniger toxisch (Marrs, 1996). Die hohe Sequenzhomologie von *IEGT* zum aus der Tomate stammenden Gen *twil* (Truesdale et al., 1996), bei welchem es sich um ein verwundungsinduzierbares Gen handelt, ordnet *IEGT* wiederum in den Kontext von Pflanzen-Pathogen-/Verwundungsstress ein.

Ein weiteres pflanzliches Gen mit einem *as-1*-Element ist *PR1a*. Dieses Gen lässt sich im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen ausschließlich durch SA induzieren. Durch Promotordeletions-Konstrukte konnte die Rolle des *as-1*-Elementes bei der SA-Induktion im *PR1a*-Promotor funktionell definiert werden (Strompen et al., 1998). Aufgrund der Induktionskinetik in SA-Experimenten wird es als 'spätes Gen' ('late gene') klassifiziert (Qin et al., 1994). Bei diesen 'späten Genen' setzt die Transkriptionsaktivierung erst nach 7 bis 12 h ein, folglich in einem Zeitrahmen, in dem die 'frühen Gene' bereits nicht mehr transkribiert werden. Durch die Überexpression von *PR1a* in Tabak konnte eine erhöhte Infektionstoleranz gegenüber oomycetischen Pathogenen erreicht werden (Alexander et al., 1993). Das *as-1*-Element von *PR1a* hebt sich hinsichtlich seiner Eigenschaften und in Bezug auf seine Rolle bei der SA-Induktion sowohl von den frühen Genen als auch dem isolierten *as-1*-Element ab. Zunächst ist der Abstand der beiden Halbseiten des *cis*-Elementes um 2 Basenpaare erweitert und die beiden TGACG-Motive befinden sich auf unterschiedlichen Strängen, sind also entgegengesetzt orientiert. Des Weiteren ist die Transkriptionsaktivierung der späten Gene strikt abhängig von einer Proteinneusynthese (Horvath und Chua, 1996; Qin et al., 1994).

Zusammengenommen stützen diese Daten die Annahme, dass der Wirkmechanismus der Aktivierung über das *as-1*-Element bei späten Genen sich unterscheidet von dem der frühen Gene.

1.4 'Activating Sequence Factor 1' (ASF-1)

Ein an das *as-1*-Element bindender Proteinkomplex aus Tabakblattkernextrakten wurde erstmalig 1989 beschrieben und als 'activating sequence factor 1' (ASF-1) bezeichnet (Katagiri et al., 1989; Lam et al., 1990). Ein weiterer korrespondierender *as-1*-bindender Proteinkomplex aus Tabakblattextrakten wurde 1996 identifiziert und als 'salicylic acid response protein' (SARP) benannt (Jupin und Chua, 1996).

Im 'electrophoretic mobility shift assay' (EMSA) mit dem *as-1*-Element sind sowohl bei ASF-1 wie auch SARP zwei retardierte Banden sichtbar, die der einfachen Besetzung (höhere Mobilität) bzw. der Doppelbesetzung (geringere Mobilität) der beiden Halbseiten des *cis*-Elementes entsprechen (Abb. 1.3). Mit Hilfe von Antikörpern (AK), die Epitope im N-Terminus der TGA-Faktoren erkennen, kann der bereits retardierte Anteil im EMSA weiter in seinem Laufverhalten verzögert werden, dies entspricht dem sogenannten 'Supershift'. Mit dieser Methode konnte gezeigt werden, dass TGA-Faktoren Bestandteil der Komplexe in *A. thaliana* und *N. tabacum* sind (Lam und Lam, 1995; Niggeweg, 1999). Die Beteiligung von weiteren Proteinen am Komplex konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigten transgene Pflanzen, die mutierte und somit bindeinaktive TGA-Faktoren exprimierten, eine deutliche Reduktion der ASF-1/SARP-Aktivität (Miao und Lam, 1995; Niggeweg, 1999). Dieser experimentelle Ansatz nutzt aus, dass bZIP-Proteine nur als Dimer an DNA binden können. Enthält das Dimer ein Protein, welches aufgrund einer Mutation nicht an DNA binden kann, so wird der Dimerisierungspartner ebenfalls aus der DNA-bindenden Fraktion gezogen (transdominante Suppression).

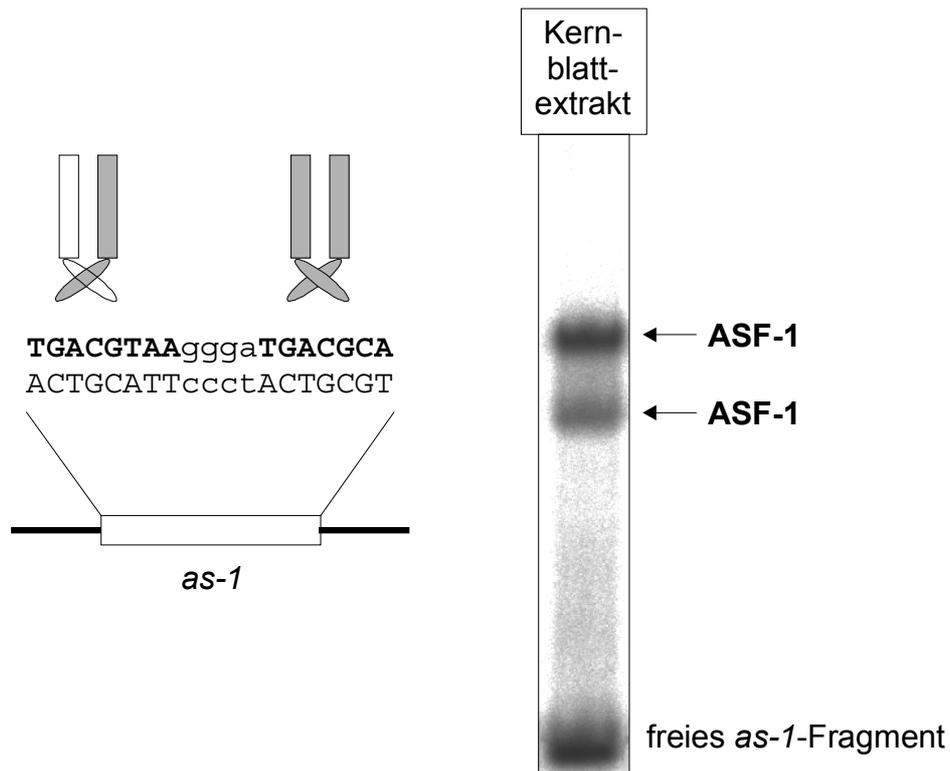


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des Proteinkomplexes ASF-1/SARP. Rechts: ein Homodimer und ein Heterodimer besetzen die beiden Halbhälften des *as-1*-Elementes. Links: der Nachweis von ASF-1 mittels 'electrophoretic mobility shift assay' (EMSA) in Kernproteinextrakten mit einem radioaktiv markierten *as-1*-DNA-Fragment.

Die Mobilität des ASF-1 und des SARP ist im EMSA identisch. In Tabak konnte im Blattgewebe gezeigt werden, dass sich beide Komplexe im EMSA mit AK gegen TGA2.1 und TGA2.2 retardieren lassen (Niggeweg et al., 2000a). Der einzige Unterschied zwischen den beiden Komplexen besteht in den jeweiligen Anteilen der beteiligten Faktoren. Ein Antikörper (AK) gegen den TGA2.1-N-Terminus vermochte im EMSA 20% des SARP und 10% des ASF-1-Komplexes zu retardieren (Niggeweg et al., 2000a), wobei nicht eindeutig geklärt werden konnte, ob es sich bei der retardierten Fraktion um TGA2.1 handelt oder um eine Kreuzreaktion des AK. In beiden Proteinkomplexen stellte TGA2.2 die Hauptkomponente dar. In *A. thaliana* wurde in Blattgewebe TGA2 als Bestandteil des ASF-1-Komplexes identifiziert (Lam und Lam, 1995). Die bisher charakterisierten Bestandteile des ASF-1/SARP gehören alle der Subklasse II an (siehe oben). Eine SA-abhängige Verstärkung der Bindeaktivität beider Proteinkomplexe im EMSA konnte gezeigt werden (Jupin und Chua, 1996; Stange et al., 1997).

TGA2.1 und TGA2.2 weisen über den bZIP und den C-Terminus eine Homologie von 87% auf (Niggeweg, 1999), unterscheiden sich aber im N-terminalen Teil. Der N-Terminus ist bei

TGA2.1 mit 170 Aminosäuren deutlich länger als bei TGA2.2 (44 Aminosäuren) und zeigt im Hefe-Zwei-Hybrid-System Transaktivierungspotential, das bei TGA2.2 nicht vorhanden ist. Das Transkript der TGA-Faktoren 2.1 und 2.2 ist in Blättern detektierbar und TGA2.2 wurde immunochemisch in diesem Gewebe nachgewiesen (Niggeweg, 1999). Bei TGA2.1 erkannte der AK eine Bande im Western-Blot, deren Molekulargewicht deutlich geringer war als das des rekombinant exprimierten Proteins. Wie im EMSA konnte nicht geklärt werden, ob es sich bei der retardierten Fraktion um eine deletierte Form von TGA2.1 handelt oder um eine immunochemische Kreuzreaktion.

Zur Beantwortung der Frage nach der Rolle von TGA2.2 im SARP-Komplex *in vivo* wurde in Tabak TGA2.2 überexprimiert (Niggeweg, 1999). Ein weiterer Satz an Tabakpflanzen exprimiert ein TGA2.2, das aufgrund einer Mutation in der basischen Domäne nicht an DNA binden konnte und somit bei den Dimerisierungspartnern ebenfalls die DNA-Interaktion unterband. Die Überexpression von TGA2.2 führte zu einer deutlichen Verstärkung des SARP-Komplexes in Tabakblattgewebe und die transdominante Suppression zu einer deutlichen Abschwächung der SARP-Aktivität (Niggeweg, 1999). Der ASF-1-Komplex wurde in den transgenen Pflanzen nicht untersucht. Der SARP-Anstieg korrelierte mit einer Verstärkung der Aktivierung der Transkription von pflanzlichen Promotoren, die ein *as-1*-Element enthalten, so wie die Herabsetzung der SARP-Aktivität zu einer Reduktion der Transkriptmengen in den ein *as-1*-Element tragenden Zielgenen führte (Niggeweg, 1999). Aufgrund der oben genannten Ergebnisse ist ASF-1/SARP aller Wahrscheinlichkeit nach für die Aktivierung der Transkription ausgehend von dem *as-1*-Element verantwortlich.

1.5 Fragestellung

Zur Aufklärung der spezifischen Rolle von TGA2.1 sollten transgene TGA2.1-Überexpressionspflanzen sowie TGA2.1-transdominante Suppressor-Linien erzeugt werden. Die subzelluläre Lokalisation der transgenen Proteine sollte durch Western-Blot-Analysen und DNA-Bindungsstudien untersucht werden. Weiterhin sollte die Auswirkung der veränderten TGA2.1-Mengen auf Zielgene nach Induktion mit Salizylsäure, Auxin und Methyljasmonat untersucht und die Ergebnisse mit denen analoger Experimente mit TGA2.2-Überexpressionspflanzen verglichen werden.

Komplementierend zu den Überexpressionspflanzen sollten transdominante Suppressorpflanzen mit einem in der DNA-Bindungsdomäne mutierten TGA2.1 erzeugt werden. Die analogen Experimente wie im Falle der TGA2.1-Überexpressionspflanzen sollten das Bild von der spezifischen Rolle von TGA2.1 ergänzen und im Zusammenhang mit den Ergebnissen aus bereits vorliegenden TGA2.2-Experimenten interpretiert werden.

Da in früheren Veröffentlichungen nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte, ob der SARP-Komplex neben TGA2.2 auch TGA2.1 enthält oder positive Nachweisreaktionen mit einer Kreuzreaktionen des Antikörpers zu erklären waren, und ob die im Western-Blot detektierte Bande somit als gekürzte Formen von TGA2.1 oder durch ein weiteres Protein zu interpretieren war, sollte die Zusammensetzung des SARP-Komplexes untersucht werden. Sollte sich herausstellen, dass es sich bei den nachgewiesenen Protein um TGA2.1 handelt, galt es zu klären, ob die Prozessierung des Proteins eine physiologische Relevanz hat oder ein Produkt des Zellaufschlusses ist. Im letzteren Fall sollten geeignetere Proteinextraktionsmethoden entwickelt werden. Ein Affinitätstag am C-Terminus von TGA2.1 sollte verwendet werden, um die absoluten Mengen des transgenen TGA2.1 mit denen des transgenen TGA2.2 zu vergleichen und um darüber hinaus die Lokalisation der möglichen Deletion von TGA2.1 zu klären. Da bei den vorliegenden transgenen TGA2.2-Pflanzen die Zellkernproteinfraktion nicht untersucht worden war, wurden diese in die Untersuchungen des ASF-1-Komplexes mit einbezogen.

2 Material

2.1 Organismen

2.1.1 Pflanzenausgangsmaterial

In dieser Arbeit wurden ausschließlich *N. tabacum*-Pflanzen des Kultivars SamsunNN (SNN) verwendet.

2.1.2 Transgene Tabakpflanzen

Pflanze	Wildtyp	Eigenschaften	Referenz
SNN 2.1traD	SNN	enthält die T-DNA Region von pBIN Hyg TX mit dem TGA2.1traD-Gen; Hyg ^R	diese Arbeit, siehe 4.1
SNN 2.1ΔN29	SNN	enthält die T-DNA Region von pBIN Hyg TX mit dem TGA2.1 ΔN29-Gen; Hyg ^R	diese Arbeit, siehe 4.1
SNN 2.1traD II	SNN	enthält die T-DNA Region von pBIN Hyg TX mit dem TGA2.1traD II-Gen; Hyg ^R	diese Arbeit, siehe 4.1
SNN 2.1 II	SNN	enthält die T-DNA Region von pBIN Hyg TX mit dem TGA2.1 II-Gen; Hyg ^R	diese Arbeit, siehe 4.1
SNN 2.2traD	SNN	enthält die T-DNA Region von pBIN Hyg TX mit dem TGA2.2traD-Gen; Hyg ^R	Niggeweg, 1999
SNN 2.2UE	SNN	enthält die T-DNA Region von pBIN Hyg TX mit dem TGA2.2-Gen; Hyg ^R	Niggeweg, 1999

2.1.3 Bakterienstämme

Stamm	Eigenschaften	Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	recA1 relA1 thi-1 Δ lacU169 ϕ 80 (lacZ Δ M15) hsdR17(r _k -m _k +); Klonier- und Sequenzierstamm	Hanahan, 1983
<i>Escherichia coli</i> SCS 110	rpsL (Str ^r) thr leu endA thi-1 lacY galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ (lac-proAB) [F' traD36 proAB lac-proAB lacI ^q Δ M15]; Stamm ohne DNA-Methylierung zur Gewinnung von mit methylierungssensitiven Restriktionsenzymen gespaltener DNA	Stratagene Katalog
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI ^q Δ M15 Tn10 (tet ^r)]; Klonier- und Sequenzierstamm	Bullock et al., 1987
<i>Escherichia coli</i> XL2-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI ^q Δ M15 Tn10 (tet ^r) amy cam ^r]; Klonier- und Sequenzierstamm	Stratagene Katalog
<i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i> GV3101 pMP90	Rif ^R ; Virulenz-Helferplasmid: pMP90 Gem ^R	Konz und Schell, 1986

2.2 Nukleinsäuren

2.2.1 Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pSK II (-)	lacZ α , Amp ^R ; Klonier- und Sequenziervektor	Alting-Mees und Short, 1989
pUC18	lacZ α , Amp ^R ; Klonier- und Sequenziervektor	Yanisch-Perron et al., 1985

pUC57/T	pUC57-Derivat, lacZ, Amp ^R , mit Eco32I linearisiert und ddT-Überhängen an den 3'-Enden versehen; Klonier- und Sequenziervektor	Marschuk et al., 1990
pBIN Hyg TX	pBIN Hyg-Derivat, trägt den TX-Promotor und den Terminator pAnos, Km ^R ; binärer Vektor zur Pflanzentransformation	Rieping et al., 1994
pUC18-as-1	trägt das <i>as-1</i> -Element des CaMV35S-Promotors in <i>Xba</i> I, Amp ^R	C. Thurow, unveröffentlicht
pUC18 as-1 BpI	trägt das <i>as-1</i> -Element des CaMV35S-Promotors in einer eingefügten <i>Bp</i> I-Schnittstelle	diese Arbeit, siehe 2.10
pSK-2611	trägt das 2,1 kb cDNA-Fragment von Klon 26-1-1; <i>TGA2.1</i> -cDNA aus <i>N. tabacum</i> vollständig mit 5'- und 3'-UTR, Amp ^R	Niggeweg, 1999
pSK TGA2.1traD Frag1	pSK II (-)-Derivat, trägt das TGA2.1-Genfragment (Position 1-541 bp) mit einer <i>Kpn</i> I-Schnittstelle vor dem ATG und einer Mutation in der basischen Domäne	diese Arbeit, siehe 4.1
pUC57 TGA2.1traD Frag1	pUC57-Derivat, trägt das TGA2.1-Genfragment (Position 1-541 bp) mit einer <i>Kpn</i> I Schnittstelle vor dem ATG, eine Mutation in der basischen Domäne und eine eingeführte <i>Sac</i> II - Schnittstelle	diese Arbeit, siehe 4.1
pSK TGA2.1Strep Frag2	pSK II (-)-Derivat, trägt das TGA2.1-Genfragment (ab Position 542 bp) mit dem angefügten Strep-Tag®	diese Arbeit, siehe 4.1
pSK 2.1Strep II Frag2	pSK II (-)-Derivat, trägt das TGA2.1-Genfragment (ab Position 542 bp) mit dem angefügten Strep-Tag®II	diese Arbeit, siehe 4.1
pTGA2.1traD	pUC57-Derivat, trägt das TGA2.1traD-Gen mit dem C-terminalen Strep-Tag®	diese Arbeit, siehe 4.1
pTGA2.1	pUC57-Derivat, trägt das TGA2.1-Gen mit dem C-terminalen Strep-Tag®	diese Arbeit, siehe 4.1

pTGA2.1 ΔN29	pUC57-Derivat, trägt das um 87 bp N-terminal gekürzte TGA2.1-Gen mit dem C-terminalen Strep-Tag®	diese Arbeit, siehe 4.1
pTGA2.1traD II	pUC57-Derivat, trägt das TGA2.1traD-Gen mit dem C-terminalen Strep-Tag®II	diese Arbeit, siehe 4.1
pTGA2.1 II	pUC57-Derivat, trägt das TGA2.1-Gen mit dem C-terminalen Strep-Tag®II	diese Arbeit, siehe 4.1
pBIN TGA2.1traD	pBIN Hyg TX-Derivat, trägt das TGA2.1traD-Gen mit dem C-terminalen Strep-Tag®	diese Arbeit, siehe 4.1
pBIN TGA2.1	pBIN Hyg TX-Derivat, trägt das TGA2.1-Gen mit dem C-terminalen Strep-Tag®	diese Arbeit, siehe 4.1
pBIN TGA2.1ΔN29	pBIN Hyg TX-Derivat, trägt das um 29 bp N-terminal gekürzte TGA2.1-Gen mit dem C-terminalen Strep-Tag®	diese Arbeit, siehe 4.1
pBIN TGA2.1traD II	pBIN Hyg TX-Derivat, trägt das TGA2.1traD-Gen mit dem C-terminalen Strep-Tag®II	diese Arbeit, siehe 4.1
pBIN TGA2.1 II	pBIN Hyg TX-Derivat, trägt das TGA2.1-Gen mit dem C-terminalen Strep-Tag®II	diese Arbeit, siehe 4.1

2.2.2 Primer

Primer	Sequenz 5' > 3'
2.1 StrepII rev	AAGGATCCTACTTTTTCGAACTGCGGATGACA CTCCACGTACGTACTAACTGCTCTCGTGGTC
GST-for	TGGCAGAAGTGAAGTTGC
GST-rev	ACTCATCTCTCCACCTAG
IEGT.tob.for	TCCAGCTGTTGAAAACGGCTTAC
IEGT.tob.rev	AGCAAGTTCGTGCAGTTGTGATGC
pUC18/EcoRI	TGAATTCTTTTTCGCTCTTCGTA CCCGGGATCCTCTAGA
pUC18/HindIII	ACTTAAGCTTTTTCGCTCTTCGCATGCCTGC AGGTCGACTC
TGA2.1For	GGGGTACCAACCATGGCTAGTAAGATTGGTACAGC
TGA2.1mutFor	CCTCCGCGGAAAAGTAGATTGAGG
TGA2.1mutREV	CCGCGGAGGTTACGGTTCTGGGC
TGA2.1Streq	TTAACCACCAAATTGTGGATGGCGCCAAGC TACTAACTGCTCTCGTGG
parA-L	AGATCTTAGGTAAGAAGTGTTCCTTGTTC AAGCAAG
parA-U	GATATCATGGAGAGCAACAACGTCGTTCTG

2.2.3 DNA-Sonden

Sonde	Beschreibung	Referenz
<i>IEGT</i>	PCR-Produkt mit den Primern IEGT.tob.for und IEGT.tob.rev auf der Matrizen-DNA <i>IEGT</i> aus <i>N. tabacum</i> (701 bp)	Horvath und Chua, 1996
<i>Nt103</i>	PCR-Produkt mit den Primern GST-for und GST-rev auf der Matrizen-cDNA <i>Nt103</i> aus <i>N. tabacum</i>	van der Zaal et al., 1991
<i>parA</i>	vollständige cDNA des <i>parA</i> -Gens aus <i>N. tabacum</i> (erhalten von I. Lenk)	Takahashi et al., 1989
<i>PR-1a</i>	531 bp Fragment der cDNA des Pathogenesis-related protein 1a (NTPR1A1) aus <i>N. tabacum</i> , <i>EcoRI</i> / <i>BamHI</i> Fragment aus dem Vektor pPR-1a	Payne et al., 1988
<i>TGA2.1</i>	vollständige, 1.3 kb umfassende cDNA des Gens <i>TGA2.1</i> aus <i>N. tabacum</i> , <i>KpnI</i> / <i>BamHI</i> -Fragment aus dem Vektor pSK-TGA2.1 in vitro (Plasmid von R. Niggeweg)	Niggeweg, 1999; Niggeweg et al., 2000b
<i>TGA2.2</i>	vollständige, 1.0 kb umfassende cDNA des Gens <i>TGA2.2</i> aus <i>N. tabacum</i> , <i>KpnI</i> / <i>BamHI</i> -Fragment aus dem Vektor pSK-TGA2.2 in vitro (Plasmid von R. Niggeweg)	Niggeweg, 1999; Niggeweg et al., 2000b

2.3 Radiochemikalien

Für die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse wurde ausschließlich [α - 32 P] dATP mit der spezifischen Aktivität von 800 Ci/mmol verwendet.

2.4 Antikörper

Bezeichnung	Eigenschaft	Referenz
anti-TGA2.1 N-term	polyklonaler AK, affinitätsaufgereinigt	Niggeweg, 1999
anti-TGA2.2 N-term	polyklonaler AK, affinitätsaufgereinigt	Niggeweg, 1999

anti-Strep-tag [®] II	polyklonales Antiserum aus Kaninchen gegen das Strep-tag [®] II Epitop	IBA Kat-No:2-1504-001
anti-Kaninchen Ig-HRP	sekundärer AK vom Esel, an den die Meerrettich-Peroxidase kovalent gekoppelt ist	Amersham-Pharmacia Kat-No: NA9 34
anti-TGA1a N-term	polyklonaler AK gegen den N-Terminus des TGA1a Proteins; verwendet wurde das Antiserum	Niggeweg, 1999

2.5 Proteinstandard

Zur Ermittlung des Molekulargewichts von Proteinen wurde die 'BENCHMARK[™] Prestained Protein Ladder' der Firma GIBCO BRL (Karlsruhe) verwendet.

2.6 Nährmedien und Zusätze

2.6.1 Pflanzenmedien

2 MS-Medium (fest): 4.59 g/l Murashige und Skoog Medium (Duchefa, Murashige und Skoog, 1962), 20 g/l Saccharose, 6.4 g/l Select-Agar; pH mit KOH auf 5.8 eingestellt.

'Shoot-induction'-Medium (SHI; fest): 4.59 g/l Murashige und Skoog Medium (Duchefa), 20 g/l Saccharose, 6.4 g/l Select-Agar; pH mit KOH auf 5.8 eingestellt und autoklaviert; nach Abkühlung auf 50°C steril hinzufügt: 1 mg/l 6-Benzylaminopurin (BAP), 200 mg/l α -Naphthalinessigsäure (NAA), 500 mg/l Cefotaxim und das Selektionsantibiotikum entsprechend den Angaben unter 2.6.3.

2.6.2 Bakterienmedien

dYT: 20 g/l Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl; pH auf 7.0 mit NaOH eingestellt

LB: 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl; pH auf 7.0 mit NaOH eingestellt

SOC-Medium: 20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 ml/l 1 M NaCl, 2.5 ml/l 1 M KCl

YEP: 5 g/l Rinderextrakt, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l Trypton, 5 g/l Saccharose, 2 mM MgSO₄; pH auf 7.0 mit NaOH eingestellt

2.6.3 Antibiotika und andere Zusätze

Antibiotikum	Endkonzentration	Stammlösung
<i>Escherichia coli</i>		
Ampicillin (Amp)	100 mg/l	100 mg/ml H ₂ O
Kanamycin (Km)	50 mg/l	50 mg/ml H ₂ O
Tetrazyclin (Tet)	5 mg/l	5 mg/ml EtOH/ H ₂ O 1:1 (v/v)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		
Rifampicin (Rif)	100 mg/l	50 mg/ml MeOH
Kanamycin (Km)	50 mg/l	50 mg/ml H ₂ O
Gentamycin (Gem)	25 mg/l	25 mg/ml H ₂ O
<i>Nicotiana tabacum</i>		
Kanamycin (Kan)	50 mg/l	50 mg/ml H ₂ O
Cefotaxim	500 mg/l	250 mg/ml H ₂ O
Hygromycin B (Hyg)	40 mg/l	50 mg/ml MeOH

X-Gal und IPTG

X-Gal-Stammlösung: 20 mg/ml in N,N-Dimethylformamid
IPTG-Stammlösung: 23,8 mg/ml H₂O

X-Gal und IPTG wurden für die Blau-Weiß-Selektion eingesetzt (Sambrook et al., 1989). Fertige Agarplatten wurden jeweils mit 50 µl der beiden Stammlösungen beschichtet.

2.7 Puffer und Lösungen

Anode-Puffer I: 0.3 M Tris, pH 10.4, 20% (v/v) MeOH

Anode-Puffer II: 25 mM Tris, pH 10.4, 20% (v/v) MeOH

1A Puffer: 1 M Hexylenglykol, 0.25 M Saccharose, 20 mM TAPES pH 8.5 (25 °C), 10 mM MgCl₂, 0.15 mM Spermin, 0.5 mM Spermidin, 0.6% (v/v) Nonidet P-40; direkt vor dem Gebrauch Zusatz von 80 mM β-Mercaptoethanol.

0.5A Puffer: 0.5 M Hexylenglykol, 0.25 M Saccharose, 20 mM TAPS pH 8.5 (25 °C), 10 mM MgCl₂, 0.15 mM Spermin, 0.5 mM Spermidin, 0.6% (v/v) Nonidet P-40 und direkt vor dem Gebrauch Zusatz von 80 mM β-Mercaptoethanol.

Auftragspuffer: wie 1x Gelshift-Bindepuffer, aber mit 87.5% Glycerin

Bindepuffer (5x): 50% (v/v) Glycerin, 125 mM HEPES pH 7.5, 50 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 10 mM DTT

Destain-Coomassie: 10% Essigsäure

Denaturierender Harnstoffpuffer: 4 M Harnstoff, 16.6% (v/v) Glycerin, 5% (v/v) β-Mercaptoethanol, 5% (w/v) SDS, 0.5% Bromphenolblau (w/v)

FixProt-Extraktionspuffer: 50 mM Hepes pH 7.5 (25 °C), 20 mM KCl, 25 mM DTT, Proteinaseinhibitoren (2 mM 1,10 Phenanthrolin, 1 mM EGTA, 50 µg/ml Antipain, 2 µg/ml Aprotinin, 10 µg/ml Chymostatin, 5 µg/ml E-64, 0.5 µg/ml Leupeptin, 1 mg/ml Pefabloc SC)

Gelshift-Bindepuffer (5x): 50% Glycerin (w/v), 125 mM Hepes pH 7.5 (25 °C), 50 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 50 µg/ml Antipain, 2 µg/ml Aprotinin, 10 µg/ml Chymostatin, 0.5 µg/ml Leupeptin

Isopropanol-Fix: 25% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Essigsäure

Harnstoffpuffer: 8 M Harnstoff, 5% (w/v) SDS, 5% (v/v) β -Mercaptoethanol, 0.5% Bromphenolblau

Hybridisierungslösung: 50% (v/v) deionisiertes Formamid, 10% (w/v) Dextransulfat, 1% (w/v) SDS, 1 M NaCl, 50 mM Phosphatpuffer ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 1:1); zuvor aufgekochtes HSP (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) frisch dazugeben.

Kathoden -Puffer: 25 mM Tris, 40 mM ϵ -Aminohexansäure; pH 9.4 (25°C), 20% (v/v) MeOH

KGB (10x): 1 M Kaliumglutamat, 250 mM Tris-Acetat pH 7.5, 20 mM Mg-Acetat, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA (deacyliert), 10 mM DTT

Lysispuffer I: 110 mM KCl, 15 mM Hepes pH 7.5 (25°C), 10 mM DTT und Proteinaseinhibitoren (2 mM 1,10-Phenanthrolin, 1 mM EGTA, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Antipain, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Aprotinin, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Chymostatin, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ E-64, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Leupeptin, 1 mg/ml Pefabloc SC)

Lysispuffer II: 110 mM KCl, 15 mM Hepes pH 7.5 (25°C), 10 mM DTT und Proteinaseinhibitoren (0.5 mM 1,10-Phenanthrolin, 1 mM EGTA, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Antipain, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Aprotinin, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Chymostatin, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Leupeptin)

MEN-Puffer (10x): 200 mM MOPS, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA; pH mit NaOH auf 7.0 eingestellt

Mini I: 50 mM Glukose, 10 mM EDTA (pH 8.0), 25 mM Tris-HCl (pH 8.0)

Mini II: 0.2 M NaOH, 1% (w/v) SDS; frisch angesetzt

Mini II: 7 M Ammoniumacetat

PAGE-Puffer: 25 mM Tris, 190 mM Glycerin, 0.1% (w/v) SDS

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (PCI): Lösung der drei organischen Lösungsmittel im Volumenverhältnis 25 : 24 : 1

PBS: 70 mM NaCl, 1.35 mM KCL, 0.75 mM KH_2PO_4 , 4.05 mM Na_2HPO_4

PBS-T: PBS mit 0.05% Tween-20

Protein-Probenpuffer (2x): 0.2 M Tris, 15% (v/v) Glycerin, 5% (w/v) SDS, 0.05% (w/v) Bromphenolblau, 10% (v/v) β -Mercaptoethanol

Rapid-Coomassie-Stain: 10% (v/v) Essigsäure, 0,006% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250

RNA-Probenpuffer (2x): 0.0003% (w/v) Bromphenolblau, 0.0003% (w/v) Xylen Cyanol, 4 mM EDTA pH 7.5, 2x MEN, 8% (v/v) Glycerin, 56.7% (v/v) Formamid, 5% (v/v) Formaldehyd

Saccharosefarbmarker: 67% (w/v) Saccharose, 0.5% (w/v) Bromphenolblau, 0.5% (w/v) Xylen Cyanol FF, 0.5% (w/v) Orange G, 50 mM EDTA pH 8.0; lösen in H₂O

Sephadex G50: 10 g in TE pH 8.0 quellen lassen, zwei mal mit TE pH 8.0 waschen und autoklavieren

SSC (20 x): 2 M NaCl, 0.3 M Natriumcitrat; pH 7.0 mit HCl einstellen

TAE (20x): 0.8 M Tris, 2.3% (v/v) Essigsäure, 20 mM EDTA, pH 7.5 - 7.6 (stellt sich selbst ein)

Taq-Puffer (10x) (Standard): 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.8 (25 °C), 15 mM MgCl₂, 0.8% Nonidet P-40

Taq-Puffer (10x) ('high fidelity'): 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.4 (25 °C), 8 mM MgCl₂, 0.1% (w/v) Gelatine, (v/v) 1% Triton X-100

TB-Puffer: (Transformationspuffer): 10 mM PIPES, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl; den pH mit 1 M KOH auf 6.7 einstellen; anschließend wird MnCl₂ auf 55 mM zugegeben; sterilfiltrieren.

TBE (10x): 0.9 M Tris, 0.9 M Borsäure, 2 mM EDTA; pH 8 (selbst einstellend)

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl pH 8, 0.5 mM EDTA pH 8

Waschlösung I: 2x SSC, 0.1% (w/v) SDS

Waschlösung II: 1x SSC, 0.1% (w/v) SDS

Waschlösung III: 0.5x SSC, 0.1% (w/v) SDS

2.8 Geräte, Verbrauchsmittel, Chemikalien

2.8.1 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	3870 ELV	Tuttnauer
Bioimager (Phosphoimager)	BAS-1000	Fuji
Elektroporationsapparatur	Gene pulser® II	BioRad
Geldokumentationsstation		MWG Biotech
Gelelektrophoresekammer		Werkstatt der Universität

Handmonitor	Contamat	Eberline
Heizblock		Boekel Scientific
Heizrührer	RCT basic	IKA Labortechnik
Hybridisierungsöfen		Bachhofer
Hybridisierungswasserbad	Belly Dancer	Stovall
Inkubationsschränke		WTC binder; Memmert
Kühlzentrifuge	Sorvall RC 5B Plus	DuPont
Netzgeräte	E 323	Benedikt Heinemann
Netzgeräte	EC 105	EC Apparatus Corporation
PCR-Gerät, MiniCycler™	PTC-150	MJ Research, USA
pH-Meter	HI 9321	Hanna Instruments
Photometer	Unikon 720 LC	Kontron
RNA-/DNA-Calculator	GeneQuant II	Pharmacia
Scanner	ScanJet 4c	Hewlett Packward
Sequenziergerät	ABI PRISM 310	Perkin-Elmer Corporation
Spektralphotometer	Novaspek Biochrom	LKB
Spektralphotometer für Mikrotiterplatten	MRX Dynex Plate Reader	Dynex
Sterilbank, horizontales Gebläse	Microflow Laminar	Nunc
Sterilbank, vertikales Gebläse	Microflow Biohazard	Nunc
Szintillationsmessgerät		raytest Isotopenmessgeräte
Tischzentrifuge, kühlbar	5403	Eppendorf
Tischzentrifuge	Biofuge pico	Heraeus Christ
UV-Transilluminator	FLX-20 M	Vilber Lourmat
Vertikalgelelektrophorese	Joey™ #JGC-4	AGS
Vortex	L46	Labinco BV, Niederlande
Wasseraufbereitungsanlage	Option 4, Maxima	ELGA

2.8.2 Verbrauchsmittel

Produkt	Hersteller
Bradford-Reagenz	Roth
Filterpapier	Roth
Gläser für Pflanzensterilkultur	Weck
Glaskugeln (2 mm Durchmesser)	Roth
Kunststoff-Einwegmaterial	Biozym; Eppendorf; Greiner;
Mikrotiterplatten	Roth
Nylon-Membran Hybond N	Amersham-Pharmacia
Parafilm M	American National Can™
PVDF-Membran, Immobilon-P, Porengröße 0.45 µm	Millipore
Röntgen-Entwickler LX24	Kodak
Röntgenfilme Cronex 10T	DuPont
Röntgen-Fixierer AL4	Kodak
Sephadex G50	Amersham-Pharmacia

2.8.3 Chemikalien

Die Katalognummer (Kat.Nr.) wurde in den Fällen angegeben, in denen die Qualitätsstufe von entscheidender Bedeutung war.

Chemikalien	Hersteller/Lieferant und ggf. spezifische Information
AG® 501-X8 mixed bed resin	Bio-Rad
β-Mercaptoethanol	Roth
1,10-Phenanthrolin	Aldrich
Agar Bacteriological	Life Technologies
Agarose SeaKem LE	Biozym
Ampicillin	AGS
Antipain reinst	SERVA Kat.Nr. 13685
Aprotinin	Sigma
APS (Ammoniumpersulfat)	Biometra
BAP (6-Benzylaminopurin)	Sigma
BSA (Rinder-Serum-Albumin)	Serva
BSA deacyliert	MBI Fermentas
Cefotaxim	Duchefa
Chlortetracyclin	Sigma
Chymostatin	Sigma
Coomassie Brilliant Blue G-250	Bio-Rad Kat.Nr. 161-0406
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma; Roth
DMF (N,N-Dimethylformamid)	J.T. Baker Chemicals B. V.
dNTPs	MBI; Roth
DTT (Dithiothritol)	Sigma
E64	BIOMOL Kat.Nr. 51363/2
EDTA	AppliChem
Ethidiumbromid	Roth
Formaldehyd	Roth
Formamid	Fluka
Gentamycin	Duchefa
HEPES	Roth
Heringssperma-DNA (HSP)	Boehringer Mannheim
Hydroxyethylcellulose	Fluka
Hygromycin	Duchefa
IPTG	BioTech Trade
Jasmonsäuremethylester	Aldrich Kat.Nr. 39,270-7
Kanamycin	Sigma
Kinetin	Sigma
Leupeptin	BIOMOL Kat.Nr. 12136/1
MES	Sigma
MOPS	Sigma

Murashige und Skoog Medium	Duchefa
α -Naphthalinessigsäure (NAA)	Sigma
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Natriumazid	Sigma
Natriumhypochlorit	Roth
Orange G	Sigma
organische Lösungsmittel (Alkohole etc.)	Merck; Roth
PAA-Mix; 30% PAA : Bisacrylamid (37.5 : 1)	Roth
PAA-Mix; 40% PAA : Bisacrylamid (19:1)	Roth
Pefabloc SC	Roche Diagnostics
Pepstatin A	BIOMOL Kat.Nr. 17640/1
Phenol	AppliChem
PIPES	Roth
Ponceau	Sigma
Rifampicin	Duchefa
Salze für Puffer etc.	AppliChem; Merck
Salzsäure (HCl)	Merck
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth
Select Agar	Life Technologies
Select Yeast Extract (Hefeextrakt)	GIBCO BRL
Spermin Tetrahydrochlorid	Sigma Kat.Nr. S-2876
Spermidin	Sigma Kat.Nr. S-2501
TAPS	ICN Biomedicals
TEMED	BIORAD, Roth
Tetracyclin	Duchefa
Triton X-100	Roth
Trypton	Oxoid
Tween-20	Roth
Xylencyanol FF	Roth
ϵ -Aminohexansäure	Roth

2.9 Enzyme und Kits

2.9.1 Enzyme

Enzym	Hersteller
Ampli Taq ® DNA-Polymerase, FS	ABI PRISM™
Klenow DNA-Polymerase	MBI Fermentas
Klenow exo^- DNA-Polymerase	MBI Fermentas
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Stratagene
Restriktionsenzyme	AGS, NEB, MBI Fermentas, GIBCO BRL
RNase A (DNase-frei)	Sigma; Qiagen
T4 DNA-Ligase	MBI Fermentas
CIAP	MBI Fermentas

2.9.2 Kits

Kit	Hersteller
Auto-Read Sequencing Kit	Pharmacia
BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin-Elmer
ECL+ -Kit	AmershamPharmacia
GeneClean® II - Kit	Bio 101, Inc.
Megaprime™ DNA Labelling Systems	Amersham Life Science
Oligotex™-Kit	Qiagen
Qiagen Plasmid-Preparations Kit (Midi)	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
Rabbit-Reticulocyte-Lysate-System	Promega
RNeasy Plant Mini Kit	Qiagen
T-Cloning Kit	MBI Fermentas

2.10 DNA-Fragmente für EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)

Das '**as-1 long**' Element wurde aus dem Vektor pUC18-as-1 (Niggeweg et al., 2000 a) als ein 293 bp langes Fragment mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *NdeI* herausgespalten und für die radioaktive Markierung eingesetzt.

'as-1 long'	ctaga TGACG taagggga TGACG cacaat t ACTGC attccct ACTGC gtgtagatc
--------------------	--

Als Standard-Gelshift-Sonde wurde das '**as-1 short**' Element verwendet. Die *as-1*-Kernsequenz ist dabei identisch mit dem '**as-1 long**' Fragment (siehe oben). Mit den Primern pUC18*EcoRI* und pUC18*HindIII* wurde eine PCR mit dem Vektor pUC18-*as-1* (Niggeweg, 1999) als Matrize durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde *EcoRI/HindIII* gespalten und in den *EcoRI/HindIII*-geöffneten Vektor kloniert. Bei einem *BpiI*-Verdau des entstandenen Vektors pUC18*as-1-BpiI* ergab sich ein 84 bp Fragment, das an den Enden jeweils einen 5'-Überhang von vier Nukleotiden besaß.

'as-1 short'	1-5' TTTTGC GTCTTCGCAT GCCTGCAGGT -26
	3' CG CAGAAGCGTA CGGACGTCCA
	27-CGACTctaga TGACG taagg ga TGACG cac -56
	GCTGAGATCT ACTGC attcc ct ACTGC gtt
	57-tCTAGAGGAT CCCCGGGTAC GAAGACGC 3'-84
	agatcTCCTA GGGGCCCATG CTTCTGCGTT TT-5'

3 Methoden

3.1 Pflanzenanzucht

Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum*) wurden in steriler Sprosskultur auf MS-Festmedium kultiviert. Die Kultur erfolgte in Klimakammern bzw. Klimaschränken bei 24°C am Tag und 22°C in der Nacht in einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 16 h : 8 h. Die Pflanzen wurden vegetativ fortgepflanzt, wozu eine Sprossspitze steril abgeschnitten und auf MS-Festmedium überführt wurde. Zur Produktion von Samen und um Pflanzen für Zeitreihenexperimente zu erhalten, wurden die Sterilkulturpflanzen auf Erde umgesetzt. Dies erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurde das MS-Festmedium gründlich von den Wurzeln abgewaschen, die Pflanzen wurden in sterilisierte Pikiererde (Blumentopferde mit hohem Sand-Anteil) eingepflanzt. Diese Pflanzen wurden 8-14 Tage nach dem Pikieren in Blumenerde umgetopft. Abhängig vom Wurzelwachstum und dem physiologischen Zustand der Pflanzen wurde alle 2-3 Wochen umgetopft. Der in der Klimakammer kultivierte Tabak unterlag einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 16 h : 8 h bei 22°C am Tag und 19°C in der Nacht bei 85% Luftfeuchte.

3.2 Anzucht und Lagerung von *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens*

E. coli SCS110 wurde bei 30°C, alle anderen *Escherichia coli* (*E. coli*) Stämme bei 37°C angezogen. Bei plasmidtragenden Stämmen wurde das Medium mit dem Antibiotikum versetzt, für das ein Resistenzgen vorlag. Für Minipräparationen von Plasmid-DNA wurde LB- und dYT-Medium verwendet, für Transformationen SOC-Medium.

Agrobacterium tumefaciens (*A. tumefaciens*) wurde 2 Tage auf YEB-Festmedium oder in YEB-Flüssigmedium bei 28°C angezogen. Bei plasmidtragenden bzw. transformierten Bakterien wurde das entsprechende Antibiotikum zugesetzt.

Für die Gewährleistung einer guten Sauerstoffversorgung wurden Kulturvolumina bis zu 5 ml in kontinuierlich drehenden Kulturröhrchen gezogen. Größere Flüssigkulturen wurden bei 250 Upm geschüttelt. Kulturmedien bis 50 ml wurden in 250 ml-, Medien bis 200 ml in 1 l-Erlenmeyerkolben gezogen.

Die langfristige Lagerung von Bakterienstämmen erfolgte in Form von Glycerinkulturen. Zur Herstellung solcher Kulturen wurden 850 µl der stationären *E. coli*-Kultur mit 150 µl Glycerin (steril) vermischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren (Sambrook et al., 1989). Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

3.3 Transformation von *E. coli*, *A. tumefaciens* und *N. tabacum*

3.3.1 Transformation gefrierkompetenter *E. coli*-Zellen

Die Methode von Inoue et al. (1990) wurde wie folgt modifiziert. Zur Präparation der kompetenten Zellen wurden 300 ml SOC-Medium in einem 2 l Erlenmeyerkolben mit Zellen des entsprechenden Stammes (z.B. DH5α) angeimpft. Die Vorkultur stammte stets aus frisch ausgestrichenen Kulturen (nie aus Stammkulturen oder älteren Platten). Die Zellen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0.2 bei 37°C angezogen. Anschließend wurde die Wachstumstemperatur für mindestens 2 Stunden auf 18°C gesenkt. Das Wachstum der Zellen wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0.4-0.6 weiter verfolgt. Die Kultur wurde auf sechs 50 ml Greinerröhrchen verteilt, auf Eis abgekühlt, durch Zentrifugation (Eppendorf 5403, Ausschwingrotor, 4000 Upm, 2°C, 10 min) geerntet, die sedimentierten Zellpellets wurden in je 15 ml eisgekühltem TB-Puffer resuspendiert. Die Suspensionen verblieben für 15 min auf Eis, bevor jeweils drei in einem 50 ml Greinerröhrchen vereinigt und wie zuvor pelletiert wurden. Der Überstand wurde verworfen und die beiden Zellpellets erneut in je 15 ml TB-Puffer resuspendiert. Zu jedem Röhrchen wurden 525 µl DMSO gegeben, kurz gemischt und 5 min auf Eis stehengelassen. Danach wurden nochmals jeweils 525 µl DMSO zur Zellsuspension gegeben und wie zuvor behandelt. In vorgekühlten Eppendorf-Reaktionsgefäßen wurden die kompetenten Zellen aliquotiert, umgehend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 80°C aufbewahrt.

Zur Transformation wurden 200 µl kompetente Zellen langsam auf Eis aufgetaut und die zu transformierende DNA zugesetzt. Nach 15 min Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für 90 sec bei 42°C, anschließend wurden die Transformationsansätze 1 min auf Eis gestellt. Es wurde dann 800 µl SOC-Medium zugegeben, zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz für 1 h bei 37°C inkubiert und auf Selektivagar ausplattiert.

3.3.2 Transformation elektroporationskompetenter *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen

Kompetente Zellen von *A. tumefaciens* wurden nach Dower et al. (1988) hergestellt. Das Einbringen der DNA erfolgte mittels Elektroporation bei 25 µF, 200 Ω und 2,5 kV in Elektroporations-Küvetten (Ø-Elektrodenabstand: 0,2 cm).

Zur Elektroporation wurden ca. 50 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 40-80 ng in H₂O gelöster Plasmid-DNA vermischt und 30-60 min auf Eis inkubiert. Diese Suspension wurde dann in eine eisgekühlte Kuvette überführt und mittels der Elektroporationsapparatur einem elektrischen Puls ausgesetzt.

Anschließend wurden die Zellen sofort in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und zur Ausprägung der Plasmid-kodierten Resistenz 2 h bei 29°C im Roller inkubiert. Zur Selektion der transformierten *A. tumefaciens* wurde die Bakterienkultur auf YEB-Festmedium mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und 2 Tage bei 28°C inkubiert.

3.3.3 Transformation von *Nicotiana tabacum*

Die Methode von Horsch et al. (1985) wurde wie folgt modifiziert. Die Transformation wurde mit Blattgewebe durchgeführt. Ein *A. tumefaciens*-Klon mit entsprechendem Plasmid wurde zwei Tage bei 28°C in 20 ml YEP-Flüssigmedium kultiviert. 1 ml dieser Kultur wurde in 25 ml steriler 20 mM MgSO₄-Lösung verdünnt und für die Transformationsprozedur eingesetzt. Blätter von steril angezogenen Tabakpflanzen wurden in 1-2 cm² große Stücke zerteilt, diese wurden für 2-3 min in eine Suspension aus transformierten *A. tumefaciens* getaucht. Die Blattstücke wurden anschließend zwei mal in 20 mM MgSO₄-Lösung von überschüssigem *A. tumefaciens* durch Waschen befreit, mit der Blattunterseite auf MS-Festmedium gelegt und abgedunkelt im Klimaschrank bei 24°C mit den Agrobakterien co-kultiviert. Nach zwei Tagen wurden die Blattstücke auf SHI-Medium umgelegt und im Klimaschrank in einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 16 h : 8 h bei 28°C kultiviert. Die Hormone des Mediums induzierten die Bildung von Kallusgewebe, aus dem sich Sprosse regenerieren konnten. Die beiden dem SHI-Medium beigefügten Antibiotika dienten zum einem dem Abtöten des Agrobakteriums (Cefotaxim) und zum anderen der Selektion transgener Pflanzenzellen (z.B. Hygromycin).

Das Überführen der Blattstücke auf frisches SHI-Medium wurde die ersten 3 Wochen wöchentlich einmal, anschließend 14-täglich bis zur Ausbildung von Sprossen wiederholt. Anschließend wurden die regenerierten Sprosse zur Bewurzelung auf hormonfreies MS-Medium mit Cefotaxim und dem Selektionsantibiotikum umgesetzt.

3.4 Isolierung, Reinigung, Darstellung und Quantifizierung von Nukleinsäuren

3.4.1 Präparation von Plasmid-DNA

3.4.1.1 Präparation von Plasmid-DNA für die Sequenzierung

Die für die Sequenzierung verwendete Plasmid-DNA wurde mit QIAprep Spin Säulen und den mitgelieferten Lösungen entsprechend den Herstellerangaben gereinigt.

3.4.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA in analytischen Mengen (Mini-Präparation) durch modifizierte alkalische Lyse

Die Methode folgte den Protokollen von Le Gouill et al. (1994) und Sambrook et al. (1989). Hierzu wurden die plasmidtragenden Zellen über Nacht in 2-5 ml selektivem LB-Medium angezogen und anschließend geerntet (Tischzentrifuge Pico, 13000 Upm, 1 min, RT). Die Zellen wurden in 100 µl Minilösung I resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 200 µl Minilösung II 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 Minilösung III hinzugefügt. Durch sofortiges Schwenken wurde eine schlagartige Neutralisierung der Suspension erzielt, die der effizienten Fällung chromosomaler DNA diente. Nach der Zentrifugation (Tischzentrifuge Pico, 13000 Upm, 2 min, RT) wurde der Überstand mit 450 µl PCI-Mix versetzt und extrahiert. Zur Abtrennung der proteinhaltigen organischen Phase wurde 3 min zentrifugiert (Tischzentrifuge Pico, 13000 Upm, RT). Der wässrige Überstand mit der Plasmid-DNA wurde mit 900 µl 96%^{igem} Ethanol gefällt und mittels Zentrifugation (Tischzentrifuge Pico, 13000 Upm, 10 min, RT) pelletiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 70%^{igem} Ethanol gewaschen und nach kurzem Trocknen bei RT in 50 µl TE oder H₂O resuspendiert.

Zur Isolierung der binären Vektoren aus *A. tumefaciens* wurden 4.5 ml einer stationären Kultur eingesetzt. Die Phenol-Chloroform-Extraktion wurde zweimal durchgeführt und das das Plasmid enthaltende Pellet in 20 µl H₂O resuspendiert.

3.4.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA in präparativen Mengen

Zur Isolierung großer Mengen Plasmid-DNA mit hohem Reinheitsgrad wurde der Midi-Kit der Firma Qiagen eingesetzt. Die Aufreinigung erfolgte entsprechend den Herstellerangaben.

3.4.1.4 Isolierung von Gesamt-RNA aus *N. tabacum*

Gesamt-RNA aus Blattgewebe von *N. tabacum* wurde mit Hilfe des RNeasy Plant Mini-Kits der Firma Qiagen gewonnen, wobei den Herstellerangaben gefolgt wurde. Abweichend von den Empfehlungen wurden standardmäßig 100-140 µg Pflanzengewebe verwendet.

3.4.1.5 Isolierung von polyA-RNA

Die Isolierung von polyA-RNA mittels des OligotexTM-Kits der Firma Qiagen erfolgte entsprechend den Herstellerangaben.

3.4.2 Fällung von DNA aus wässrigen Lösungen

Das Volumen der DNA-Lösung (= 1 Vol) wurde bestimmt, 1/10 Vol 7 M Ammoniumacetat und 2-3 Vol 96%^{iges} Ethanol p. a. hinzugefügt. Nach dem Mischen wurde der Ansatz für mindestens 10 min bei RT inkubiert und anschließend abzentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge, 15000 Upm, 10-30 min). Der Überstand wurde verworfen und 50 µl - 500 µl 70 %^{iges} Ethanol (je nach Größe des Pellets) in das Reaktionsgefäß überführt. Intensivem Mischen für 10-20 sec folgte die Sedimentation (30 sec, Biofuge pico Heraeus Christ, 13000 Upm). Das Ethanol wurde anschließend abgezogen und das DNA-Pellet bei RT getrocknet. Die Resuspendierung der DNA erfolgte in H₂O oder TE-Puffer. Nach dem gleichen Prinzip konnte DNA mit Isopropanol statt mit Ethanol gefällt werden. Dabei wurde analog zur DNA-Fällung mit Ethanol vorgegangen, jedoch mit dem Unterschied, dass nur 0.7 Vol Isopropanol verwendet werden musste.

Zur fraktionierten Fällung von DNA-Fragmenten aus Lösungen wurde Polyethylenglykol (PEG) verwendet. Hierbei wurde dem Protokoll von Paithankar und Prasad (1991) gefolgt.

3.4.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Methode folgte dem Protokoll von Sambrook et al. (1989). Die Konzentration von DNA und RNA wurde photometrisch bestimmt (GeneQuant II, Pharmacia). Aus der Absorption einer DNA-Lösung bei 260 nm wurden nach dem Lambert-Beerschen Gesetz die DNA- bzw. RNA-Konzentrationen bestimmt. 1 OD₂₆₀ entsprach dabei 50 µg/ml dsDNA bzw. 40 µg/ml RNA. Zur Kontrolle des Reinheitsgrades wurde der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ ermittelt. Dieser Wert beträgt in proteinfreien Proben 2. Um die Genauigkeit der photometrischen Messung zu gewährleisten, wurde darauf geachtet, dass die gemessenen Extinktionswerte zwischen 0.04-0.4 lagen.

Eine Abschätzung von sehr geringen DNA-Konzentrationen wurde alternativ nach gelelektrophoretischer Auftrennung der DNA über Fluoreszenzintensität unter UV-Licht im Vergleich zum Längenstandard bekannter Konzentrationen durchgeführt (Geltitration). Die Anzahl der in die DNA interkalierten EtBr-Moleküle ist direkt proportional zur DNA-Menge.

3.4.4 Agarose-DNA-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA für analytische und präparative Zwecke wurde in horizontalen Agarosegelen mit TAE als Laufpuffer durchgeführt (Mini-Gelelektrophorese: [7*10*0.3] cm³; präparative-Gelelektrophorese: [14*20*0.5] cm³). Die Gele enthielten je nach gewünschtem Auftrennungsbereich der DNA-Fragmente Agarosekonzentrationen von 0.7-2%. Die DNA-Proben wurden nach Zugabe von $\frac{1}{6}$ Vol Saccharosefarbmarker bei einer konstanten elektrischen Feldstärke von 4-10 V/cm elektrophoretisiert und im Anschluss in einem Ethidiumbromidbad (0.5-1 µg/ml) gefärbt. Die Farbstoffe Bromphenolblau, Xylen Cyanol FF und Orange G im Saccharosefarbmarker dienten der Kontrolle der Elektrophoresefront. Die DNA wurde durch Fluoreszenz im UV-Durchlicht (302 nm) visualisiert. 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 (Kleemiss et al., 1993; Perlman et al., 1987). Als Größenstandards dienten selbst hergestellte Verdauungen (λ PstI, λ EcoRI/HindIII, λ BstEII, λ Eco130I/MluI, pUC19HpaII, λ VspI).

3.4.5 Auftrennung von DNA in Polyacrylamid-Gelen

In einzelnen Fällen (siehe 3.8.1) wurde DNA durch Polyacrylamid-DNA-Gelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt. Dabei wurden 5%-ige Polyacrylamid-Gele (19:1 Acrylamid:Bisacrylamid), die 10% Glycerin, 1x TBE, 0.05% TEMED und 0.1% APS enthielten, verwendet. Probenbeladung, Lauf und Sichtbarmachung des Vertikalgels erfolgte wie für das Agarosegel beschrieben, wobei TBE als Laufpuffer verwendet wurde.

3.4.6 Denaturierende RNA-Gelelektrophorese

Um RNA-Moleküle nach der Größe auftrennen zu können und um Sekundärstruktureffekte bei der Elektrophorese auszuschließen, wurde die RNA denaturiert. Dies geschah durch den Zusatz von Formaldehyd auf 5.5% zur 1%-igen Agarose-Lösung, gepuffert in 1x MEN. 10-18 µg RNA wurden mit RNA-Probenpuffer versetzt und mit RNase-freiem Wasser auf das Endvolumen von 60 µl aufgefüllt. Die RNA denaturierte nach 15 min Inkubation bei 65°C und wurde bis zum Auftragen auf Eis verwahrt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Feldstärke von 3-5 V/cm bis die Bromphenolblaubande $\frac{3}{4}$ der Strecke zurückgelegt hatte.

Mittels Fluoreszenz im UV-Durchlicht (302 nm) wurde die RNA anschließend für die Dokumentation und Quantifizierung sichtbar gemacht.

3.5 Enzymatische Manipulationen an DNA

3.5.1 DNA-Spaltungen mit Restriktionsendonukleasen

DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen unter den vom Hersteller empfohlenen Temperatur- und Pufferbedingungen gespalten, wobei mit den 'MBI Fermentas' und 'New England Biolabs' Puffern gearbeitet wurde. Alternativ dazu wurde auch der KGB-Puffer verwendet (Sambrook et al., 1989).

Dazu wurde die DNA in der Regel in einer Endkonzentration von 100 ng/μl mit 1-2 U Enzym/μg DNA für 1 h inkubiert. Die Inkubationszeit konnte auf bis zu 16 h ausgedehnt werden, wenn die Enzymmenge entsprechend reduziert wurde.

3.5.2 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Um bei Ligationsexperimenten (3.5.3) Rezirkularisierungen von restriktionsgespaltenen Vektoren zu vermeiden, wurde der Reaktionsansatz nach Spaltung mit Alkalischer Phosphatase (CIAP) entsprechend den Herstellerangaben behandelt.

3.5.3 Ligationen von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation von zwei DNA-Fragmenten zu einem zirkulären Produkt wurde das DNA-Insert-Fragment in einem 3- bis 5-fachen molaren Überschuss zum Vektorfragment eingesetzt. Die Ligationen waren 0.5x KGB gepuffert, die jeweils idealen Reaktionsbedingungen wurden anhand von Angaben der Hersteller 'New England Biolabs' und 'MBI Fermentas' bestimmt.

3.5.4 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurden zwei Methoden verwendet. Zum einen wurde auf 'QIAquick Gel Extraction Kit'-Säulen (Firma Qiagen) zurückgegriffen, die gemäß Herstellerangaben verwendet wurden. Überdies wurde das GeneClean® II-Kit (Bio 101) verwendet. Von den Herstellerangaben abweichend wurde der Bindeschritt routinemäßig bei 55°C durchgeführt (Smith et al., 1995). Diese Änderung führt bei kleinen DNA-Fragmenten (100-500 bp) zu einer erheblichen Steigerung der Ausbeute.

3.6 Polymerasekettenreaktion PCR

Das Vorgehen basierte auf den Protokollen von Mullis und Faloona (1987) und Saiki et al. (1988). Die Reaktionen fanden zumeist in 50 µl Gesamtvolumina statt und enthielten für die meisten Anwendungen folgende Komponenten: 1-10 ng Matrizen-DNA, 100 nM von jedem Primer, *Taq*-Puffer (Standard), 200 µM eines jeden dNTPs und 2.5 U *Taq*. Bei der Planung der PCR-Reaktion wurde den Empfehlungen von McPherson et al. (1995; Kapitel 1) gefolgt. Die Länge und Temperatur der einzelnen Schritte eines Zyklus sowie die Anzahl der Zyklen wurden durch die Wahl der Matrize, die Basenzusammensetzung und Länge der Primer sowie durch die Länge der zu amplifizierenden Sequenz bestimmt.

Die Zyklen starteten nach einmaliger 2-minütiger Denaturierung bei 94°C. Die anschließende Denaturierung erfolgte in der Regel für 30 sec bei 92°C, das Primer-Annealing für 30 sec (bei der für das jeweilige Primerpaar charakteristischen Temperatur; siehe unten) und die Elongation für 1 min/kb bei 72 °C .

Die Schmelztemperatur T_M eines Oligonukleotides berechnete 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):

$$T_M [^{\circ}\text{C}] = 69,3 + 0.41 \cdot (\%GC) - (650/n)$$

Bei Differenzen zwischen den Annealing-Temperaturen der beiden Primer von mehr als 2°C wurde die optimale Annealing-Temperatur T_A für eine Polymerasekettenreaktion nach $T_A = [(T_{M1} + T_{M2})/2] - 3^{\circ}\text{C}$ berechnet (T_{M1} und T_{M2} = Schmelztemperaturen der beiden Primer).

Hatte bei der Amplifikation durch PCR die Vermeidung von Mutationen Priorität, so wurde die Reaktion mit der *Pfu*-Polymerase (Stratagene) durchgeführt. Es wurden die Lieferanteneempfehlungen für die Polymerase übernommen. Traten Amplifikationsprobleme aufgrund der hohen Exonukleaseaktivität des Enzyms auf, so wurde die PCR zur Fehlervermeidung mit Hilfe der *Taq*-Polymerase unter optimalen Bedingungen durchgeführt (McPherson et al., 1991; Kapitel 14).

3.7 *in vitro*-Translation

Das 'Rabbit Reticulocyte-Lysate' System der Firma Promega wurde entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Die eingesetzte mRNA wurde freundlicherweise von R. Niggeweg zur Verfügung gestellt. Die Reaktion wurde in einem Volumen von 50 µl für 90 min bei 30°C durchgeführt. Der Ansatz enthielt folgende Komponenten:

Aminosäuremix, ohne Leucin, 1 mM	0.5 µl
Aminosäuremix, ohne Methionin, 1 mM	0.5 µl
Ribonuklease-Inhibitor	40 U
mRNA, TGA2.1	250 ng
mRNA, TGA2.2	250 ng
'Rabbit' Reticulocyten-Lysat	35 µl

Die Matrizen-RNA wurde vor der Reaktion 3 min bei 65°C denaturiert und bis zur Verwendung auf Eis verwahrt. 1.5 µl des Translationsansatzes wurden im EMSA eingesetzt.

3.8 ³²P-Markierung von DNA-Fragmenten

3.8.1 Radioaktive Markierung der 5'-Enden von Gelshiftsonden

Die Eigenschaft der Klenow-Polymerase, 3'-OH-Enden komplementär zum überhängenden 5'-Phosphat-Ende aufzufüllen, wurde genutzt, um die unter 2.10 beschriebenen Gelshiftsonden ³²P-radioaktiv zu markieren.

1.7 pmol des BpiI gespaltenen Vektors 'pUC18 as-1 *BpiI*' (siehe 2.2.1 und 2.10) wurde zu einem Markierungsansatz (20 µl) mit den Endkonzentrationen 0.5x KGB-Puffer, 25 µM dTTP, 4.0 µl [³²P]-dATP (40 µCi) und 4 U Klenow (exo-) gegeben und 2-3 h bei 37 °C inkubiert. Im Falle des 'pUC18 as-1'-Vektors wurden 1.7 pmol eines *NdeI/EcoRI*-Verdau (siehe 2.2.1 und 2.10) für die Markierung des 'as-1 long' Fragmentes verwendet. Die Zugabe von 20 µM EDTA (pH 8.0) stoppte die Reaktion. Zur Abtrennung nicht eingebauter, radioaktiver Nukleotide wurde eine 'Micro SpinTMG25 Column' der Firma Amersham-Pharmacia entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Die weitere Aufarbeitung des Gelshiftfragmentes erfolgte mittels eines 5%^{igen} nativen PAA-Gels, bei dem der gesamte Spaltungsansatz eingesetzt wurde. Das gewünschte Fragment wurde schließlich durch Exposition des Gels auf einem Röntgenfilm lokalisiert und ausgeschnitten. Die Sonde wurde aus dem PAA-Gel durch Zugabe von 400 µl TE-Puffer eluiert (14-18 h). Die Strahlung der Sonde im Überstand wurde im Szintillationsmeßgerät quantifiziert. Ein Mikroliter der präparierten Sondenlösung enthielt 1.3 bis 1.6 fmol markiertes Fragment.

3.8.2 Radioaktive Markierung mit der "Random-Prime-Labeling" Methode

Die Methode folgte den Angaben von Feinberg und Vogelstein (1983).

Radioaktiv markierte Sonden für Northern-Blots wurden nach der 'random prime'-Methode erhalten. Die Markierung orientierte sich an der Kit-Beschreibung des 'NEBlot[®] Kit' (NEB Kat.No. 1550-25). 10-20 ng DNA-Fragmente und 2.2 µg Hexa- und Decaoligonukleotide (Gibco) wurden mit H₂O auf 10 µl aufgefüllt und 5 min auf 95°C erhitzt. Der Ansatz kühlte anschließend auf RT ab, bevor die Komponenten KGB (1x), 50 µM (je: dCTP, dGTP, dTTP) auf die Endkonzentration gebracht wurden und dem 25 µl Ansatz 2 U Klenow exo⁻ zugesetzt wurden. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 2.5 µl [α -³²P] dATP (25 µCi) gestartet und 2-3 h bei 37°C inkubiert. Die Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide, die bei der Hybridisierung zu einer nicht akzeptablen Hintergrundstrahlung geführt hätten, erfolgte mittels Gelfiltration mit Sephadex G-50. DNA-Fragmente kürzer als 80 bp und Nukleotide konnten somit von der Sonden-DNA getrennt werden. Als Säule diente eine mit einer Glaskugel (0.2 mm Durchmesser) verschlossene Glaspasteurpipette, die mit dem Säulenmaterial beschickt wurde. Nach dem Auftragen des Markierungsansatzes wurde die Sonde mit TE-Puffer eluiert und in 200 µl-Fractionen aufgefangen. Die erste radioaktive Fraktion wurde vereinigt und im Szintillationsmessgerät quantifiziert.

3.9 Northern Blot

3.9.1 Transfer der RNA

Nach der Gelelektrophorese (siehe 3.4.6) wurde das Gel dreimal für 15 min auf dem Horizontalschüttler in H₂O gewaschen, um die dem Blot nicht zuträglichen hohen Formaldehydkonzentrationen zu verringern (gemäß Herstellerangaben Schleicher und Schüll für neutrale Nylonmembranen). Mit Hilfe eines Kapillarblots (Sambrook et al., 1989) konnte die RNA auf eine neutrale Nylonmembran transferiert werden.

Zwei Lagen Filterpapier, die in Kontakt mit dem 10x SSC-Puffer standen, dienten als Auflage für das RNA-Agarosegel. Die Ränder des Gels wurden mit 'Parafilm M' abgedeckt, um den Flüssigkeitsstrom ausschließlich durch das Gel zu erzwingen. Die im Puffer äquilibrierte Membran deckte das Gel nach oben ab, gefolgt von drei Lagen in Puffer getränkten Filterpapiers. Luftblasen zwischen diesen Schichten wurden entfernt. Eine 10-15 cm dicke Lage an Papiertüchern schloss sich an und wurde mit einem Gewicht beschwert. Der Transfer erfolgte über mindestens 14 h. Die Membran des Blots wurde bei UV-

Durchlicht kontrolliert. Zur irreversiblen Fixierung der RNA auf der Membran folgte ein ein- bis zweistündiger Inkubationsschritt bei Temperaturen von 65-80°C.

3.9.2 Hybridisierung der Northern-Blots

Die zu hybridisierenden Membranen wurden in 2x SSC angefeuchtet, damit sich die Membran beim Platzieren in den Hybridisierungsröhrchen luftblasenfrei auf die Glaswand auflegen ließ. Wurden mehrere Filter in ein Hybridisierungsröhrchen transferiert, so überdeckten sich die Membranen gegenseitig vollständig. Es folgte die Zugabe von 8 ml Hybridisierungsflüssigkeit auf 150 cm² Membran. Nach einem 30-minütigen Prähybridisierungsschritt bei 43°C wurde die Sonde (3-8*10⁶ cpm pro Filter) zugegeben und unter den gleichen Bedingungen über Nacht im Rotationsinkubator hybridisiert. Vor Zugabe der Sonde wurde diese 5 min bei 100°C und 2 min auf Eis denaturiert.

Um unspezifisch gebundene Sonde gegenüber spezifisch gebundener zu diskriminieren, wurden Waschschrte mit steigender Stringenz durchgeführt. Dabei wurde die Konzentration der monovalenten Kationen in jedem Schritt erniedrigt, wodurch sich durch die steigende Dielektrizitätskonstante die gegenseitige Abstoßung der negativen Ladungen des Phosphodiester-Rückgrats der RNA erhöhte. Standardmäßig wurden zwei Schritte bei niedrigster Stringenz durchgeführt (2x SSC, 0.1% SDS; 65°C; jeweils 10-20 min, im Rotationsinkubator), gefolgt von einem Waschschrte mit 1x SSC, 0.1% SDS (65°C; 10-20 min, Hybridisierungswasserbad) und einem abschließenden Waschschrte mit 0.5x SSC, 0.1% SDS (65°C; 10-20 min). Hatten die Filter eine Strahlung von 20-30 cpm bereits nach dem Waschschrte mit 1x SSC, 0.1% SDS unterschritten, so wurde der Vorgang an diesem Punkt beendet. Die radioaktiven Signale wurden mit Hilfe eines IP-Screens detektiert und mit dem Phosphoimager (Bioimager, BAS-1000, Fuji) sichtbar gemacht. Die Quantifizierung der entstehenden Daten wurde mit dem Programmpaket PCBAS® 2.0 durchgeführt. Die Werte wurden normalisiert, indem das Ethidiumbromid-Signal der 28S rRNA aus der Dokumentation (3.4.6) für den Abgleich mit den Daten der Sonden signale verrechnet wurde.

3.9.3 Rehybridisierung der Blots

Der Rehybridisierung der Blots ging die Reinigung derselben von der noch verbliebenen radioaktiven Sonde aus der vorangegangenen Hybridisierung voraus. Zu diesem Zwecke wurde 0.1%^{ige} SDS-Lösung (95°C) auf die Filter gegeben und der Ansatz 20-30 min bei 75 °C im Hybridisierungsschüttler gewaschen. Die Rehybridisierung erfolgte gemäß 3.9.2.

3.10 Gesamtzellextrakte

3.10.1 FixProt: Methode zur schnellen Extraktion von Gesamtzellproteinen

100-300 µg Blattmaterial wurden unter flüssigem Stickstoff gemörsert und in ein Mikroliterreaktionsgefäß überführt. Zu dem Zellmaterial wurden 2 Vol (m/v) auf Eis vorgekühltem FixProt-Extraktionspuffer gegeben und die Probe im noch zum Teil gefrorenen Zustand mit einer Mikroliterpipette vermenget. Das Mischen des Ansatzes erfolgte solange bis dieser vollständig aufgetaut war. Diese Arbeiten erfolgten im Kühlraum, um selbst partielle Erwärmung des Pflanzenmaterial zu vermeiden. Bei dem anschließenden Zentrifugationsschritt (Eppendorf 5403, 15000 Upm, 10 min, 2°C) wurden die nichtlöslichen Zelltrümmer pelletiert und der Überstand als Proteinlösung gewonnen werden.

3.10.2 Denaturierender Aufschluss

100-300 µg Blattmaterial wurden unter flüssigem Stickstoff gemörsert und in ein Mikroliterreaktionsgefäß überführt. Zu dem Zellmaterial wurden 3 Vol (m/v) Harnstoffpuffer (65°C) gegeben und der Ansatz für 10 min bei 65°C inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (Eppendorf 5403, 15000 Upm, 10 min, 28°C) zur Abtrennung nicht löslicher Teile. Die Proteinlösung im Überstand wurde direkt in der SDS-PAGE (Siehe 3.12) eingesetzt.

3.11 Kernproteinextrakte

Die Methoden von Niggeweg (1999) und Prat et al. (1989) wurden wie folgt modifiziert. Unter flüssigem Stickstoff wurden 6-10 g Blattmaterial mit einem elektrischen Schermixer zu feinem Pulver zermahlen und in 40 ml 1A Puffer aufgenommen. Die anschließende Filtration durch zwei Lagen Miracloth trennte die verbliebenen größeren Zelltrümmer von der Suspension mit den Organellen ab. Im folgenden Zentrifugationsschritt (SS34, 1000 Upm, 2 min 40 sec, 4°C) wurden kleinere Zelltrümmer und Stärke von den in der Lösung verbliebenen Organellen separiert. Die Suspension wurde einer weiteren Zentrifugation zur Pelletierung der Zellkerne unterzogen (SS34, 2000 Upm, 3 min 30 sec, 4°C) und der entstehende Überstand verworfen. Zur Entfernung von Chloroplasten wurde das Pellet abschließend dreimal gewaschen, indem es zunächst mit Hilfe eines feinen Haarpinsels in 8 ml 0.5x Puffer A resuspendiert und die Suspension anschließend wie zuvor zentrifugiert wurde. Das Protokoll wurde je nach Anwendung auf zwei Arten weitergeführt (siehe unter 3.11.1 und 3.11.2)

3.11.1 Denaturierte Zellkernextrakte

Das bei der Herstellung eines Kernproteinextrakts erhaltene Pellet (siehe vorangegangener Abschnitt) wurde in 300-600 µl denaturierendem Harnstoffpuffer aufgenommen und 10 min bei 65°C inkubiert. Eine anschließende Ultraschallbehandlung fragmentierte die DNA und hob somit den viskosen Charakter der denaturierten Proteinlösung auf. Abschließend wurde die Mischung zentrifugiert (Tischzentrifuge Eppendorf, 15000 Upm, 30 min, 28 °C) und die Proteinlösung im Überstand weiterverwendet.

3.11.2 Native Zellkernextrakte

Alle weiteren Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt (Kühlraum bzw. in gekühltem Rotor) und alle Puffer waren auf Eis vorgekühlt: Die Zellkerne im Pellet aus 3.10.1 wurden in 4 ml Lysispuffer I aufgeschlossen und die chromosomale DNA im Homogenisator geschert. Die Zugabe von 3.5 M Ammoniumsulfat auf eine Endkonzentration von 10% (w/v) erfolgte unter langsamem Rühren. Nach 30 min langsamen Rührens wurde die Kernmembran durch Zentrifugation (SS34, 32000 g) von der flüssigen Phase getrennt. Zur Pelletierung der chromosomalen DNA wurde der Überstand sofort ultrazentrifugiert. Die Verwendung von Centricon-30 Ultrafiltrationsröhrchen diente dem Auswaschen des Ammoniumsulfates aus der verbliebenen Proteinlösung sowie dem Pufferwechsel. Sie wurden gemäß den Herstellerangaben verwendet. Nachdem die Proteinlösung des Ansatzes erstmalig eingeengt war, wurden die Centricon-30 Röhrchen mit Lysispuffer II aufgefüllt. Ein Zellkernansatz wurde auf 100-120 µl Proteinlösung eingeengt.

3.12 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen

Proteine wurden unter denaturierenden Bedingungen in diskontinuierlicher SDS-PAGE mit PAGE-Puffer nach der Methode von Laemmli (1970) aufgetrennt. Trenngele enthielten 8-12% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (19 : 1), 0.4 M Tris-HCl pH 8.8, 0.1% (w/v) SDS, 0.1% (w/v) TEMED und 0.1% (w/v) Ammoniumpersulfat (APS). Sammelgele enthielten 4% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (37.5 : 1), 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.1% (w/v) SDS, 0.2% (w/v) TEMED und 0.1% (w/v) APS. Die Proben wurden in Protein-Probenpuffer bzw. Harnstoffpuffer 5 min bei 95°C denaturiert und vor dem Laden auf Eis abgekühlt.

3.12.1 Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen

Die Methode folgte dem Protokoll von Ausubel et al. (1987).

Die Färbung von SDS-PAGE-Gelen und die Überprüfung dieser Gele nach dem Transfer der Proteine auf Polyvinylidenfluorid-Membranen erfolgte mit dem Farbstoff 'Coomassie Brilliant Blue'. Die Gele wurden 15 min in der Lösung Isopropanol-Fix geschwenkt, die Lösung gegen Rapid-Coomassie-Stain ausgetauscht und dieses in der Mikrowelle auf 45-55°C erwärmt. Unter ständiger Bewegung wurde der Ansatz 30-60 min inkubiert und die Lösung gegen die Destainlösung ausgetauscht. Das Entfärben mit der Destainlösung wurde durch mehrfachen Wechsel der Lösung abgeschlossen.

3.13 Bestimmung von Proteinkonzentrationen / Proteinabgleich

3.13.1 Bestimmung nach Bradford (1976)

1-10 µl des Proteinextraktes wurde in der Vertiefung einer Mikrotiterplatte vorgelegt und mit 200 µl Bradfordlösung (1 Teil Bradford-Reagenz : 4 Teile H₂O) vermischt. Die Adsorption wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm im 'Dynex Plate-Reader' ermittelt. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer mit BSA erstellten Eichgerade bestimmt.

3.13.2 Proteinabgleich über Coomassiegele

Bei Proteinfraktionen, die in Harnstoffpuffer aufgenommen waren, konnte die genaue Proteinkonzentration nicht bestimmt werden. Um dennoch weitestgehend gleiche Mengen Protein beim immunochemischen Nachweis zu verwenden, wurden die zu untersuchenden Proteinextrakte aufeinander abgeglichen. Hierzu wurde mit den für den Immunonachweis benötigten Proteinextrakten eine SDS-PAGE durchgeführt, das Gel mit Coomassie gefärbt (siehe 3.12.1) und bei Durchlicht eingescannt. Die digitale Dokumentation des Gels wurde mit Hilfe des Programms PCBAS® 2.0 ausgewertet, dies ermöglichte die Ableitung für eine gleichmäßige Beladung beim Immunonachweis. Die Genauigkeit des Abgleichs von Proteinmengen beträgt bei dieser Methode schätzungsweise +/- 25-35%. Die Genauigkeit der Methode wurde ermittelt, indem mit der Bradfordmethode quantifizierte Mengen Protein elektrophoretisch aufgetrennt und Coomassie gefärbt wurden und eine Auswertung analog zu der hier beschriebenen Methode durchgeführt wurde.

3.14 Affinitätsaufreinigung der Antiseren

Die Methode der Affinitätsaufreinigung von polyklonalen Antiseren nach Olmsted (1981) stellt eine Modifikation des Western-Blots (siehe 3.15) dar. 1 mg mittels Affinitätschromatographie gewonnenen Fusionsproteins wurde in einer präparativen 10%^{igen} SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membran transferiert (siehe 3.15.1). Nach der Ponceau-Färbung der Proteine (siehe 3.15.2) wurden Banden und Abbaubanden des Fusionsproteins ausgeschnitten und über Nacht bei 4°C in 1x PBS-T (Tween-20 0.05% [v/v]) inkubiert. Anschließend wurden 2 ml des Antiserums mit 1x PBS-T-Puffer auf 10 ml aufgefüllt und 3 h bei RT mit der Membran inkubiert. Danach wurde unspezifisch gebundener Antikörper durch sechs 10-minütige Waschschrte mit 1x PBS-T entfernt.

Die Elution der gebundenen Fraktion von Antikörpern erfolgte mit einer 0.1 M Glycin-Lösung (pH 2.5). Viermal wurden 2 ml der obigen Lösung unter heftiger Bewegung für 30 sec mit den Filterstückchen inkubiert. In jedem Schritt erfolgte direkt beim Abgießen der Elutionslösung die sofortige Neutralisierung durch eine vorgelegte Neutralisierungslösung (1 ml, 0.3 M Tris-HCl pH 8.0, 1x PBS, 4°C). Der Puffer aller vier Eluate wurde in Centricon-50 Ultrazentrifugenröhrchen zu PBS (0.02% [w/v] Natriumazid) umgepuffert und abschließend auf 100-200 µl eingengt. Die Zugabe von BSA auf eine Konzentration von 10 µg/ml diente der Stabilisierung der AK. Die immunochemischen Eigenschaften der Eluate wurden über Konzentrationsreihen der AK im Western-Blot (3.15) ermittelt.

3.15 Immunochemischer Nachweis von Proteinen

3.15.1 Transfer von Proteinen auf Polyvinylidenflourid (PVDF) Membranen

Modifiziert nach Kyhse-Andersen (1984).

Beim Transfer von Proteinen aus dem SDS-PAGE (Siehe 3.12) auf PVDF-Membranen wurde das drei-Puffer-System verwendet (Kyhse-Andersen, 1984). Die Auswahl der Transferbedingungen orientierte sich an den Angaben von Dunbar (1994, Kapitel 4 und 5). Das SDS-PAGE-Gel wurde nach Abschluss der Elektrophorese 15 min im Kathodenpuffer und die zugeschnittene PVDF-Membran im Anoden-Puffer-II äquilibriert. In der Elektrobplot-Apparatur folgte auf zwei Lagen Anoden-Puffer-I getränktes Filterpapier eine Lage Anoden-Puffer II-getränktes Filterpapier. Auf diese Lagen wurde die äquilibrierte PVDF-Membran gelegt, gefolgt vom äquilibrierten Gel und drei Lagen in Kathodenpuffer getränktem Filterpapier. Bei Gelen der Dicke 0.8 - 1.0 mm erfolgte der Transfer bei einer Stromstärke

von 1 mA/cm² über einen Zeitraum von 1 h. Zur Kontrolle über den Transfer wurde das SDS-PAGE-Gel routinemäßig Coomassie gefärbt (3.12.1). Die Membran wurde entsprechend der Empfehlung des Herstellers in Methanol gewaschen und anschließend für die Lagerung getrocknet.

3.15.2 Immunochemische Detektion transferierter Proteine im Western-Blot

Die getrocknete PVDF-Membran wurde mit Methanol aktiviert und das Methanol wiederum mit H₂O ausgewaschen. Mittels Ponceau-Färbung der Membran wurde die Transfereffizienz kontrolliert. Die Proteinfärbung wurde durch kontinuierliches Schwenken des Ansatzes in PBS und zweimaligen Austausch der Lösung ausgewaschen. Folgte eine Behandlung mit AK anti-TGA2.1 N-term bzw. anti-Strep-tag[®] II, so wurde die Membran für 45 min in PBS-T mit 2% (w/v) BSA inkubiert. Folgte jedoch eine Behandlung mit AK anti-TGA2.2 N-term, so wurde die Membran in PBS-T mit 5% (w/v) Magermilch inkubiert. Vor Zugabe des ersten AK wurden die Membranen 5 min mit PBS-T (0.5% [w/v] BSA bzw. 1% [w/v] Magermilch) gewaschen. Der erste AK wurde hierzu geeignet verdünnt (anti-Strep-tag[®] 1 : 6000; die anderen Verdünnungen richteten sich nach der jeweiligen Elutionscharge [siehe 3.14]), im dem vorigen Waschschrift entsprechenden Puffer appliziert und für 2-3 h bei RT inkubiert. Zwischen dem ersten und zweiten Antikörper wurden drei 5-minütige Waschriffe mit PBS-T vollzogen, bevor der zweite AK in einer Verdünnung von 1 : 25000 zugegeben wurde und die Inkubation über 1 h folgte. Zum Entfernen des zweiten AK wurde sechsmal 5 min mit PBS-T gewaschen.

Die Detektion erfolgte über die Chemilumineszenz-Reaktion unter Zuhilfenahme des ECL⁺-Kits von Amersham-Pharmacia. Die Anwendung richtete sich nach den Herstellerangaben, wobei die empfohlene Menge an Substrat pro Filterfläche halbiert wurde. Als Röntgenfilm wurde der 'Cronex Medical x-ray' Film 10T 8 verwendet.

3.16 Gelshift/'Electrophoretic mobility shift assay' (EMSA)

Im Gelshift können spezifische Protein-DNA-Interaktionen sensitiv und quantitativ nachgewiesen werden. Der Supershift stellt ein Variante des EMSA dar, bei welchem die Zugabe eines Antikörpers den DNA-Proteinkomplex verstärkt retardieren kann. Letzteres geschieht, sofern das Protein, an das der AK bindet, die DNA-Sondenretardation verursacht.

Als Sonde wurde radioaktiv markiertes *as-1*-Fragment (3.8.1) verwendet. Die Bindereaktion erfolgte in einem Volumen von 30 µl, gepuffert in 1x Bindepuffer. Zunächst wurden adäquate

Mengen Proteinextrakt bei 4°C mit 3 µg polydI/dC Bindepuffer und im Falle von Supershifts mit 1 µl/Ansatz entsprechendem Antiserum vermengt. Die Inkubation des Ansatzes für 10 min bei RT folgte nach Zugabe von 4 µl Sonde (3.8.1). Die Elektrophorese erfolgte über einen Zeitraum von 12-16 h in einem nativen Polyacrylamidgel (wie für die DNA-Auftrennung verwendet; siehe 3.4.5) mit 1x TBE als Laufpuffer. Die Gele wurden bei 80°C auf dem Geltrockner getrocknet und die radioaktiven Signale unter Verwendung eines IP-Screens detektiert. Das Einlesen der Screens erfolgte am Phosphoimager (Bioimager BAS-1000) mit dem Programm PCBAS[®] 2.0 (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH).

3.16.1 Quantifizierung von EMSA-Daten

Der EMSA wurde auf unterschiedliche Weise quantifiziert. Alle Daten bezogen sich auf ein Gel, also nicht auf unabhängige Gelläufe untereinander.

Für die Bewertung der gesamtretardierten Fraktionen im Vergleich zueinander (z.B. Abb. 3.1 Spur 2 zu 5) wurden die Regionen der oberen und unteren Bande wie folgt definiert: In Abb. 3.1 entspricht die Region 1 der unteren Bande, die Region 2 der oberen. Da die obere Bande einer Doppelbesetzung des as-1-Elementes entspricht, wurde der zugehörige Wert verdoppelt, die daraus resultierenden Werte wurden für beide Regionen addiert. Analog wurden die Regionen der zu vergleichenden Spuren bewertet. Der w.t. -Wert wurde gleich 1.0 gesetzt und die damit zu vergleichende Spur darauf bezogen.

Der relative Anteil der supergeschifteten Fraktion im Verhältnis zum Gesamtshift ergab sich aus dem Wert der Region 3 geteilt durch die Summe der Werte der Regionen 3 und 5 (Abb. 3.1, Spur 3). Beim Vergleich von supergeschifteten Anteilen untereinander wurde der Wert der Region 4 (Abb. 3.1, Spur 4) ins Verhältnis zur analogen Region (in diesem Beispiel Region 6, Spur 7) der zu vergleichenden Pflanze gesetzt.

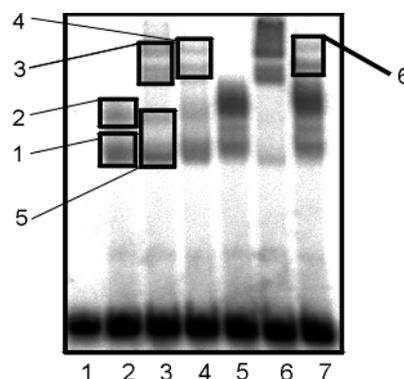


Abb. 3.1: Schema zur Bewertung und Quantifizierung von Gelshifts. Die Spuren sind durch die Zahlen unter der Abbildung gekennzeichnet. Die Spuren 2-3 repräsentieren die w.t.-Proteinextrakte und die Spuren 5-7 Proteinextrakte, die auf den w.t. bezogen werden sollen. Die zur Quantifizierung herangezogenen Regionen sind durch Kästchen angedeutet.

3.17 Induktion von Tabakblättern

Bei der Induktion der Genexpression im Tabakblattgewebe wurden auf Erde kultivierte Tabakpflanzen verwendet (siehe 3.1). Das Blattgewebe wurde den Pflanzen 5-8 Wochen nach dem Umsetzen der Sterilkultur auf Erde entnommen. Da der physiologische Zustand des Blattmaterials für die Reproduzierbarkeit des Versuches von ausschlaggebender Bedeutung war, wurden ausschließlich Pflanzen ohne Anzeichen von Seneszenz und einsetzender Blütenbildung verwendet.

Für alle Induktionsversuche wurden Blattscheiben mit einem Korkbohrer ausgestochen (\emptyset 2.6 cm). Alle Induktionssubstanzen/Signalstoffe waren in 20 mM Kaliumphosphat bei einem pH von 5.8 gepuffert. Die Substanzen wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt: Salizylsäure und 3-Hydroxybenzoesäure 1 mM, 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure und 2,6-Dichlorphenoxyessigsäure 50 μ M und Jasmonsäuremethylester 100 μ M. Alle Induktionschemikalien wurden in DMSO als Stammlösung angesetzt. Sie 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 Zeitreihen wurden in Klimmaschränken bei einem Licht / Dunkel-Rhythmus von 16 h : 8 h, bei 24°C in der Licht- und 22°C in der Dunkelperiode sowie einer Luftfeuchte von 75% durchgeführt. Die zu distinkten Zeitpunkten entnommenen Proben wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert bzw. im Falle von Zellkernextrakten direkt weiterverarbeitet (3.11.1).

4 Ergebnisse

4.1 Klonierung der TGA2.1-Derivate

Zur funktionellen Charakterisierung von TGA2.1 in transgenen Pflanzen wurden mehrere Änderungen der TGA2.1-cDNA vollzogen. Für die transdominanten Suppressor-Linien wurden zwei konservierte Alaninreste in der basischen Domäne gegen Proline mittels einer PCR-Mutagenese ausgetauscht. Der hier verwendeten transdominanten Suppressions-Strategie gingen mehrere Überlegungen voraus. Um die DNA-Bindung zu unterbinden, können verschiedene Eingriffe vorgenommen werden. Es war das Ziel dieser Arbeit, den Eingriff auf ein Minimum zu beschränken, um mögliche Auswirkungen auf andere Domänen weitestgehend ausschließen zu können und um die NLS-Funktion der basischen Domäne (van der Krol und Chua, 1991) nicht zu beeinträchtigen. Somit schied die Deletion der basischen Domäne (Ransone et al., 1990) als Strategie aus. In der basischen Domäne befinden sich zwei hochkonservierte Alaninreste (siehe Abb. 4.1), deren zentrale Rolle bei der Bindung von DNA im Falle von GCN4 aus Hefe gezeigt wurde (Ellenberger et al., 1992). Der Austausch dieser Alaninreste an der Position 9 und 10 der basischen Domäne zu Prolinresten wurde aus zwei Gründen gewählt (Positionsangaben beziehen sich auf Abb. 4.1). Zum einen bindet die basische Domäne DNA als α -Helix (Ellenberger et al., 1992; Vinson et al., 1989) und Proline sind thermodynamisch gesehen die energetisch ungünstigsten Aminosäuren zur Bildung einer α -Helix (Creighton, 1993). Es wurde davon ausgegangen, dass die Mutation (Alanin zu Prolin) die für die DNA-Bindung notwendige Sekundärstruktur unterbinden würde. Darüber hinaus bot sich Prolin als Aminosäure zur Mutation an, da dies nach bisherigen Erkenntnis keinen negativen Einfluss auf die NLS-Funktion hat. Diese Schlussfolgerung wurde aus der Analyse der SV40-NLS gezogen. Bei dieser NLS werden die für die Kernlokalisierung notwendigen Aminosäuren Lysin und Arginin von zwei Prolinresten flankiert (Kalderon et al., 1984).

Die einzelnen Derivate sind schematisch in Abb. 4.2 dargestellt. Für alle Konstrukte wurde C-terminal ein Affinitätst-tag (Strep-tag®) eingeführt (siehe Abb. 4.2). Im Laufe der Arbeit wurde eine in Bezug auf Spezifität und Affinität verbesserte Strep-tag®-Variante veröffentlicht (Strep-tag® II), so dass die Proteine TGA2.1 und TGA2.1traD als Strep-tag®-sowie Strep-tag® II-Varianten kloniert wurden. Ein Antiserum war nur gegen das Strep-tag® II erhältlich. Im Text werden in der Folge die Affinitäts-Tags sprachlich nicht mehr hervorgehoben. Um eindeutig zwischen den beiden Varianten diskriminieren zu können, wird

von nun an im Falle des Strep-tag® II die römische Ziffer "II" an die Genbezeichnung angehängt (z.B. TGA2.1II).

TGAs (Nicotiana, Arabidopsis)	1 - RRLAQNREAA	RKSRLRKKAY - 20
GCN4	LKRARNTEAA	RRSRARKLQR
Jun	RKRMRNRIAA	SKCRKRKLER
Fos	IRRERNKMAA	AKCRNRRREL
CREP	VRLMKNREAA	RECRRKKEY
Opaque2	KRKESNRESA	RRSRYRKA AH
CPRF1	RRKQSNRESA	RRSRLRKQAE

Abb. 4.1: Vergleich der Aminosäurenreste der basischen Domänen von bZIP-Proteinen. Es sind basische Domänen von bZIP Proteinen von phylogenetisch weit voneinander entfernten Organismen (Tiere, Pilze und Pflanzen) dargestellt (entnommen Vinson et al., 1989). Die konservierten Alaninreste sind hervorgehoben. Die basische Domäne des TGA3s von *Arabidopsis th.* weicht in der letzten Position ab (Y zu H). Es wurde der Ein-Buchstaben-Code für Aminosäuren verwendet. Die Angabe zur Position der Aminosäuren bezieht sich auf den konservierten Start der basischen Domäne der TGAs.

TGA2.1/2.1ΔN29/2.1II



TGA2.1traD/2.1traDII

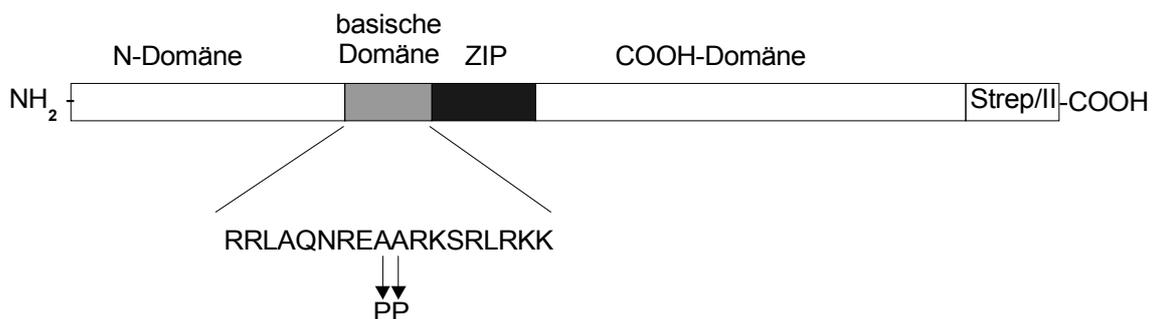


Abb. 4.2: Schematische Darstellung der TGA2.1-Derivate. Die Derivate TGA2.1 und TGA2.1II stellen das w.t. TGA-Protein mit dem C-terminalen Strep-tag® bzw. Strep-tag® II dar. Beim TGA2.1ΔN29-Derivat wurden die 29 N-terminalen Aminosäuren deletiert. Die Transkriptionsfaktoren TGA2.1traD und TGA2.1traDII weisen zusätzlich zum C-terminalen Anhang die Mutation in der basischen Domäne auf (Alanin zu Prolin). Die einzelnen Domänen der TGA-Proteine sind oberhalb der schematischen Zeichnung benannt.

Zunächst wurde die TGA2.1traD-cDNA kloniert, von welcher alle weiteren Konstrukte abgeleitet wurden. Mit Hilfe der PCR mit dem Primerpaar TGA2.1For und TGA2.1mutRev wurde ein Fragment 1 erhalten, das in der basischen Domäne die skizzierten Aminosäurenänderungen einführte und gleichzeitig eine *SacII*-Schnittstelle trug. Die *SacII*-Schnittstelle diente zum einen der Klonierung, zum anderen ermöglichte sie die Restriktionsanalyse zur Diskriminierung zwischen der mutierten und unmutierten Form in der basischen Domäne. Der Primer TGA2.1For fügte eine *KpnI*-Schnittstelle vor dem Translationsstart sowie eine Änderung der Nukleotide im 5'-UTR-Bereich des ATGs in das TGA2.1-Fragment 1 ein (Jones et al., 1988; Koziel et al., 1996; Lutcke et al., 1987). Ein zweites Fragment wurde mit den Primern TGA2.1mutFor und TGA2.1Strep amplifiziert. Der Primer TGA2.1mutFor fügte an analoger Stelle zum zuerst beschriebenen Fragment 1 die oben beschriebene *SacII*-Schnittstelle und einen C-terminalen Strep-tag® ein.

Tab. 4.1: Ausschnitt aus dem TGA2.1-Gen: Teil der basischen Domäne. Die zugehörige Peptidsequenz ist über dem Gen angezeigt, wobei die Aminosäure mittig über dem kodierenden Triplet steht. Die Änderungen im Gen TGA2.1traD sind rot unterlegt und die *SacII*-Schnittstelle ist unterstrichen. Die Position des Beginns des gezeigten Genabschnitts ist links von der DNA-Sequenz angezeigt.

TGA2.1	N R E A A R K 531 5' -AACCGTGAAGCTGCTAGAAA-3'
TGA2.1traD	N R E P P R K 531 5' -AACCGTGAAC <u>CTCCGGG</u> AAA-3' SacII

Entsprechend dem Klonierungsschema (Abb. 4.3 und Abb. 4.4) wurden die Fragmente subkloniert, per Restriktionsanalyse untersucht und geeignete Kandidaten sequenziert. Die weitere Klonierung der Vektoren pTGA2.1, pTGA2.1traD, pTGA2.1ΔN29, pTGA2.1 II und pTGA2.1traD II kann der Abb. 4.5 und Abb. 4.6 entnommen werden.

Alle fünf TGA2.1-Genvarianten wurden über die *KpnI/SaI* Schnittstelle in den binären Vektor pBIN HygTX kloniert. Die per Restriktionsanalyse überprüften pBIN HygTX-Derivate wurden in den *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm 'GV3101 pMP90' transformiert (3.3.2). Mittels der beschriebenen (3.3.3). *A. tumefaciens*-vermittelten Pflanzentransformation wurden die Konstrukte in Pflanzen stabil in das Genom integriert.

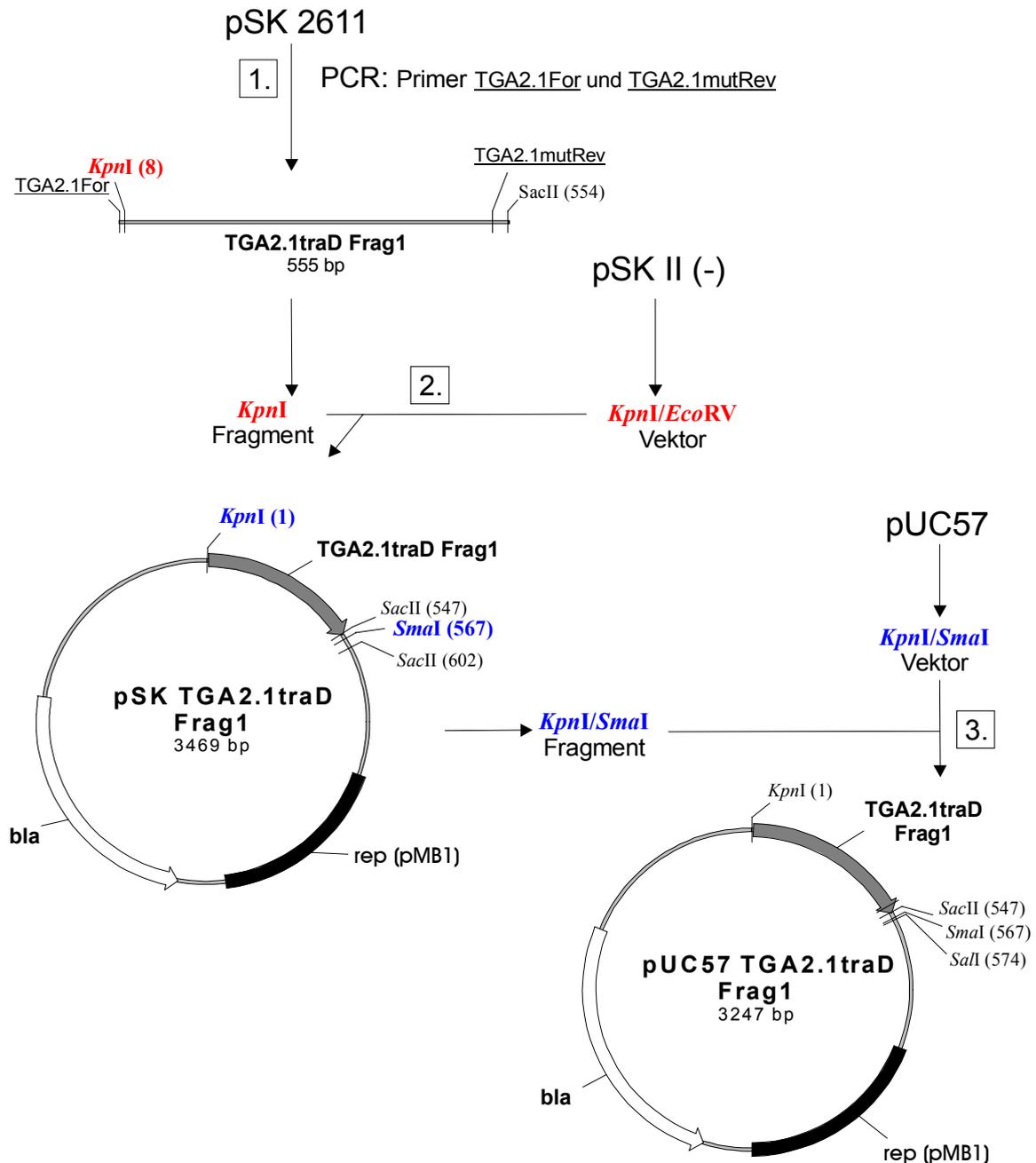


Abb. 4.3: Klonierung des 'TGA2.1traD Fragmentes 1' aus dem Gen TGA2.1. In allen klonierten Plasmiden wurde die *KpnI*-Schnittstelle als Position 1 definiert. Restriktionsendonukleasen sind kursiv dargestellt, die Zahl in Klammern bezieht sich auf die Position der Schnittstelle im Plasmid. Gene sind als Pfeile dargestellt und namentlich markiert (Fett hervorgehoben). Der 'origin of replication' des Plasmides ist als schwarzer Balken angezeigt. Innerhalb der Plasmide befindet sich der Name des Plasmides mit der Größe (in bp). Die im PCR-Produkt angezeigten Primer sind unterstrichen. Die Klonierungsschritte sind nummeriert (Zahlen umgeben von Kästchen). Bei den einzelnen Klonierungsschritten sind die Restriktionsendonukleasen durch Farbe hervorgehoben, die für den folgenden Schritt benutzt wurden.

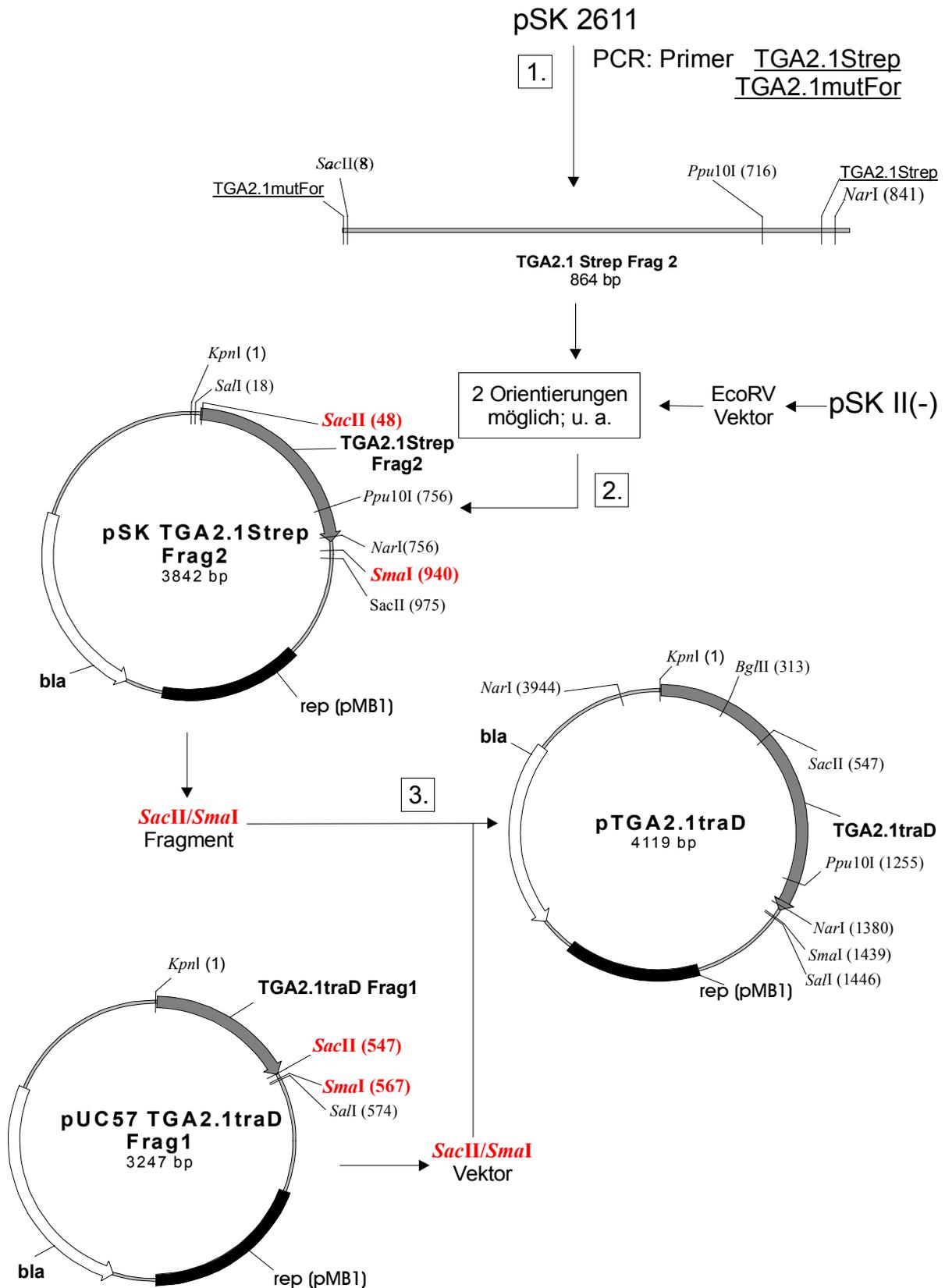


Abb. 4.4: Klonierung des 'TGA2.1 Fragmentes 2' und Konstruktion des Plasmides pTGA2.1traD. Die Beschriftung der Abb. ist analog zu der in Abb. 4.3 gehalten. Bei den einzelnen Klonierungsschritten sind die Restriktionsendonukleasen durch Farbe hervorgehoben, die für den folgenden Schritt benutzt wurden.

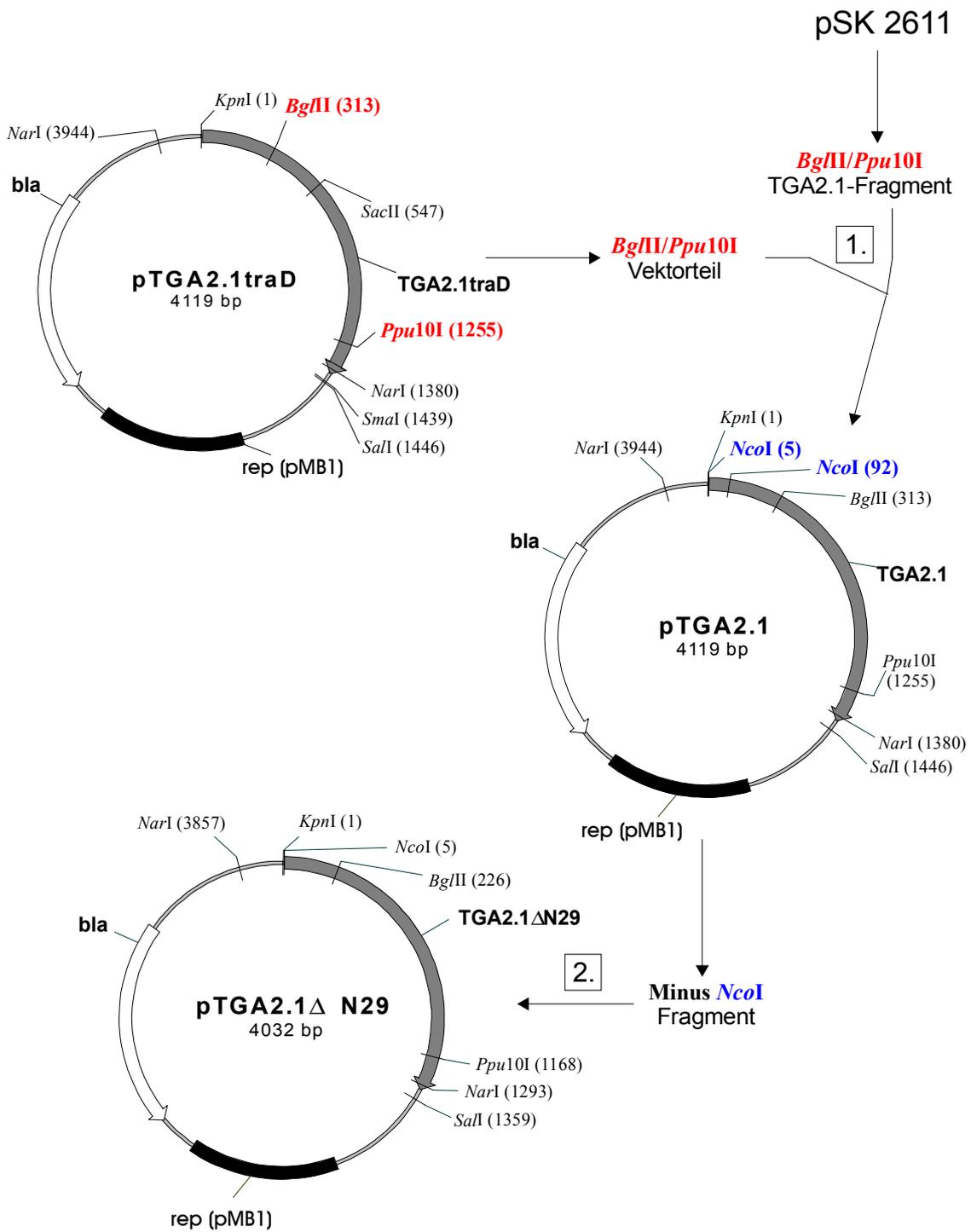


Abb. 4.5: Klonierung der Plasmide pTGA2.1 und pTGA2.1ΔN29. Die Beschriftung der Abb. ist analog zu der in Abb. 4.3 gehalten. Bei den einzelnen Klonierungsschritten sind die Restriktionsendonukleasen durch Farbe hervorgehoben, die für den folgenden Schritt benutzt wurden.

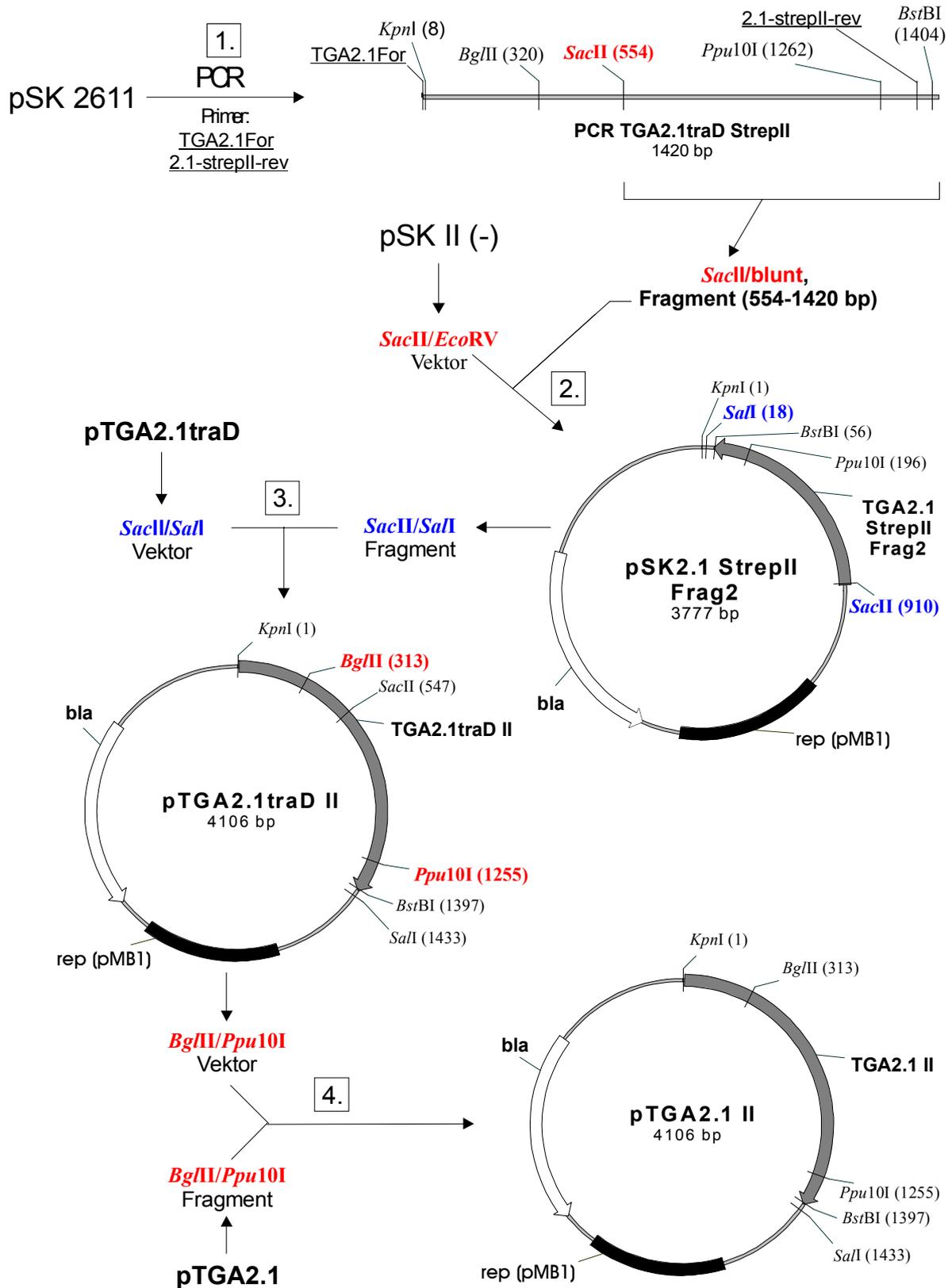


Abb. 4.6: Klonierung der Plasmide pTGA2.1traDII und pTGA2.1II. Die Beschriftung der Abb. ist analog zu der in Abb. 4.3 gehalten. Bei den einzelnen Klonierungsschritten sind die Restriktionsendonukleasen durch Farbe hervorgehoben, die für den folgenden Schritt benutzt wurden.

4.2 Charakterisierung der transgenen Pflanzen

Die Charakterisierung der transformierten Pflanzen in Bezug auf Erfolg der Transformation und Expressionsstärke erfolgte zunächst auf der transkriptionalen Ebene mittels der Northern-Blot-Methode (Abb. 4.7). Die Steigerung des TGA2.1-Transkriptes im Vergleich zur Menge in den w.t.-Pflanzen lässt sich nicht ermitteln, da mit Gesamt-RNA kein Transkriptionssignal beim w.t. detektiert werden konnte. Jedoch wurde eine vielfache Verstärkung der Transkriptmenge in den transformierten Pflanzen erreicht.

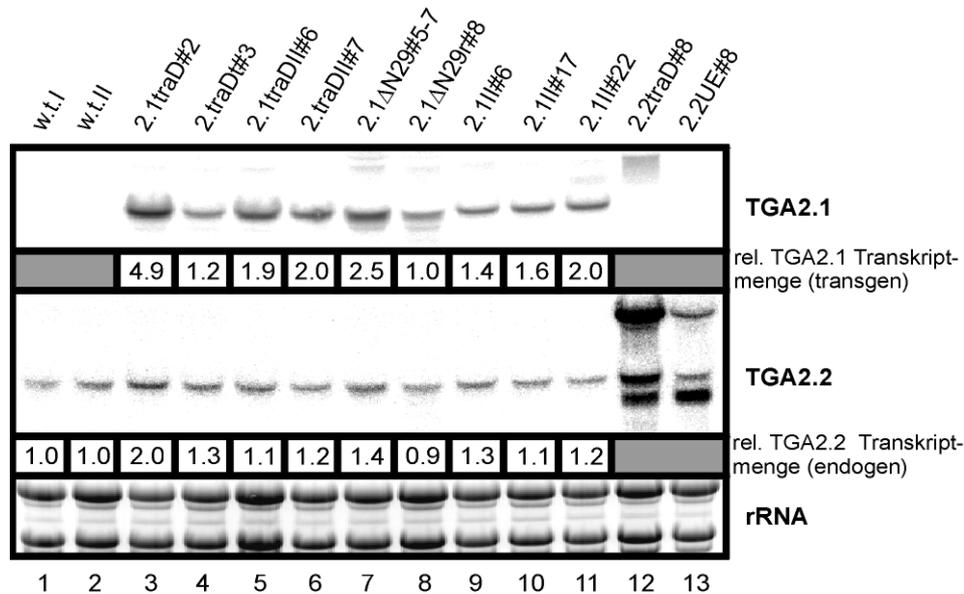


Abb. 4.7: Northern zur Identifikation von transformierten SNN-Pflanzen mit 16 µg Gesamt-RNA aus Blattgewebe. Die verwendeten Sonden sind rechts angezeigt und die Pflanzenlinien über der Abb.. Bei der Linie 2.1ΔN29#5-7 handelt es sich um eine F1-Pflanze, während alle anderen Linien Primärtransformanten sind. Die Bezugsgröße der relativen (rel.) TGA2.1-Transkriptmengen des Transgens wurde willkürlich auf das schwächste Signal (=1.0) abgeglichen. Die relative (rel.) TGA2.2-Transkriptmenge bezieht sich auf den w.t., wobei die Werte der w.t. Pflanzen gemittelt wurden. Alle quantitativen Angaben wurden normalisiert.

Die TGA2.2-Sonde diente dazu, spätere direkte Effekte durch die TGA2.1-Überexpression von möglichen indirekten Effekten durch TGA2.2 zu unterscheiden. Letztere würden entstehen, wenn die TGA2.1-Proteinmengen einen Effekt auf die Expression von TGA2.2 hätten. Die Transkriptmenge von TGA2.2 ist mit einer Ausnahme innerhalb der Auflösung der verwendeten Methode. Die Pflanze TGA2.1traD#2 weist eine Verdopplung der TGA2.2-RNA-Menge auf.

Als nächste Ebene zur Charakterisierung der transgenen Pflanzen wurden von ausgewählten Linien Gesamtzellproteinextrakte immunochemisch untersucht (Abb. 4.8). Wie sich auf der Transkriptionsebene andeutete, wird das eingebrachte TGA2.1-Derivat im Vergleich zu dem TGA2.1-Transkript in w.t.-Pflanzen stark überexprimiert. Das Signal im Western-Blot entspricht einem Molekulargewicht von 70 kDa im Falle der Proteine mit dem Strep-tag®

bzw. dem w.t.-TGA2.1 und 74 kDa bei den TGA2.1-Proteinen mit dem Strep-tag® II-Anhang. Das errechnete Molekulargewicht für das w.t.-Protein beträgt 50 kDa, das der TGA2.1-Proteine mit dem C-terminalen Anhang 51 kDa. Diese Diskrepanz zwischen errechneten und beobachteten Molekulargewichten wurde bereits von Niggeweg (1999) beschrieben. Bei der vom errechneten Molekulargewicht abweichenden Mobilität der TGA-Faktoren in der SDS-PAGE scheint es sich um eine intrinsische Eigenschaft dieser Gruppe von Proteinen zu handeln.

Eine analoge Untersuchung mit dem AK anti-TGA2.2 N-term konnte nicht umgesetzt werden, da die Qualität des AK nicht ausreichte, um das Protein TGA2.2 spezifisch in Gesamtzellextrakten zu detektieren.

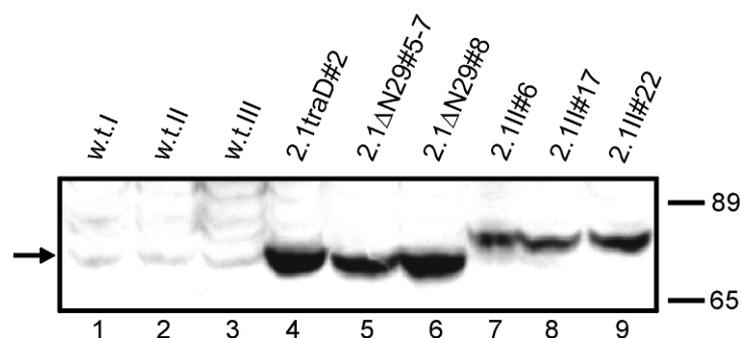


Abb. 4.8: Western-Blot von denaturierten Harnstoffproteinextrakten mit dem AK anti-TGA2.1 N-term. Aufgetragen wurden abgegliche Mengen Protein. Der Pfeil zeigt die TGA2.1-Bande an. Die mit dem 'Strep-tag® II' fusionierten Proteine laufen erkennbar höher. Oberhalb der Abb. sind die zugehörigen Pflanzenlinien angezeigt. Die Bezeichnungen w.t.I bis III repräsentieren drei unabhängige w.t. Pflanzen. Der Molekulargewichtsstandard ist rechts in kDa angezeigt.

4.3 Weiterentwicklung des Protokolls zur Isolierung von Zellkernen aus *N. tabacum*

Um Zellkernproteinextrakte aus SA-Zeitverläufen gewinnen zu können, musste das bis dahin verwendete Zellkernisoliationsprotokoll modifiziert werden, um auf deutlich weniger Blattmaterial angewiesen zu sein. Im ersten Schritt wurde eine Variante ausgearbeitet, die mit 6-10 g Blattgewebe auskam im Vergleich zu den 40-50 g, die bis dahin gebraucht wurden (Siehe Niggeweg, 1999).

Ein weiteres Problem stellte die Degradationsanfälligkeit von TGA2.1 dar. Wie in einer vorangegangenen Arbeit bereits vermutet wurde (Niggeweg et al., 2000a), wird TGA2.1 im Laufe der Kernproteinisolierung degradiert. Wie in Abb. 4.9 zu sehen, ermöglichte die bis dahin verwendete Methode (Niggeweg, 1999) nicht die Isolierung der TGA2.1-Proteine in der nativen Größe (siehe Abb. 4.8).

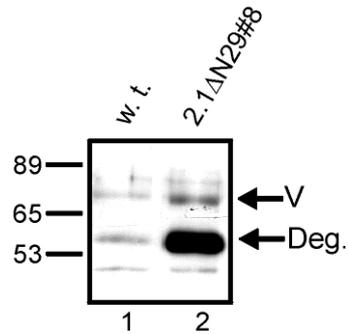


Abb. 4.9: Western-Blot von Kernproteinextrakten nach Niggeweg, 1999. 14 μg Protein der angezeigten Pflanzenlinien wurden geladen und TGA2.1 mit dem AK anti-TGA2.1 N-term detektiert. Oberhalb der Abb. sind die zugehörigen Pflanzenlinien angezeigt. Die Volllängenbande ist mit 'V' markiert, die abgebaute Bande mit 'Deg.'. Der Molekulargewichtsstandard ist links in kDa angezeigt.

Um eine Degradation von TGA2.1 während der Präparation zu vermeiden, wurde zunächst untersucht, an welcher Stelle des verwendeten Protokolls der Abbau stattfindet. Dabei wurden Proben von den Kernpellets nach dem ersten und nach dem dritten Waschschriff mit 0.5A-Puffer entnommen (siehe 3.11) und immunochemisch untersucht. In Abb. 4.10 ist zu erkennen, dass die Degradation bereits in den noch nicht lysierten Zellkernen beginnt.

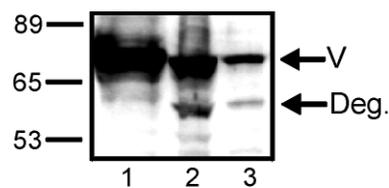


Abb. 4.10: Western-Blot von Kernproteinpellets mit dem AK anti-TGA2.1 N-term. Spur 1: 5 μl Gesamtzell-extrakt aus SNN TGA2.1 Δ N29#5-7 (als Referenz für die Volllängenbande). Spur 2 + 3: Von Kernpellets wurden Proben entnommen und in 50 μl Harnstoffpuffer aufgenommen (3.11.1). 20 μl der Proteinlösung wurden pro Spur geladen. In Spur 2 ist eine Kernpelletprobe nach dem ersten Waschschriff zu sehen (3.11), in Spur 3 nach dem dritten Waschschriff.

Aus dem in Abb. 4.10 dargestellten Experiment ergab sich die Notwendigkeit einer Überprüfung der Extraktionsbedingungen in dem Abschnitt des Protokolls, in welchem die Zellkerne noch nicht lysiert sind (Waschschriffe). Untersucht wurde zunächst der Parameter des pH-Werts. Dieser betrug im Ausgangsprotokoll 6.1 bei 4°C. Der pH-Wert des Aufschlusspuffer 1A und des Waschpuffers 0.5x A wurde mit den Puffersubstanzen MES (10 mM, pH 5.5 bei 4°C), PIPES (10 mM, pH 6.1 bei 4°C), MOPS (10 mM, pH 7.2 bei 4°C) und TAPS (10 mM, pH 8.8 bei 4°C) variiert. Mit Ausnahme des pH-Wertes und der Pufferkonzentration wurde das Protokoll 3.11.2 unverändert umgesetzt. Die Immunodetektion von TGA2.1 deutete auf eine pH-Abhängigkeit der Prozessierung hin (Abb. 4.11). Ein neutraler und saurer pH-Wert führen zum Abbau von TGA2.1. Der pH-Wert bei der Zellkernisolation wurde aufgrund der Ergebnisse (Abb. 4.11) auf 8.8 (bei 4°C) umgestellt (Siehe 3.11).

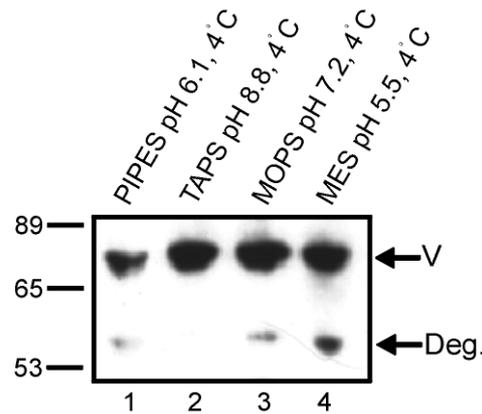


Abb. 4.11: TGA2.1-Abbau in Abhängigkeit vom pH-Wert. 20 μ l Zellkernextrakt (3.11.1) wurden geladen und der AK anti-StrepII bei der Detektion verwendet. Der jeweilige pH der Puffer 1A und 0.5 A ist oberhalb angezeigt. Die Vollängenbande ist mit 'V' markiert (Pfeil), die abgebaute Bande mit 'Deg.' (Pfeil). Der Molekulargewichtsstandard ist links in kDa angezeigt.

Bei der Gewinnung von nativen Zellkernproteinextrakten konnte die TGA2.1-Degradation nicht verhindert werden (siehe weiter unten Abb. 4.14).

Der Affinitäts-Tag am C-Terminus von TGA2.1 bot die Möglichkeit zu überprüfen, ob der Abbau von TGA2.1 bei der Zellkernpräparation N-terminal oder C-terminal geschieht. Würde das C-terminale Ende des Proteins als Folge der Proteinaufreinigung prozessiert, so würde der AK anti-Strep® II nur das Vollängenprotein erkennen, während im Falle der N-terminalen Degradation auch das Abbauprodukt vom AK erkannt werden würde. In Abb. 4.12 ist in Spur 2 eine Präparation von Kernproteinextrakten zu sehen, die nach dem Ausgangsprotokoll (pH-Wert 6.1 der Puffer 1A und 0.5A) gewonnen wurde. In den Spuren 1, 3 und 4 (Abb. 4.12) ist das geänderte Protokoll (3.11.1) angewandt worden. Die Abbaubande von TGA2.1 in Spur 2 wird vom AK anti-Strep® II erkannt, woraus sich eine N-terminale Prozessierung von TGA2.1 ergibt.

Die Detektion mit dem Antikörper gibt auch Auskunft über die absoluten Mengen an Überexpression von TGA2.1 und TGA2.2. In Zellkernen sind gleiche molare Mengen an TGA2.1 (Abb. 4.12, Spuren 2-4) und TGA2.2 (Abb. 4.12, Spuren 5 und 6) transgenen Ursprungs detektierbar.

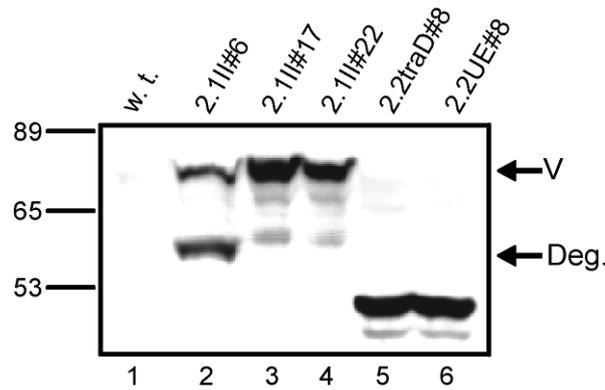


Abb. 4.12: Immunochemische Analyse der TGA2.1-Degradation von denaturierten Zellkernproteinextrakten aus Tabakblättern. Zellkernproteinextrakte nach der modifizierten Extraktionsmethode (Spur 1, 3, 4, 5 und 6; siehe 3.13.2) wurden verglichen mit Extrakten, die mit PIPES bei einem pH-Wert von 6.1 (4°C) aufgearbeitet wurden (Spur 2). Die Pflanzenlinien sind oberhalb angezeigt. Nach Elektrophorese und Transfer von abgeglichenen Mengen Zellkernprotein (3.13.2) auf PVDF-Membran wurde der AK anti-Strep® II zur Detektion verwendet. Der Molekulargewichtsstandard ist links in kDa angezeigt. Die Volllängenbande ist mit 'V' (Pfeil) markiert und die abgebaute(n) Bande(n) mit 'Deg.' (Pfeil).

4.4 Akkumulation von TGA-Faktoren in den Zellkernen transgener Pflanzen

Das in 4.3 entwickelte Protokoll ermöglichte die Charakterisierung der Zellkernfraktion bezüglich des TGA2.1/TGA2.1traD Proteins im Vergleich zum w.t.. Es sollte geklärt werden, ob die überexprimierten TGA-Derivate in den Zellkernen akkumulieren.

Von ausgewählten Pflanzen wurden denaturierte Zellkernproteinextrakte aus Blattgewebe gewonnen. Wie in Abb. 4.13 zu sehen ist, akkumuliert das überexprimierte TGA2.1-Protein im Zellkern. Die Steigerung der TGA2.1-Menge ist vergleichbar zu den im Gesamtzellextrakt detektierten Mengen (Abb. 4.8). Eine genaue quantitative Aussage über Überexpressionsfaktoren von TGA2.1 im Vergleich zum w.t. in den einzelnen Extrakten ist mit der Methode des Western-Blots nicht möglich. Die Abbaubanden in den Spuren 3 und 4 der Abb. 4.13, a) und b) tauchten nach langen Expositionen bei den N-terminal gekürzten Linien auf. Das überexprimierte Volllängenprotein (Abb. 4.13 b), Spuren 5 und 6) bzw. die TGA2.1traD-Variante (Abb. 4.13 a) und b), Spur 2) zeigt keine Degradationsanfälligkeit. Es ist daher anzunehmen, dass der Abbau nicht auf den fusionierten Strep-Tag oder auf die Mutation in der basischen Domäne zurückzuführen ist. Das verhältnismäßig schwache Signal des TGA2.1-Proteins in der traD-Linie (Abb. 4.13 b), Spur 2) ist nicht repräsentativ und ist vermutlich auf eine unvollständige Benetzung der PVDF-Membran mit der 'ECL+'-Entwicklungslösung bei der Signaldetektion zurückzuführen.

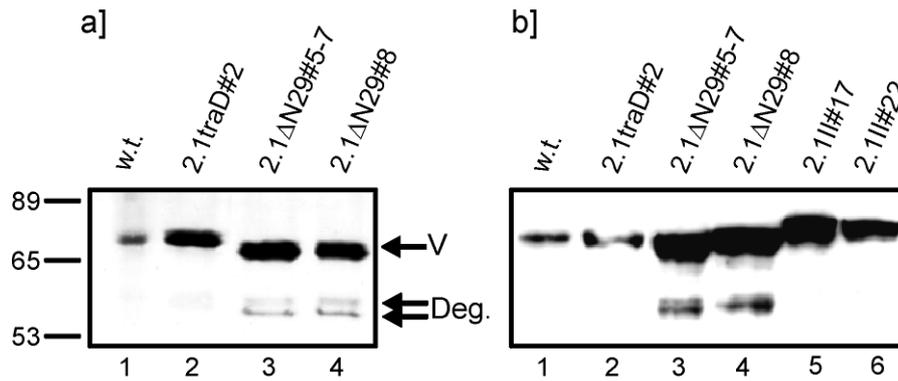


Abb. 4.13: Immunochemische Analyse auf TGA2.1 von denaturierten Zellkernproteinextrakten aus Tabakblättern von w.t. und transgenen Pflanzen. Nach Elektrophorese und Transfer von abgeglichenen Mengen (3.13.2) Zellkernprotein (3.11.1) auf PVDF-Membran wurde der AK anti-TGA2.1 N-term zur Detektion von TGA2.1 verwendet. a) und b) stellen unabhängige Versuche dar. Der Molekulargewichtsstandard ist links in kDa angezeigt. Die Volllängenbande ist mit 'V' (Pfeil) markiert und die abgebaute(n) Bande(n) mit 'Deg.' (Pfeile).

Native Zellkernextrakte (3.11.2), die für die Gelshiftanalyse (siehe 4.5) gewonnen wurden, wurden ebenfalls immunochemisch untersucht (Abb. 4.14). Die Degradation von TGA2.1 konnte dabei nicht unterbunden werden. Die transgenen Pflanzen TGA2.2UE#8 (analog zu TGA2.1/II) und TGA2.2traD#8 (analog zu TGA2.1traD) wurden in die Untersuchung mit einbezogen (Pflanzen beschrieben in Niggeweg, 1999), denn eine gegenseitige Regulation der TGA-Faktoren untereinander im uninduzierten Zustand erschien durchaus möglich. Die Effekte auf die Zielpromotoren der TGA-Subfamilie (siehe 4.7) können aufgrund von Heterodimerisierung und möglicher gegenseitiger Regulation nur im Gesamtkontext geklärt werden. Die TGA2.1-Mengen sind in den transgenen Linien TGA2.2traD#8 und 2.2UE#8 auf dem w.t.-Niveau (Abb. 4.14, Spuren 1, 4 und 5). Eine deutliche Steigerung von TGA2.1-Mengen in den Zellkernen ist bei der Linie TGA2.1traD#2 zu sehen (Abb. 4.14, Spur 2), welche von den Mengen TGA2.1 in der Pflanze TGA2.1II#22 übertroffen wird (Abb. 4.14, Spur 3). Diese Ergebnisse korrespondieren sehr gut mit den immunochemischen Daten aus denaturierten Zellkernproteinextrakten (Abb. 4.13) in Bezug auf die TGA2.1-Mengen im Zellkern.

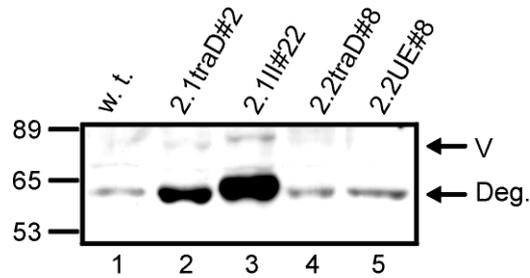


Abb. 4.14: Immunochemische Analyse auf TGA2.1 von nativen Zellkernproteinextrakten aus Tabakblättern von w.t. und transgenen Pflanzen. Nach Elektrophorese und Transfer von 8 μ g Zellkernprotein (3.11.2) auf PVDF-Membran wurde der AK anti-TGA2.1 N-term zur Detektion von TGA2.1 verwendet. Alle Proteinextrakte wurden parallel aufgereinigt. Die zugehörigen Pflanzenlinien sind oberhalb und der Molekulargewichtsstandard ist links in kDa angezeigt. Die Volllängenbande ist mit 'V' (Pfeil) markiert und die abgebaute(n) Bande(n) mit 'Deg.' (Pfeil).

Wie schon auf transkriptionaler Ebene wurden auch die Kernproteinfraktionen bezüglich ihrer TGA2.2-Mengen immunochemisch untersucht. Wie in Abb. 4.15 zu sehen, ist die Menge an TGA2.2 in den Zellkernen im uninduzierten Zustand nicht verändert. Die scheinbar geringeren Mengen in Spur 9 (Abb. 4.15) waren nicht reproduzierbar (persönliche Mitteilung, Anke Klingebiel) und sind auf experimentelle Schwankungen zurückzuführen oder auf ungleichmäßigen Transfer aufgrund der Randposition. Veränderte Mengen an TGA2.1 haben in den Zellkernen im uninduzierten Zustand keinen Einfluss auf die Expression von TGA2.2.

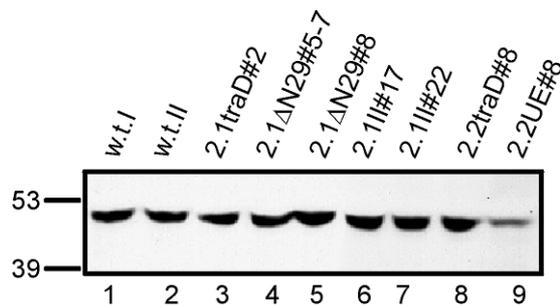


Abb. 4.15: Immunochemische Analyse auf TGA2.2 von Zellkernproteinextrakten aus Tabakblättern von w.t. und transgenen Pflanzen. Nach Elektrophorese und Transfer von abgeglichenen Mengen (3.13.2) Zellkernprotein (3.11.1) auf PVDF-Membran wurde der AK anti-TGA2.2 N-term zur Detektion von TGA2.2 im Western-Blot verwendet. Der Molekulargewichtsstandard ist links in kDa und die Pflanzenlinien oberhalb angezeigt.

4.5 Gelshiftanalyse

4.5.1 Vorarbeiten zur EMSA

Die funktionelle Überprüfung der transgenen Pflanzen erfolgte zunächst durch Gelshift-Analysen. Um Aussagen über die TGA2.1-vermittelten Effekte auf Zielpromotoren (siehe 4.7) treffen zu können, wurden EMSAs sowohl mit Gesamtzellextrakten, als auch mit

Kernproteinextrakten durchgeführt. Hierdurch sollte Aufschluss über die Mengen an TGA2.1 der *as-I*-bindenden Fraktion gewonnen und bestimmt werden, inwiefern im Gesamtzell- bzw. im Zellkernextrakt Veränderungen im EMSA die Effekte auf Zielpromotoren erklären könnten.

Wissend, dass das bis dahin verwendete Proteinaufreinigungsprotokoll für Gesamtzellextrakte (Jupin und Chua, 1996) nicht den Abbau des TGA2.1-Proteins unterband, wurde eine alternative Proteinextraktionsprozedur entwickelt (siehe Methode 3.10.1). Bei Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass der Abbau von TGA2.1 bei den verwendeten Proteinaseinhibitoren bereits während der Zentrifugation stattfand (siehe Abb. 4.16). Eine immunochemische Untersuchung von Gesamtzellextrakten mit der unter 3.10.1 dokumentierten Methode ist in Abb. 4.17 zu sehen. Die Sensitivität des AK reichte nicht aus, um TGA2.1 in den w.t.-Gesamtzellextrakten nachzuweisen (Abb. 4.17, Spur 1). Die Extraktionsmethode ließ den Erhalt von überwiegend vollständigem TGA2.1 zu, wobei in der Spur 2 der Abb. 4.17 auch eine schwache Abbaubande zu erkennen ist.

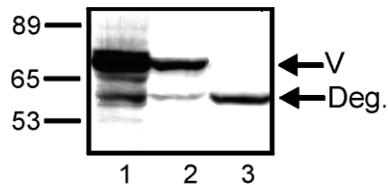


Abb. 4.16: Western-Blot von Gesamtzellextrakten mit dem AK anti-TGA2.1 N-term. Spur 1: 5 μ l Gesamtzellextrakt aus SNN TGA2.1 Δ N29#5-7 (als Referenz für die Volllängenbande). In flüssigem Stickstoff gemörseretes Tabakblattgewebe (100 μ g) aus SNN TGA2.1 Δ N29#5-7 (Spuren 2 und 3) wurde in 200 μ l Puffer (50 mM HEPES pH 7.5, 20 mM KCl, 0.5 mM EDTA, 2.5 mM DTT, 50 μ g/ml Antipain, 0.5 μ g/ml Leupeptin, 2 mM Pefabloc, 4°C) aufgenommen. Der Ansatz in Spur 2 wurde unmittelbar nachdem das Gewebe aufgetaut war, in denaturierendem Harnstoffpuffer aufgenommen, entsprechend der Methode 3.10.2 weiterverarbeitet, und 10 μ l Extrakt wurden für die SDS-PAGE eingesetzt. Der Ansatz in Spur 3 wurde 30 min zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge, 4°C, 15000 Upm), 10 μ l des Überstandes für die SDS-PAGE eingesetzt. Die Volllängenbande ist mit 'V' (Pfeil) markiert und die abgebaute(n) Bande(n) mit 'Deg.' (Pfeil). Der Molekulargewichtsstandard ist links in kDa angezeigt.

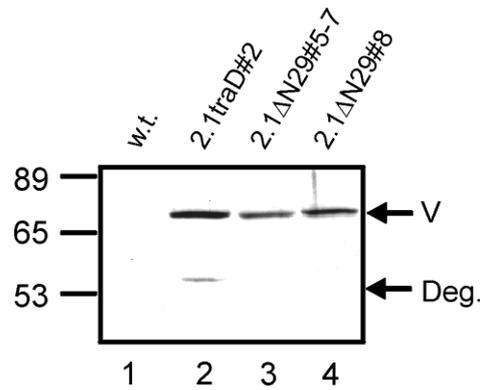


Abb. 4.17: Immunochemische Analyse von Gesamtzellproteinextrakten. Nach Elektrophorese und Transfer von 25 μ g Protein auf PVDF-Membran wurde der AK anti-TGA2.1 N-term zur Detektion von TGA2.1 im Western-Blot verwendet. Die Pflanzen, aus denen die Proteinextrakte entstammten, sind oberhalb der Spuren angegeben. Die Volllängenbande ist mit 'V' markiert (Pfeil) und die abgebaute Bande mit 'Deg' (Pfeil). Der Molekulargewichtsstandard ist links in kDa angezeigt.

Zunächst wurden EMSAs durchgeführt, in welchen die Qualität der Proteinextraktionsmethoden (Jupin und Chua, 1996; 3.10.1) und des *in vitro*-Translatats bezüglich des Bindungsverhaltens an das *as-1*-Element miteinander verglichen werden konnten (Abb. 4.18). In den Spuren 2 und 3 der Abb. 4.18 ist eine schwache Bande zu sehen (siehe Pfeil 2 in der Abb. 4.18.), die im *in vitro*-Translatat das TGA2.1/2.2-Heterodimer darstellt (Niggeweg, 1999; Niggeweg et al., 2000b). Der AK anti-TGA2.1 N-term in Spur 4 führt zu einem Supershift dieser Bande. Ob der AK anti-TGA2.2 N-term (Spur 5) die Bande ebenfalls weiter retardiert, kann nicht eindeutig gesagt werden, da der Hintergrund im entscheidenden Bereich zu stark ist. Die beschriebene Zwischenbande (Pfeil) deutet auf einen Proteinextrakt hin, in dem das TGA2.1 wenigstens in Teilen im Gelshift in der nicht degradierten Form vorliegt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass Teile der TGA2.1-Fraktion während der EMSA-Bindereaktion und/oder des Laufes degradiert werden. Die immunochemischen Daten (Abb. 4.17) belegen nur, dass das Volllängenprotein am Anfang des EMSA vorliegt. Trotz dieser letzteren Einschränkung wurde eine Verminderung des TGA2.1-Abbaus im Proteinextrakt erreicht.

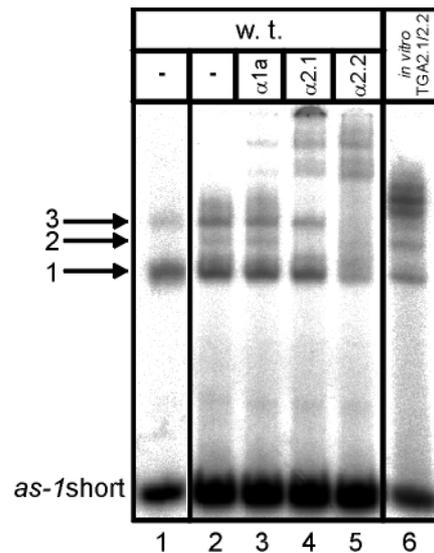


Abb. 4.18: EMSA zum Vergleich von SNN w.t.-Proteinextrakten mit *in vitro*-Translationsprodukten. In Spur 1 wurden 30 µg Protein der Jupin-Methode geladen, in den Spuren 2-5 jeweils 20 µg der Methode (3.10.1), in Spur 5 1.5 µl von *in vitro*-Translationsprodukten der mRNA von TGA2.1/2.2. In den Spuren 3-5 wurde 1 µl der Antiseren anti-TGA1a N-term (α 1a, Spur 3), anti-TGA2.1 N-term (α 2.1, Spur 4) und anti-TGA2.2 N-term (α 2.2, Spur 5) zugefügt. Bei den *in vitro*-Translationsprodukten (Spur 6) markiert der Pfeil '1' die Einfachbesetzung des *as-1*-Elementes durch ein TGA2.2-Dimer, der Pfeil '2' die Einfachbesetzung des *as-1*-Elementes durch ein TGA2.1/2.2-Heterodimer und der Pfeil 3 die Doppelbesetzung des *as-1*-Elementes durch TGA2.2-Dimere. Bei den Gesamtzellextrakten markiert der Pfeil '1' die Einfachbesetzung, der Pfeil '3' Doppelbesetzung des *as-1*-Elementes und der Pfeil '2' die Einfachbesetzung durch ein TGA2.1/2.2-Heterodimer. Die über Pfeil drei liegenden Banden in den Spuren 4 und 5 stellen die mit dem AK retardierten Banden dar, bei welchen eine eindeutige Zuordnung von Einfach- und Doppelbesetzung nicht mehr möglich ist. Die Abb. wurde aus drei Experimenten zusammengestellt, was durch die vertikalen Balken gekennzeichnet ist. Die Bedingungen der einzelnen Experimente waren identisch. Die nicht retardierte Sonde ist mit '*as-1 short*' angezeigt.

4.5.2 EMSA der transgenen Pflanzen im Vergleich zum w.t.

Zur weiteren Analyse der transgenen Pflanzen wurden von ausgewählten Linien Gesamtzellextrakte (3.10.1) sowie Kernproteinextrakte (3.11.2) gewonnen. Damit sollten Aussagen über die Stärke des bindenden Anteils im Gesamtzellextrakt sowie in der Zellkernfraktion im EMSA gewonnen werden und das Homo- bzw. Heterodimerisierungsverhalten bestimmt werden.

Da die oben beschriebene Degradationsanfälligkeit des TGA2.1-Proteins in Kernextrakten für native Proteinlösungen weiter bestand (siehe Abb. 4.14), wurden die hier dargestellten Kernproteinfraktionen im Gelshift alle in einer parallelen Präparation extrahiert. Diesem experimentellen Ansatz lag die Absicht zugrunde, Proteinfraktionen untereinander zu vergleichen, die annähernd identisch aufbereitet wurden. Um die Schwankung zwischen Kernproteinextrakten von Pflanzen mit identischem genomischen Hintergrund abschätzen zu können, wurden Extrakte zweier unabhängiger w.t.-Pflanzen analysiert. Zunächst werden die

EMSA-Experimente qualitativ beschrieben, bevor eine unter 4.5.3 quantitative Auswertung von allen Experimenten erfolgt.

Der Vergleich von nativen w.t.- mit TGA2.1 Δ N29-Gesamtzellproteinextrakten (Abb. 4.19) zeigt eine deutliche qualitative und quantitative Veränderung des Verhaltens im EMSA. Zunächst ist eine Verstärkung des Gesamtshifts in der TGA2.1 Δ N29#5-7-Pflanze im Vergleich zum w.t. zu beobachten (Spur 1 zu 4). Diese Verstärkung wird begleitet von einer weiteren Retardation in Spur 4 im Vergleich zu Spur 1. Letzteres lässt sich mit dem höheren Anteil an TGA2.1 erklären, der das Migrationsverhalten aufgrund der Größe in diese Richtung verändert. Des weiteren sieht man in Spur 5 einen sehr viel stärkeren Supershift, was auf einen sehr viel höheren TGA2.1-Anteil im ASF-1-Komplex schließen lässt. Die erhöhten Mengen an TGA2.1 Δ N29-Protein finden sich zumindest in Teilen in der bindenden Fraktion wieder. Die Quantifizierung aller EMSA Daten wird in den Tab. 4.2 bis Tab. 4.4 zusammengefasst.

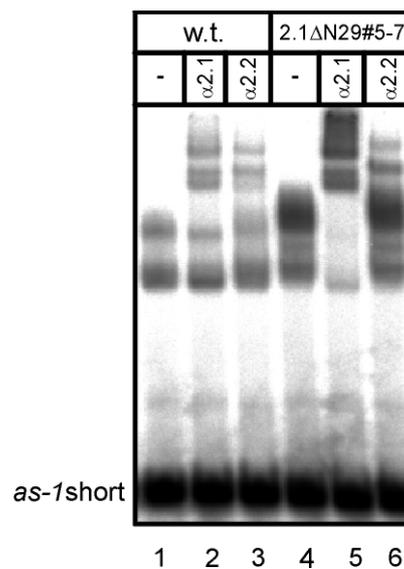


Abb. 4.19: Vergleich im EMSA von w.t.- (Spur 1-3) mit TGA2.1 Δ N29#5-7-Proteinextrakten (Spuren 4-6). 20 μ g Protein von Gesamtzellextrakten (3.10.1) wurden pro Spur geladen und 1 μ l der Antiseren anti-TGA2.1 N-term (α 2.1, Spur 2 und 5) und anti-TGA2.2 N-term (α 2.2, Spur 3 und 6) wurden wie angezeigt hinzugefügt. Die nicht retardierte Sonde ist mit 'as-1 short' angezeigt. Das Bandenmuster entspricht dem der Abb. 4.18.

In der Abb. 4.20 sind Gelshiftanalysen von Gesamtzellextrakten (Abb. 4.20 a]) und Kernproteinfraktionen (Abb. 4.20 b]) von den transgenen Linien TGA2.1traD#2 und TGA2.1II#22 zu sehen. Während die Expression des TGA2.1traD-Proteins in der Gesamtzellproteinfraktion zu einer deutlichen Abschwächung der retardierten Banden führt (Abb. 4.20 a] Spur 4-6), ist dies bei den Zellkernproteinen nicht zu beobachten (Abb. 4.20 b] Spur 4-6). Die Überexpression des Volllängenproteins führt zu einer Verstärkung der retardierten Fraktion sowohl in Gesamtzell- (Abb. 4.20 a] Spur 7-9) als auch in

Kernproteinextrakten (Abb. 4.20 b] Spur 10-12). Die Veränderung des Shifts ist auf einen höheren Anteil an TGA2.1 in der bindenden Fraktion im ASF-1 zurückzuführen (Abb. 4.20 a] Spur 8 im Vergleich zu Spur 2; bzw. b] Spur 11 im Vergleich zu Spur 8).

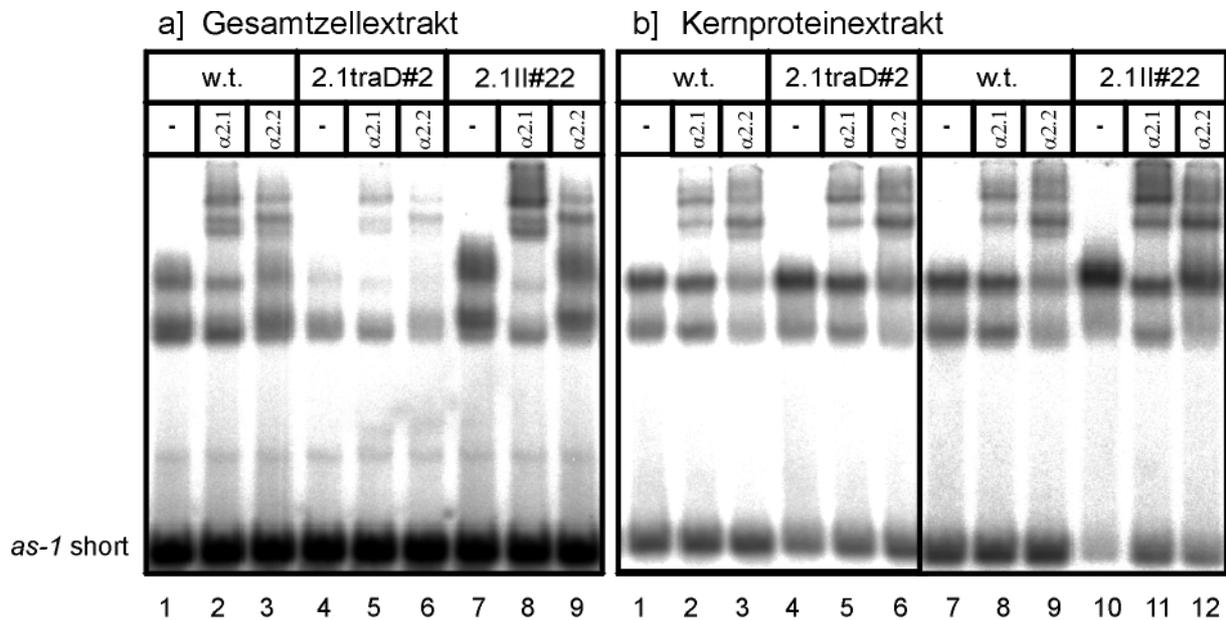


Abb. 4.20: Vergleich im EMSA von w.t.- mit TGA2.1traD#2- und TGA2.1II#22-Proteinextrakten. In a] waren 20 µg Gesamtzellproteinextrakt (3.10.1) pro Spur geladen und 1 µl der Antiseren anti-TGA2.1 N-term (α2.1, Spur 2, 5 und 8) und anti-TGA2.2 N-term (α2.2, Spur 3, 6 und 9) wurden wie angezeigt hinzugefügt. In b] waren 3 µg Kernprotein (3.11.2) pro Spur appliziert und 1 µl der Antiseren anti-TGA2.1 N-term (α2.1, Spur 2, 5, 8 und 11) und anti-TGA2.2 N-term (α2.2, Spur 3, 6, 9 und 12) wurden wie angezeigt hinzugefügt. Die nicht retardierte Sonde ist für beide Teile der Abb. rechts mit 'as-1 short' angezeigt. Das Bandenmuster entspricht dem der Abb. 4.18.

In der Abb. 4.21 sind Gelshiftanalysen von Gesamtzellextrakten (3.10.1, Abb. 4.21 a]) und Kernproteinfraktionen (Abb. 4.21 b]) von den transgenen Linien TGA2.2traD#8 und TGA2.2UE#8 zu sehen. Eine Abschwächung des retardierten Sondenanteils ist bei der transdominanten Suppressorpflanze TGA2.2traD im Vergleich zu den w.t.-Spuren sowohl im Gesamtzellextrakt, als auch im Zellkernproteinextrakt deutlich zu erkennen (3.11.2 a] und b] Spuren 4-6 im Vergleich zu Spuren 1-3). Der relative Anteil von TGA2.1 bzw. TGA2.2 im ASF-1-Komplex, erkennbar in der stärker durch den AK retardierten Fraktion der Spuren 5 und 6 (Abb. 4.21 a] und b]) im Vergleich zu den korrespondierenden Banden des w.t., scheint nicht substantiell geändert zu sein. Bei der TGA2.2-überexprimierenden Pflanze kommt es zu einer Verstärkung des retardierten Sondenanteils (Abb. 4.21 a] und b] Spuren 7-9). Der verstärkende Retardationseffekt wirkt sich nicht auf den TGA2.1-supergeshifteten Anteil aus (Abb. 4.21 a] und b] Spur 8 im Vergleich zu Spur 2 des w.t.).

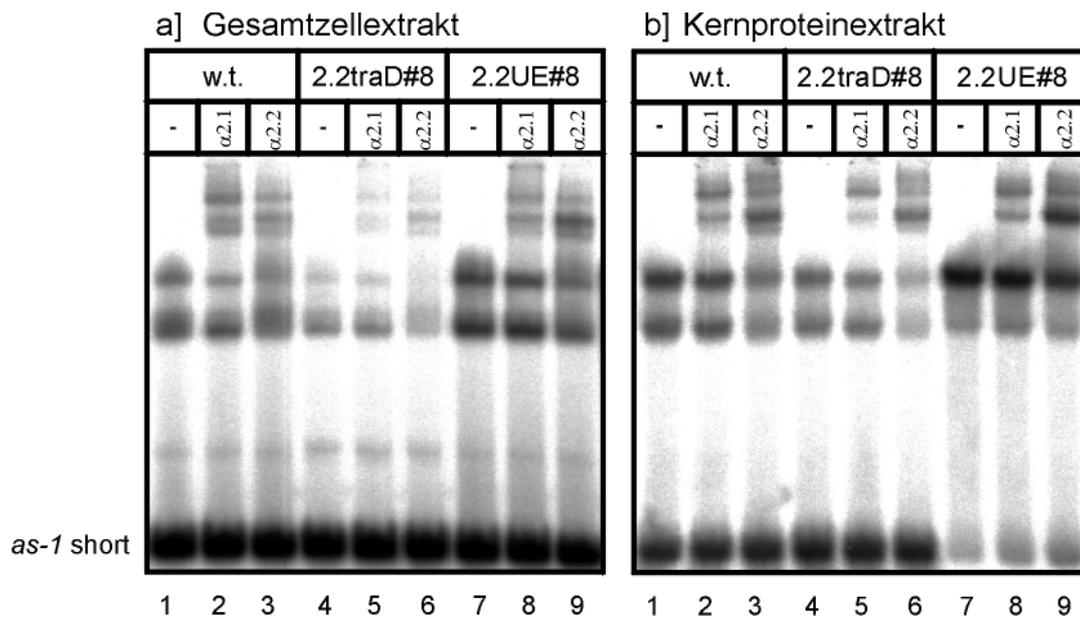


Abb. 4.21: Vergleich im EMSA von w.t.- zu TGA2.2traD#8- und TGA2.2UE#8-Proteinextrakten. In a) waren 20 μg Gesamtzellproteinextrakt pro Spur geladen und 1 μl der Antiseren anti-TGA2.1 N-term ($\alpha 2.1$, Spur 2, 5 und 8) und anti-TGA2.2 N-term ($\alpha 2.2$, Spur 3, 6 und 9) wurden wie angezeigt hinzugefügt. In b) waren 3 μg Kernprotein pro Spur aufgetragen und 1 μl der Antiseren anti-TGA2.1 N-term ($\alpha 2.1$, Spur 2, 5 und 8) und anti-TGA2.2 N-term ($\alpha 2.2$, Spur 3, 6 und 9) wurden wie angezeigt hinzugefügt. Die zugehörigen Pflanzenlinien sind oberhalb angezeigt. Die nicht retardierte Sonde ist für beide Teile der Abb. rechts mit 'as-1 short' angezeigt. Das Bandenmuster entspricht dem der Abb. 4.18.

4.5.3 Quantitative Auswertung der EMSA

Bei den EMSA sind folgende Einschränkungen zu machen, unter welchen die quantitativen Aussagen dieser Analyse zu sehen sind. Die ASF-1-Aktivität der Zellkernproteinextrakte war unerwartet hoch (siehe Diskussion), so dass die Zugabe von 3 μg Protein bereits in einzelnen Fällen ausreichte, um die Sonde vollständig zu retardieren. Somit könnte der verstärkende Effekt der ASF-1-Aktivität in den Linien TGA2.1II#22 und TGA2.2UE#8 stärker ausfallen. Des weiteren besaß das anti-TGA2.2 N-term-Antiserum in den hier dokumentierten EMSA nicht mehr die beschriebene Aktivität (Niggeweg, 1999). Quantitative Aussagen mit Hilfe des anti-TGA2.1 N-term-AK können deshalb nicht gemacht werden.

Tab. 4.2: Vergleich des relativen retardierten Anteils im EMSA zwischen w.t. und transgenen Pflanzen. Die Quantifizierung der Signale wurde wie unter 3.16.1 beschrieben vollzogen. Werte, die mit einem Sternchen (*) versehen sind, stellen potentiell unterbewertete Effekte aufgrund der oben im Text beschriebenen Einschränkungen dar. Ausgewertet wurden die Gele der Abb. 4.19 bis Abb. 4.21.

Pflanzenlinie (SNN)	rel. retardierter Anteil	
	Gesamtzell- proteinextrakt	Zellkern- proteinextrakt
w.t.	1.0	1.0
2.1traD#2	0.2	1.6
2.1ΔN29#5-7	3.7	n. d.
2.1II#22	1.8	2.5*
2.2traD#8	0.2	0.4
2.2UE#8	2.7	2.8*

Die transgenen Linien haben in den Gesamtzellfraktionen die erwartete Auswirkung im EMSA (Tab. 4.2). Bei den transdominanten Suppressorpflanzen sinkt das retardierte Signal auf 20% des w.t.-Signals, während sich bei den Überexpressionslinien ohne Mutation in der basischen Domäne ein Anstieg des Anteils der retardierten Sonde zeigt. Der Effekt bei der TGA2.1II#22-Pflanze ist mit dem 1.8^{fachen} des w.t.-Signals nur halb so stark wie bei der Deletionsvariante (3.7^{fach}), während die TGA2.2UE-Pflanze zwischen beiden liegt (2.7^{fache} des w.t.-Signals).

Bei Zellkernproteinextrakten drückt nur die TGA2.2traD-Pflanze das EMSA-Signal, während die TGA2.1traD Pflanze mit dem 1.6^{fachen} leicht über dem w.t.-Signal liegt. Die Pflanzen TGA2.1II#22 und TGA2.2traD#8 heben das Signal im EMSA um mindestens das 2.5^{fache}.

Vergleicht man Gesamtzell- und Zellkernextrakte, so sind die Auswirkungen der einzelnen TGA-Derivate sehr unterschiedlich. Bei den TGA2.2-Konstrukten gibt es keine wesentliche Differenz im EMSA zwischen den Proteinfraktionen. Im Gegensatz dazu steht die Pflanze TGA2.1II#22, bei welcher die verstärkte Sondenretardierung im Zellkernextrakt signifikant höher ausgeprägt ist als im Gesamtzellextrakt ist. Völlig divergent ist das EMSA-Verhalten bei der Pflanze TGA2.1traD. Die stark supprimierende Wirkung des TGA2.1traD-Konstrukts auf den ASF-1 Komplex im Gesamtzellextrakt ist im Zellkernextrakt nicht zu beobachten, das Signal ist dort tendenziell verstärkt.

Der Supershift ermöglicht eine feinere Analyse der Effekte in sofern als er eine genauere Aussage über das spezifische Protein erlaubt, welches den Retardationseffekt hervorruft und

in welchem Anteil. Die quantifizierten und in Relation zu den w.t.-Signalen gesetzten Ergebnisse sind in Tab. 4.3 zu sehen. Die Überexpression von TGA2.1 in der vollen Länge oder in der gekürzten Version führt zu einer deutlichen Verstärkung der durch den TGA2.1-AK verursachten Sondenretardation. Im Gesamtzellextrakt beträgt der relative Anstieg des retardierten Anteils im EMSA in den TGA2.1II#22-Extrakten das 2.7^{fache} und in den TGA2.1ΔN29#5-7-Extrakten das 5.7^{fache}. Der Anstieg in Zellkernextrakten fällt mit dem 4.8^{fachen} bei dem TGA2.1II#22-Extrakt stärker aus als der im Gesamtzellextrakt. Bei der TGA2.2UE#8-Pflanze schwanken die Werte der TGA2.1-Supershiftanalyse in beiden Proteinextrakten um den w.t.-Wert (0.7- bzw. 1.2^{fach}). Beide TGA-transdominanten Suppressor-Pflanzen drücken den TGA2.1-AK-retardierten Anteil auf das 0.1^{fache} im Gesamtzellextrakt. Der drückende Effekt ist beim Zellkernextrakt der Linie TGA2.2traD#8 mit dem 0.4^{fachen} weniger ausgeprägt und beim TGA2.1traD Zellkernextrakt kommt es sogar zu einer leichten Steigerung des TGA2.1-AK retardierten Anteils (1.5^{fache}). Die ausbleibende Abschwächung ist im Zusammenhang mit den hohen Mengen an TGA2.1traD-Protein im Zellkern zu interpretieren (Abb. 4.13).

Tab. 4.3: Supershiftanalyse von Proteinextrakten in der EMSA mit dem AK anti-TGA2.1 N-term. Die Quantifizierung der Signale wurde wie unter 3.16.1 beschrieben vollzogen. Verglichen werden die mit dem AK retardierten Signale zwischen w.t. (= 1.0) und den transgenen Proteinextrakten. Ausgewertet wurden die Gele der Abb. 4.19 bis Abb. 4.21.

Pflanzenlinie (SNN)	rel. Retardierung	
	anti-TGA2.1-Shift im Gesamtzellextrakt	anti-TGA2.1-Shift im Zellkernproteinextrakt
w.t.	1.0	1.0
2.1traD#2	0.1	1.5
2.1ΔN29#5-7	5.7	n.d.
2.1II#22	2.7	4.8
2.2traD#8	0.1	0.4
2.2UE#8	0.7	1.2

Die Auswertung des Anteils, der durch den AK retardiert wurde, ist analog zu der von R. Niggeweg (Dissertation 1999) zu sehen. Hierüber lassen sich Aussagen machen, in welchem Maße das TGA-Protein, gegen das sich der AK richtet, in der retardierten Fraktion enthalten ist. Im Gesamtzellextrakt weichen nur die Pflanzen TGA2.1traD, TGAΔN29#5-7 und TGA2.2UE signifikant vom w.t.-Wert ab (Tab. 4.4). Bei den TGA2.1-überexprimierenden Pflanzen kommt es zu einer Verdopplung des TGA2.1-retardierten Anteils in der gesamtretardierten Fraktion, während es in der TGA2.2-überexprimierenden Pflanze zur Halbierung des TGA2.1-Anteils sowohl im Gesamtzell- wie auch im Zellkernextrakt kommt.

In Zellkernextrakten weicht sonst nur noch der Wert der Pflanze TGA2.1II von dem des w.t.-ab mit dem 2.5^{fachen} des w.t.-Wertes.

Tab. 4.4: Supershiftanteil von Proteinextrakten in der EMSA in Relation zum Gesamtshift (AK anti-TGA2.1 N-term). Die Quantifizierung der Signale wurde wie unter 3.16.1 beschrieben vollzogen. Es wurde der Quotient aus dem supergeschifteten Anteil und dem gesamtgeschifteten Anteil ermittelt.

Pflanzenlinie (SNN)	anti-TGA2.1-Shift Anteil; Gesamtzellextrakt	anti-TGA2.1-Shift Anteil; Zellkernproteinextrakt
w.t.	0.40	0.24
2.1traD#2	0.38	0.27
2.1ΔN29#5-7	0.88	n.d.
2.1II#22	0.79	0.60
2.2traD#8	0.27	0.28
2.2UE#8	0.17	0.13

4.6 SA-Induktion: Untersuchungen von Zellkernproteinextrakten

Die Genexpression in Tabak durch die Induktion von SA wird zeitlich unterteilt in 'immediate early genes' und in 'late genes' (Horvath und Chua, 1996; Qin et al., 1994). Bei der Genexpression, die im Zeitfenster von 1-4 h abläuft, wird dem Transkriptionsfaktor TGA eine Rolle zugeteilt, die unabhängig von der Proteinbiosynthese ist (Horvath et al., 1998; Qin et al., 1994). Die TGA2.1-vermittelte Transkriptionsaktivierung (siehe weiter unten 4.7.1) in dem Zeitraum $t = 1-4$ h nach Zugabe von SA könnte auf unterschiedlichen Mechanismen beruhen (siehe Einleitung). Es ist bekannt, dass TGA2.1 und TGA2.2 zum Zeitpunkt 0 kein Aktivierungspotential über das isolierte *as-1*-Element auf das Reporter-gen GUS haben (persönliche Mitteilung, I. Lenk). Um zu klären, ob im Laufe der SA-Induktion die Änderung des TGA2.1-vermittelten Aktivierungspotentials über Zellkernakkumulation von TGA2.1 geschieht, wurden bei einer SA-Induktion Zellkernproteinextrakte von Tabakblättern gewonnen und immunochemisch untersucht. Die Akkumulation von NPR1 durch die Gabe von INA, einem SA-Analogon, wurde beschrieben (Kinkema et al., 2000). Wie bei den TGA-Faktoren finden sich Teile des NPR1-Proteinpools im uninduzierten Zustand im Zellkern und der Rest im Cytosol. Im Falle von NPR1 führt der Induktor zur ausschließlichen Lokalisation im Zellkern (Kinkema et al., 2000).

Wie aus der Abb. 4.22 hervorgeht, ist kein Anstieg der Mengen von TGA2.1 im Zellkern als Reaktion auf SA-Applikation zu beobachten, weder beim w.t. (Abb. 4.22 a) noch bei transgenen Pflanzen (Abb. 4.22 b). Tendenziell sinkt die Menge an TGA2.1 im w.t. bei der SA-Induktion zu den Zeitpunkten $t = 2$ h und $t = 4$ h (Abb. 4.22 a) Spuren 3 und 4 im

Vergleich zu den Spuren 5-8). Auch bei den transgenen Pflanzen TGA2.1traD#2 und TGA2.1III#22 kann ein Anstieg der TGA2.1-Menge im Zellkern als Reaktion auf die SA-Induktion im untersuchten Zeitraum ausgeschlossen werden (Abb. 4.22 b]).

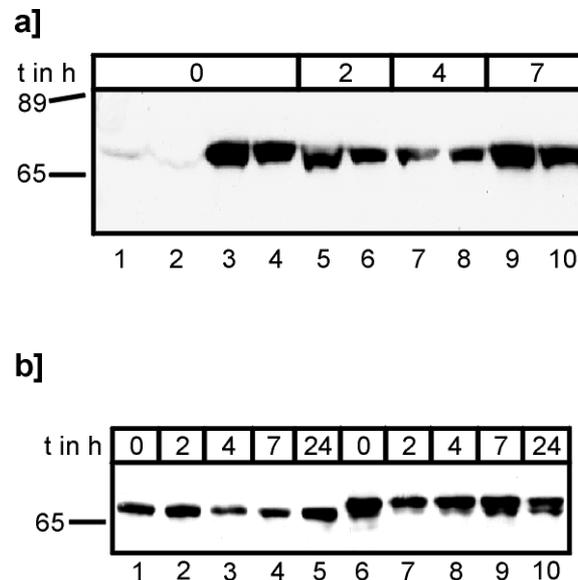


Abb. 4.22: Immunochemische Analyse von denaturierten Zellkernproteinextrakten (3.11.1) aus Tabakblättern einer SA-Induktionsreihe auf TGA2.1. Die Zellkernproteine wurden zum angegebenen Zeitpunkt nach der Induktion mit 1 mM SA extrahiert. Nach Elektrophorese und Transfer von abgeglichenen Mengen Zellkernprotein (3.13.2) auf PVDF-Membran wurde der AK anti-TGA2.1 N-term zur Detektion von TGA2.1 verwendet. In der Abb. a) sind w.t.-Proteinextrakte von zwei unabhängigen Pflanzen untersucht: w.t. I in Spuren 1, 3, 5, 7 und 9; w.t. II in Spuren 2, 4, 6, 8, und 10. Denaturierte Gesamtzellextrakte sind als Referenz in den Spuren 1 und 2 und Zellkernproteinextrakte in den Spuren 3-10 aufgetragen. In der Abb. b) sind die Zellkernproteinextrakte transgener Pflanzen TGA2.1traD#2 (Spuren 1-5) und TGA2.1III#22 (Spuren 6-10) einer SA-Induktionsreihe untersucht. Der Molekulargewichtsstandard ist links in kDa angezeigt

4.7 Das transkriptionale Aktivierungspotential von TGA-Faktoren in Induktionsversuchen

Zum Verständnis der Rolle der TGA-Transkriptionsfaktoren bei der Transkriptionsaktivierung der Gene *Nt103*, *parA*, *IEGT* und *PR1a*, welche alle ein *as-I*-Promotorelement enthalten, wurden Induktionsversuche mit Tabakblättern von w.t. und den transgenen Pflanzen TGA2.1III, TGA2.1traD, TGA2.1ΔN29, TGA2.2UE und TGA2.2traD durchgeführt. Dabei wurde die jeweilige Antwort auf die Signalstoffe Methyljasmonat (MeJA), Salizylsäure (SA) und das Auxin-Analogon 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) untersucht. Die zentrale Frage war, wie Veränderungen zellulärer Mengen der verschiedenen TGA-Proteine die Stärke und das zeitliche Profil der Transkription der Zielgene im Gesamtpromotorkontext beeinflussen.

4.7.1 Der Einfluss von TGA-Faktoren auf *Nt103* bei Salizylsäure-Induktionsversuchen

Dem Phytohormon Salizylsäure wird eine wichtige Rolle bei der Pathogenabwehr und bei der Ausbildung der systemisch angeeigneten Resistenz zugewiesen. SA wurde verwendet, um das Transkriptionsprofil bei Pathogenangriff zu simulieren und somit analysieren zu können. Zunächst wurde das Transkriptionsprofil von *Nt103* im w.t.-Gewebe experimentell bestimmt.

In Abb. 4.23 ist ein repräsentativer Verlauf einer SA-Zeitreihe des *Nt103*-Transkriptes bei einer w.t.-Pflanze gezeigt. Die stärksten Signale wurden im Zeitraum $t = 2-5$ h erhalten (Abb. 4.23, Spur 3-5). Für den Vergleich von w.t.-Pflanzen mit transgenen Pflanzen in Bezug auf das *Nt103*-Signal bei der SA-Induktion wurden die Zeitpunkte 2, 3 und 24 h des w.t. als Standard ausgewählt.

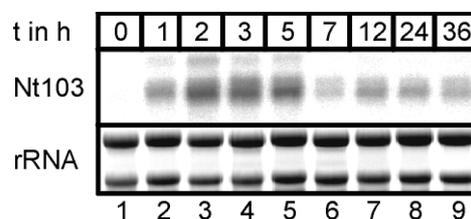


Abb. 4.23: Northern-Blot-Analyse eines SA-Induktionsversuches mit w.t.-Tabakblattgewebe. Die Transkriptionsinduktion in Tabakblattscheiben wurde mit 1 mM SA durchgeführt, Proben zum angegebenen Zeitpunkt entnommen und RNA präpariert (siehe 3.17). 12 μ g Gesamt-RNA wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf Hybond N⁺-Membran transferiert und mit der links angezeigten Sonde *Nt103* hybridisiert. Die im Gelfoto dokumentierte 28S und 18S rRNA (links angezeigt) wurde für den Abgleich der *Nt103*-Signale verwendet (3.9.2).

Um die Schwankungen des GST-Signals der Zeitpunkte $t = 2$ h und 3 h im Verlaufe einer SA-Induktion abschätzen zu können, wurden SA-Zeitreihen mit drei w.t.-Pflanzen durchgeführt und miteinander verglichen (siehe Tab. 4.5). Die RNA des 'w.t. st.' in Tab. 4.5 wurde als Standard-RNA für den w.t. bei den Northern-Blot-Analysen in Abb. 4.24 verwendet.

Tab. 4.5: Vergleich der relativen *Nt103*-Signalstärken im Verlauf einer SA-Induktion mit w.t.-Blattgewebe. Die SA-Induktionen wurde entsprechend der Methode 3.17 durchgeführt, Proben zu den Zeitpunkten $t = 2$ h und 3 h entnommen und RNA präpariert (siehe 3.17). 12 μ g Gesamt-RNA wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf Hybond N⁺-Membran transferiert und mit der Sonde *Nt103* hybridisiert. Die Auswertung der Signalstärke erfolgte entsprechend der Beschreibung in 3.9.2. Die normalisierten Werte der beiden Zeitpunkte wurden addiert, der Wert der w.t.-Standard-RNA (w.t. st.) gleich 1.0 gesetzt. Die Werte der Pflanzen w.t. I und w.t. II wurden auf den w.t. st.-Wert bezogen. Die Standardabweichung der drei Werte ist angegeben.

	w.t. st.	w.t.I	w.t.II	Standard- abweichung
<i>Nt103</i>	1.00	1.01	0.95	+/- 0.032

Die SA-Zeitreihen mit Tabakblattgewebe der Pflanzen TGA2.1 Δ N29#5-7 und TGA2.1traD im Vergleich zum w.t. sind in der Abb. 4.24 gezeigt. Beim direkten Vergleich des Zeitfensters 2-3 h kommt es bei der TGA2.1 Δ N29#5-7-Linie zu einer 5^{fachen} Steigerung gegenüber dem w.t.-*Nt103*-Signal. Betrachtet man den frühen Zeitraum der *Nt103*-Transkription bis $t = 7$ h (Abb. 4.24, a)], so ist das Profil des Transkriptmengenverlaufes über die Zeit nur in der Amplitude betroffen und nicht in einer zeitlichen Veränderung des Profils. Das Expressionsmuster ändert sich nur hinsichtlich der Stärke.

Bei der Pflanze TGA2.1traD#2 ist die gesamte frühe Transkription des Gens *Nt103* reduziert (Abb. 4.24, b]; Spuren 2-5 verglichen mit Spur 10 und 11). Die *Nt103*-Transkriptmenge der Zeitpunkte 2 und 3 h ist im Vergleich zum w.t. auf ein Viertel reduziert (Abb. 4.24, b]). Die in Abb. 4.24 dargestellten Ergebnisse zeigen die Experimente, in denen die Wirkung der Änderung von TGA2.1 auf die *Nt103*-Expression am stärksten ausfiel.

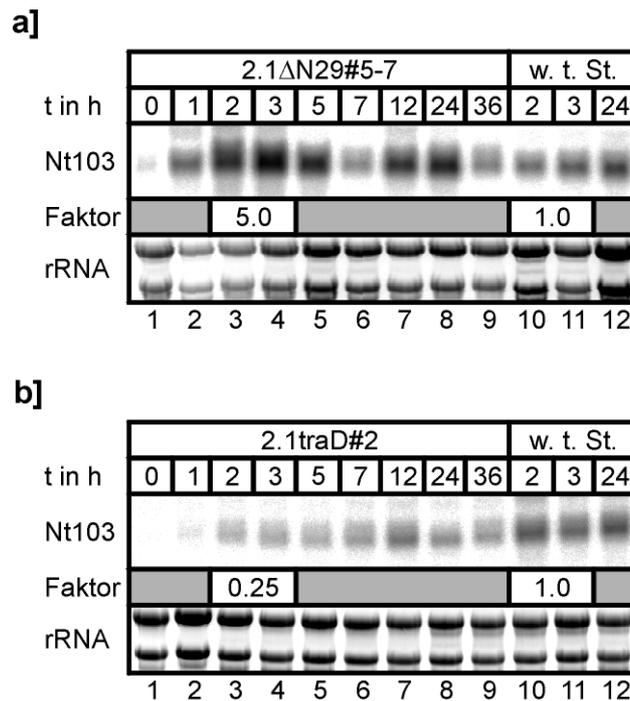


Abb. 4.24: Vergleichende Northern-Blot-Analyse von SA-Zeitserien zwischen w.t. und den Pflanzen a) TGA2.1ΔN29#5-7 und b) TGA2.1traD#2. Die Transkriptionsinduktion in Tabakblattscheiben wurde mit 1 mM SA durchgeführt, Proben zum angegebenen Zeitpunkt entnommen und RNA präpariert (siehe 3.17). 12 µg Gesamt-RNA wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf Hybond N[®]-Membran transferiert und mit der Sonde *Nt103* hybridisiert. Die im Gelfoto dokumentierte 28S und 18S rRNA (links angezeigt) wurden für den Abgleich der *Nt103*-Signale verwendet (3.9.2). Die Pflanzenlinien sind oberhalb angezeigt: a) TGA2.1ΔN29#5-7, w.t. Standard (St.); b) TGA2.1traD#2, w.t. Standard (St.). Zur Berechnung des Faktors wurden die signale abgeglichen und die Werte der Zeitpunkte 2 h und 3 h addiert. Alle so erhaltenen Werte wurden durch den sich bei dem w.t.-Standardspuren ergebenden Wert geteilt.

Da das späte (12-36 h) Transkriptionsprofil von *Nt103* in Reaktion auf SA sehr variabel ist, lässt sich keine Aussage über die Auswirkungen in den transgenen Pflanzen auf dieses Zeitfenster treffen. Aus diesem Grunde wurde die weitere Analyse der SA-Zeitserien aller transgenen Pflanzen auf die Zeitpunkte 2 und 3 h beschränkt.

Bei den folgenden Versuchen wurden alle dargestellten Zeitserien parallel durchgeführt. Dies schließt die vorangegangene Anzucht der Pflanzen ein. Es wurde damit versucht, annähernd identische Versuchsbedingungen zu erhalten. Als interne Referenz wurden die bereits in SA-Zeitserien untersuchten Pflanzen TGA2.2traD#8 und TGA2.2UE#8 ebenfalls im Experiment mitgeführt (Niggeweg et al., 2000a).

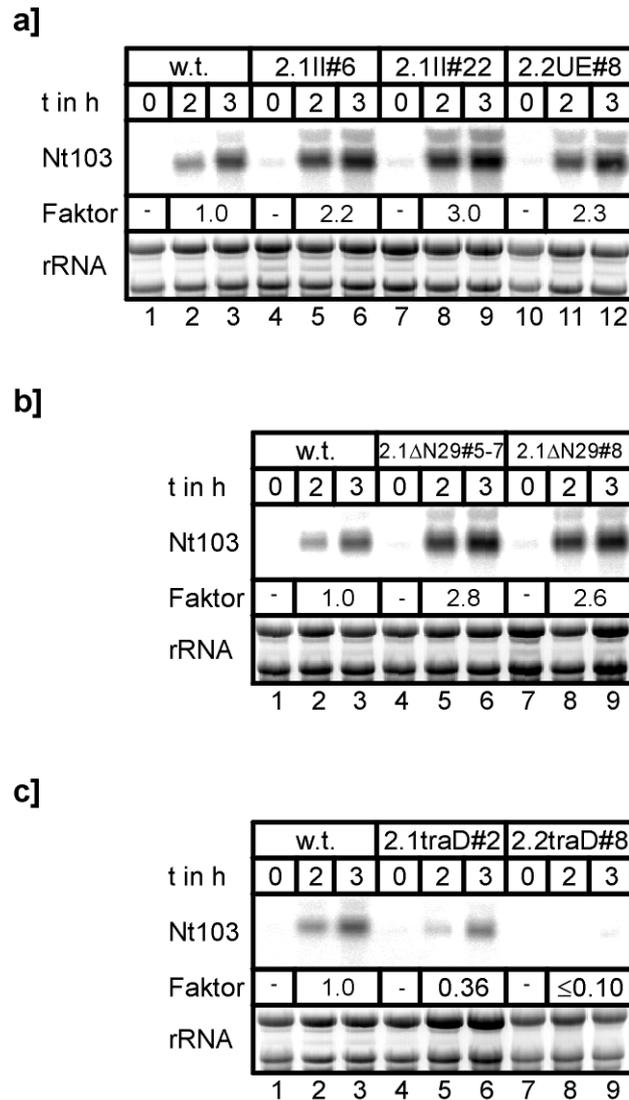


Abb. 4.25: Vergleichende Northern-Blot-Analyse von SA-Zeitreihen zwischen w.t.- und transgenen Pflanzen. Die Transkriptionsinduktion in Tabakblattscheiben wurde mit 1 mM SA durchgeführt, Proben zum angegebenen Zeitpunkt entnommen und RNA präpariert (siehe 3.17). 12 µg Gesamt-RNA wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf Hybond N[®]-Membran transferiert und mit der Sonde *Nt103* hybridisiert. Die im Gelfoto dokumentierte 28S und 18S rRNA (links angezeigt) wurde für den Abgleich der *Nt103*-Signale verwendet (3.9.2). Die Pflanzenlinien sind oberhalb angezeigt: a) w.t., TGA2.1I#6, TGA2.1I#22 und TGA2.2UE#8; b) w.t., TGA2.1ΔN29#5-7, TGA2.1ΔN29#8; c) w.t., TGA2.1traD#2, TGA2.2traD#8. Zur Berechnung des Faktors wurden die signale abgeglichen und die Werte der Zeitpunkte 2 h und 3 h addiert. Alle so erhaltenen Werte wurden durch den sich bei dem w.t.-Standardspuren ergebenden Wert geteilt

Bei SA-Zeitreihen führt die Überexpression der Proteine TGA2.1, TGA2.1ΔN29 und TGA2.2 im untersuchten Zeitraum zu einer Steigerung der *Nt103*-Transkriptmenge (Abb. 4.25 a) bis c)). Ein Unterschied zwischen der Überexpression des TGA2.1-Volllängenproteins und der Überexpression der Deletionsvariante in Tabakblattgewebe bezüglich ihrer Wirkung auf *Nt103* ist bei SA-Zeitreihen nicht zu erkennen. Die transdominanten Suppressorpflanzen drücken beide die *Nt103*-Transkriptmengen während einer SA-Behandlung (Abb. 4.25). In den Abb. 4.24 und Abb. 4.25 sind die Effekte der SA-Behandlung bei transgenen Pflanzen

dokumentiert, wobei die in Abb. 4.24 dargestellten Effekte die maximalen beobachteten darstellen, die in Abb. 4.25 dagegen schwächer ausfielen (siehe Diskussion).

4.7.2 Der Einfluss von TGA-Faktoren auf *Nt103* bei Methyljasmonatgabe

Dem Phytohormon MeJA wird eine wichtige Rolle als Botenstoff bei Verwundungsreaktionen von Pflanzengewebe zugeschrieben. Es wurde verwendet, um ein Transkriptionsprofil analog dem von verwundetem Tabakblattgewebe zu induzieren. Zunächst wurde das Transkriptionsprofil von *Nt103* im w.t.-Gewebe experimentell bestimmt. Ein repräsentativer Northern-Blot ist in Abb. 4.26 zu sehen. Zum Zeitpunkt 0 ist kein *Nt103*-Transkript detektierbar. Ab $t = 2$ h ist Transkript detektierbar, welches über den Zeitraum 3-5 h weiter ansteigt. Nach 7 h fällt das Signal leicht ab, wobei in Spur 10 der Abb. 4.26 ein leicht abweichendes Signalverhalten erkennbar ist. In fünf voneinander unabhängigen MeJA-Experimenten wurde die Transkriptmenge von *Nt103* in Tabakblattgewebe quantifiziert und ausgewertet (Abb. 4.27).

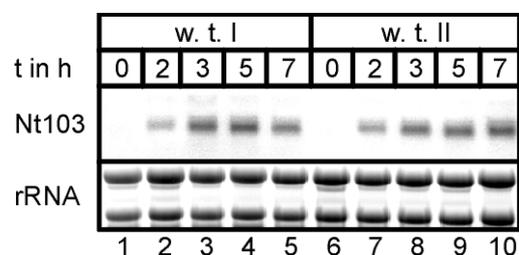


Abb. 4.26: Northern-Blot-Analyse von MeJA-Induktionsversuchen mit Tabakblattgewebe zweier unabhängiger w.t.-Pflanzen (I und II). Die Transkriptionsinduktion in Tabakblattscheiben wurde mit 100 μ M MeJA durchgeführt, Proben zum angegebenen Zeitpunkt entnommen und RNA präpariert (siehe 3.17). 14 μ g Gesamt-RNA wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf Hybond N[®]-Membran transferiert und mit der links angezeigten Sonde *Nt103* hybridisiert. Die im Gelfoto dokumentierte 28S und 18S rRNA wurde für den Abgleich der *Nt103*-Signale verwendet (3.9.2). Die zur Zeitreihe zugehörige w.t.-Pflanze ist oberhalb angezeigt.

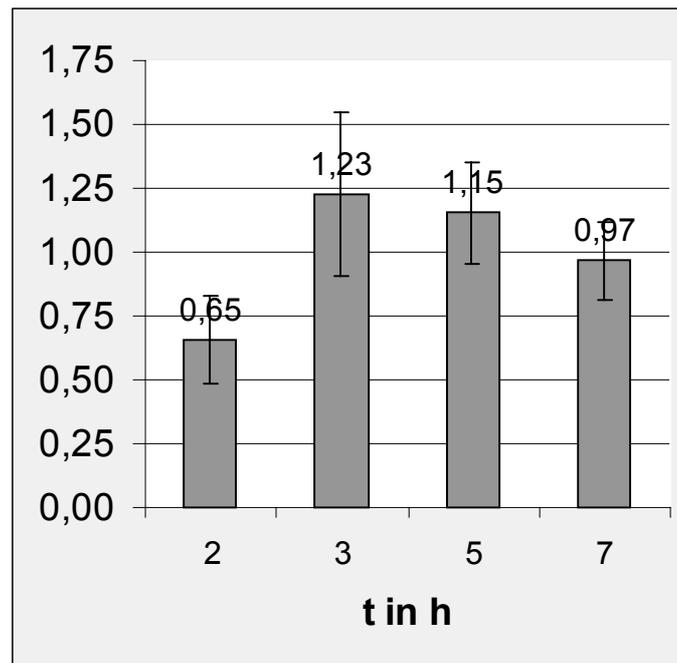


Abb. 4.27: Der zeitliche Verlauf der *Nt103*-Transkriptmenge in MeJA-Induktionsversuchen von w.t.-Tabakblattgewebe. Die Transkriptionsinduktion in Tabakblattscheiben wurde mit 100 μ M MeJA durchgeführt, Proben zum angegebenen Zeitpunkt entnommen und RNA präpariert (siehe 3.17). Gesamt-RNA wurde elektrophoretisch aufgetrennt, auf Hybond N[®]-Membran transferiert, mit der Sonde *Nt103* hybridisiert, die Signale wurden quantifiziert (siehe 3.9.2). Die Grafik zeigt den Mittelwert der relativen Werte der jeweiligen Zeitpunkte berechnet aus fünf unabhängigen Experimenten. Die relativen Werte wurden erhalten, indem der Mittelwert der vier Zeitpunkte ($t = 2, 3, 5$ und 7 h) in jedem Experiment bestimmt und dieser gleich 1.0 gesetzt wurde. Die absoluten Werte der einzelnen Zeitpunkte wurden durch den Mittelwert geteilt, woraus sich die relativen Werte innerhalb einer Zeitreihe ergaben. Dann wurde der Mittelwert der einzelnen Zeitpunkte aus den 5 Experimenten ermittelt und die Standardabweichung berechnet (Standardabweichung als Fehlerbalken in Grafik).

Wie an der Standardabweichung (Abb. 4.27, b)) zu sehen ist, sind die Schwankungen der *Nt103*-Trankriptmenge hoch. In den folgenden MeJA-Induktionsexperimenten mit transgenen Tabakpflanzen wurde w.t.-RNA von MeJA-Experimenten als Standard zum Vergleich aufgetragen.

Aufgrund der starken Schwankungen der *Nt103*-Signale bei MeJA-Induktionen im Tabakblattgewebe konnten statistisch gesicherte Faktoren für die Steigerung bzw. Absenkung des Einflusses des TGA-Pools auf das *Nt103*-Gen mit der Anzahl der durchgeführten Experimente nicht berechnet werden. In Abb. 4.28 werden repräsentative Northern-Blots von vergleichenden MeJA-Zeitreihen mit w.t.- und transgenen Pflanzen gezeigt. Einige qualitative Aussagen lassen sich dennoch treffen.

Beide transdominanten Suppressorpflanzen TGA2.1traD#2 und TGA2.2UE#8 (Abb. 4.28 a]) liegen mit ihren *Nt103*-Transkriptmengen zu allen Zeitpunkten unter den Transkriptmengen der korrespondierenden w.t.-Vergleichsspuren (Abb. 4.28 a] Spur 1-3). Ein qualitativer Unterschied bei MeJA-Induktionsreihen zwischen TGA2.1traD- und TGA2.2traD-Pflanzen war nicht zu erkennen.

Die Überexpression von TGA2.1, TGA2.1ΔN29 und von TGA2.2 führt zu einer Verstärkung des *Nt103*-Signals im Northern-Blot im Vergleich zu den korrespondierenden w.t.-Spuren (Abb. 4.28 b] und c] Spur 1-3), wobei sich das Verhalten der transgenen Überexpressionslinien in ihrer Auswirkung auf das untersuchte Gen qualitativ nicht unterscheidet.

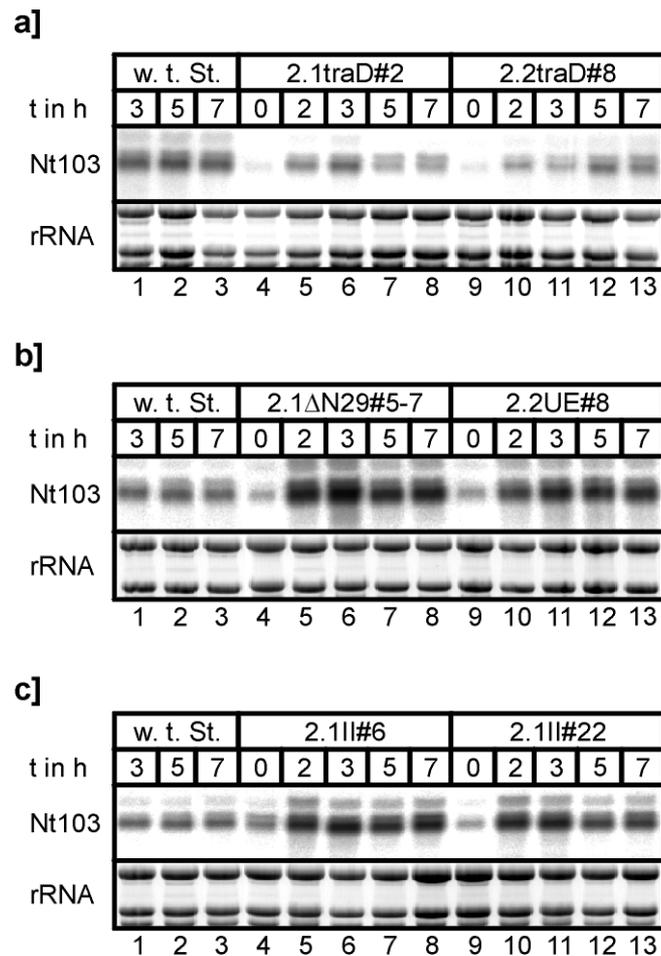


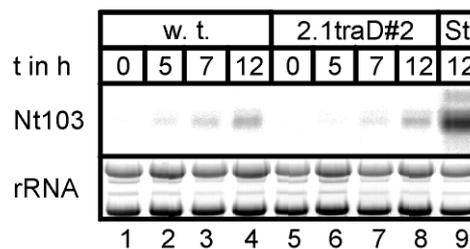
Abb. 4.28: Northern-Blot-Analyse von MeJA-Induktionsversuchen mit Tabakblattgewebe von transgenem Tabak im Vergleich zu w.t.-Pflanzen. Die Transkriptionsinduktion in Tabakblattscheiben wurde mit 100 μ M MeJA durchgeführt, Proben zum angegebenen Zeitpunkt entnommen und RNA präpariert (siehe 3.17). 13 μ g Gesamt-RNA wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf Hybond N⁺-Membran transferiert und mit der links angezeigten Sonde *Nt103* hybridisiert. Die im Gelfoto dokumentierte 28S und 18S rRNA (links angezeigt) wurde für den Abgleich der *Nt103*-Signale verwendet (3.9.2). Die Pflanzenlinien sind oberhalb angezeigt: a) w.t. Standard (St.), TGA2.1traD#2 und TGA2.2traD#8; b) w.t. Standard, TGA2.1ΔN29#5-7, TGA2.2UE#8; c) w.t. Standard, TGA2.1II#6, TGA2.1II#22.

4.7.3 Der Einfluss von TGA-Faktoren auf *Nt103* bei 2,4-D Induktionsversuchen

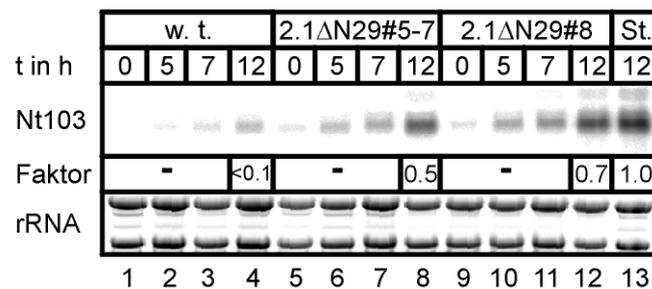
Die Induktionsreihen mit dem funktionellen Auxin-Analogen 2,4-D wurden bei einer Konzentration von 50 μ M der Substanz durchgeführt. Da den GST eine wichtige Rolle bei xenobiotischem Stress zugewiesen wird und nicht auszuschließen war, dass die verwendete 2,4-D Konzentration auch xenobiotische Reaktionen hervorrufen kann, wurden zunächst Experimente durchgeführt, welche die Möglichkeit bieten, zwischen diesen beiden Reaktionen zu diskriminieren. Zu diesem Zwecke wurden Zeitreihen mit 2,6-D durchgeführt, einer als Phytohormon physiologisch inaktiven Substanz, die sich nur in der Substitutionsstelle des zweiten Chlorrestes am Benzolring unterscheidet. Xenobiotische Effekte würden mit 2,6-D genauso ausgelöst werden.

Wie der Abb. 4.29 entnommen werden kann, fällt die Transkriptionsaktivierung von *Nt103* zum Zeitpunkt $t = 12$ bei der Induktion mit 2,6-D sehr viel schwächer aus im Vergleich zum entsprechenden 2,4-D Wert (Standard, Spur 12). Eine Ausnahme stellen die TGA2.1 Δ N29-Linien dar (Abb. 4.29, b)]. Hier erreicht die Signalstärke der Δ N29-Linien zum Zeitpunkt $t = 12$ h das 0.5 bzw. 0.7^{fache} des 12 h Wertes der 2,4-D-Induktion in der Standardspur (Abb. 4.29, b], Spur 4 und 8 im Vergleich zu Spur 13). Bei der 2,4-D-Induktion handelt es sich folglich um einen Auxineffekt, wobei es sich bei den Pflanzen mit dem N-terminal deletierten TGA2.1 auch um einen Phytohormon und xenobiotischen Effekt handeln könnte.

a]



b]



c]

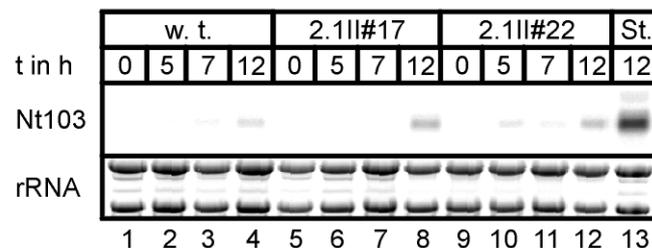


Abb. 4.29: Vergleichende Northern-Blot-Analyse von 2,6-D-Zeitreihen zwischen w.t.- und transgenen Pflanzen. Die Transkriptionsinduktion in Tabakblattscheiben wurde mit 50 μ M 2,6-D durchgeführt, Proben zum angegebenen Zeitpunkt entnommen und RNA präpariert (siehe 3.17). 10 μ g GesamtrNA wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf Hybond N[®]-Membran transferiert und mit der Sonde *Nt103* hybridisiert. Die im Gelfoto dokumentierte 28S und 18S rRNA (links angezeigt) wurde für den Abgleich der *Nt103*-Signale verwendet (3.9.2). Als Standard (St.) wurde RNA des $t = 12$ h Zeitpunkts einer w.t. 2,4-D-Zeitreihe aufgetragen. Die Pflanzenlinien sind oberhalb angezeigt: a] w.t., TGA2.1traD#2, St.; b] w.t., TGA2.1 Δ N29#5-7, TGA2.1 Δ N29#8, St.; c] w.t., TGA2.1I#17, TGA2.1I#22, St. Zur Berechnung des Faktors in b] wurden die $t = 12$ h Signale abgeglichen, der Wert der Standardspur gleich 1.0 gesetzt und die 12 h Werte der transgenen Pflanzen darauf bezogen.

In Abb. 4.30 ist zu sehen, dass in der transdominanten Suppressorpflanze TGA2.1traD#2 die *Nt103*-Transkriptmenge bei einer 2,4-D-Induktion nicht signifikant gedrückt ist (Abb. 4.30, a). Werte, die nur um ein Drittel oder weniger vom w.t.-Wert abwichen, wurden als nicht signifikant angesehen (siehe Diskussion). Auch die *Nt103*-Transkriptmenge bei der Überexpressionspflanze TGA2.1II#22 ist nicht signifikant im Vergleich zur w.t.-Transkriptmenge angehoben (Abb. 4.30, a). Bei den TGA2.1ΔN29-Linien hingegen kommt es zu einer leichten Verstärkung (Faktor 2.3 und 2.0) der *Nt103*-Transkriptmenge im Vergleich zum w.t. im Verlauf der 2,4-D-Induktion (Abb. 4.30, b).

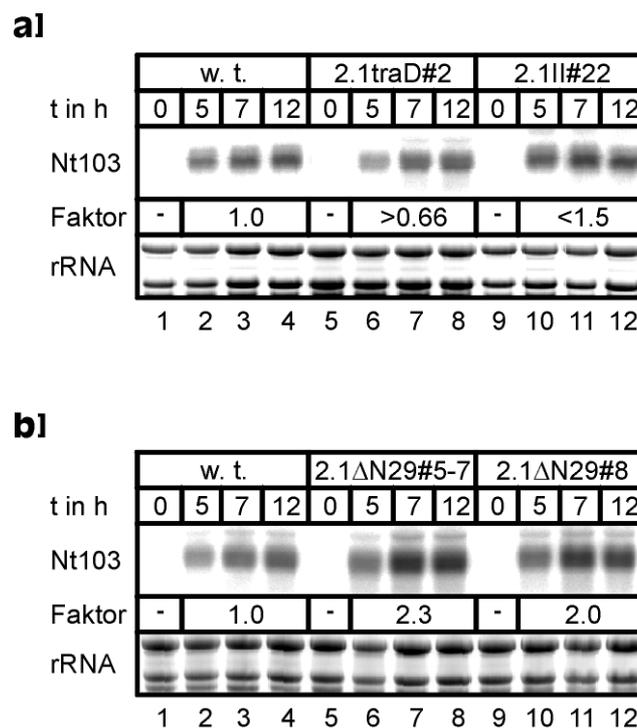


Abb. 4.30: Vergleichende Northern-Blot-Analyse von 2,4-D-Zeitreihen zwischen w.t.- und transgenen Pflanzen. Die Transkriptionsinduktion in Tabakblattscheiben wurde mit 50 μ M 2,4-D durchgeführt, Proben zum angegebenen Zeitpunkt entnommen und RNA präpariert (siehe 3.17). 10 μ g Gesamt-RNA wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf Hybond N[®]-Membran transferiert und mit der Sonde *Nt103* hybridisiert. Die im Gelfoto dokumentierte 28S und 18S rRNA (links angezeigt) wurde für den Abgleich der *Nt103*-Signale verwendet (3.9.2). Die Pflanzenlinien sind oberhalb angezeigt: a) w.t., TGA2.1traD#2, TGA2.1II#22; b) w.t., TGA2.1ΔN29#5-7, TGA2.1ΔN29#8. Zur Berechnung der Faktoren wurden die Signale der Zeitpunkt t = 5 - 12 h jeder Linie abgeglichen, addiert und der Wert der w.t. Pflanze gleich 1.0 gesetzt. Die Faktoren der transgenen Pflanzen ergaben sich aus dem Quotienten der transgenen Werte geteilt durch den w.t.-Wert.

4.7.4 Der Einfluss von TGA-Faktoren auf *IEGT*, *parA* und *PR1a* bei MeJA-, SA- und 2,4-D-Induktionsversuchen

Die Northern-Blot-Analysen mit den transgenen TGA2.1-Linien wurden auch auf Transkriptmengenakkumulation durch die Stimuli MeJA, SA und 2,4-D in Bezug auf die Gene *parA*, *IEGT* und *PR1a* durchgeführt. Bei keiner der Pflanzenlinien kam es zu einer signifikanten Änderung der w.t.-Transkriptmengen.

5 Diskussion

5.1 Erstellung und Charakterisierung transgener Pflanzen

Zur Klärung der funktionellen Bedeutung von TGA2.1 in der Regulation von Zielpromotoren wurden transgene Pflanzen hergestellt. Die TGA2.1-Derivate wurden unter der Kontrolle eines CaMV35S-Promotor-Derivats ektopisch überexprimiert (Gatz et al., 1991). Die Charakterisierung auf transkriptioneller Ebene zeigte eine starke Steigerung der TGA2.1-mRNA-Menge (Abb. 4.7). Die Überexpression der TGA2.1-Derivate hatte keinen erkennbaren Einfluss auf die Menge an TGA2.2-Transkript unter nicht induzierenden Bedingungen (Abb. 4.7).

Die Änderung der Transkription von TGA2.1 spiegelte sich auch auf der Proteinebene wider. Sowohl das N-terminal gekürzte TGA2.1 als auch die Vollängenproteine konnten im Gesamtzellextrakt in Mengen nachgewiesen werden, welche die w.t.-Mengen um ein Mehrfaches überstiegen (Abb. 4.8). Alle TGA2.1-Proteine konnten im Vergleich zum w.t. in erhöhten Mengen in Zellkernextrakten nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.13). Dies bedeutet in Bezug auf die transdominante Suppressionsstrategie entweder, dass die NLS durch die Mutation nicht funktionell beeinträchtigt wurde, oder dass TGA2.1traD als Dimer mit einem nicht mutierten Protein in den Zellkern transportiert wurde. Die Steigerung der TGA2.1-Menge in den transgenen TGA2.1-Pflanzen im Vergleich zum w.t. ist, soweit die Auflösung der immunochemischen Quantifizierung Aussagen darüber zulässt, in Gesamtzellextrakten so stark wie im Zellkern. Eine präferentielle Anreicherung in einem Zellkompartiment ist nicht zu erkennen. Eine genaue Quantifizierung der Proteinmengen ist jedoch mit der Western-Blot-Methode nicht möglich.

Der immunochemische Vergleich mit Hilfe eines AK gegen den Affinitäts-Tag Strep-tag[®]II erlaubt es, absolute Mengen von TGA2.1 mit den Mengen an TGA2.2 transgenen Ursprungs zu vergleichen. Die absoluten Mengen der transgen exprimierten TGA-Proteine im Zellkern sind vergleichbar.

5.2 Protokolle zur Anreicherung von TGA-Faktoren

In der Arbeit von Niggeweg (1999) wurde TGA2.1 in Gesamtzellextrakten und Kernextrakten immunochemisch nachgewiesen und auf zwei Banden der Molekulargrößen 62 und 51 kDa hingewiesen. Das 62 kDa-Signal entsprach dem Signal von rekombinant in *E. coli*

exprimiertem TGA2.1. Die Vermutung liegt nahe, dass es sich bei der 51 kDa-Bande um ein Produkt eines Proteinabbaus als Folge der Extraktionsbedingungen handelt, da Proteingesamtzellaufschlüsse unter denaturierenden Bedingungen ausschließlich zu einer Bande im Western Blot führen, die in dieser Arbeit bei einem Molekulargewicht von 70 kDa liegt (siehe Abb. 4.8). Die Differenz im Molekulargewicht zwischen der von Niggeweg (1999) beschriebenen 62 kDa- bzw. 51 kDa-Bande und der 70-kDa bzw. 55 kDa-Bande in dieser Arbeit ergibt sich vermutlich aus den unterschiedlichen verwendeten Proteinstandards in den jeweiligen Arbeiten und den unterschiedlichen Laufbedingungen der SDS-PAGE. Die Vollängenbande von TGA2.1 wurde in dieser Arbeit immer oberhalb der 65 kDa-Bande des Proteinstandards detektiert. Für die in dieser Arbeit entwickelte Methode zur Extraktion von nativen Fraktionen Gesamtzellproteins (3.10.1) zeigte in den untersuchten transgenen Pflanzen die Western-Blot-Analyse ein Signal bei 70 kDa (Abb. 4.17), welches dem Vollängenprotein entspricht. In den w.t.-Pflanzen konnte TGA2.1 nicht nachgewiesen werden. Es wird dabei davon ausgegangen, dass auch in den w.t.-Pflanzen TGA2.1 unverdaut vorliegt, jedoch in Mengen unterhalb der Nachweisgrenze der verwendeten Methode. Die von Niggeweg (1999) verwendete Gesamtzellprotein-Extraktionsmethode geht auf die von Jupin und Chua (1996) beschriebene Methode zurück. Bei der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Proteinextraktion gelangt man sehr viel schneller zu den Extrakten, so dass die Proteinlösung sehr viel kürzer der Temperatur von 4°C ausgesetzt ist (30 min im Vergleich zu mehr als 4 h). Ferner werden bei der von Jupin und Chua (1996) publizierten Methode den Puffern als Proteinaseinhibitoren nur Antipain, Leupeptin und Pefabloc zugesetzt, im Gegensatz zu der sehr viel umfangreicheren Palette an Inhibitoren im FixProt-Extraktionspuffer (siehe in 2.7; FixProt-Extraktionspuffer). Im Aufschlusspuffer der Jupin-Gesamtzellprotein-Extraktionsmethode sind keine Chelatoren vorhanden im Gegensatz zu den im FixProt-Extraktionspuffer zugesetzten 1,10-Phenanthrolin und EGTA. Ein immunochemischer Nachweis von TGA2.1 in SARP wurde in der Publikation von Jupin und Chua (1996) nicht beschrieben, es wurde somit auch nicht auf die Degradationsanfälligkeit dieses Proteins geachtet. Aus den genannten Gründen ist die hier dokumentierte Proteinextraktionsmethode (3.10.1) besser zur Charakterisierung des Komplexes geeignet.

Bei der Gewinnung von Kernproteinextrakten nach der Methode von Niggeweg (1999) konnte die Degradation von TGA2.1 nicht verhindert werden. Um für die immunochemische Detektion Kernproteinextrakte zu erhalten, in denen TGA2.1 noch nicht abgebaut vorliegt, wurde das Protokoll zur Gewinnung von denaturierten Zellkernextrakten entwickelt. Bei dieser in 3.11.2 dokumentierten Methode zur Gewinnung von denaturierten Kernproteinen

erwies sich die Änderung des pH-Wertes des Aufschluss- (Puffer 1A) und des Waschpuffers (0.5x A) von 6.1 auf 8.8 (bei 4°C) als ausreichend, um den Abbau von TGA2.1 zu unterbinden (siehe Abb. 4.13). Mit dieser Proteinextraktion liegt erstmalig eine Methode vor, welche die Proteinzusammensetzung und den Zustand der untersuchten Proteine zum Zeitpunkt des Aufschlusses weitestgehend erhält.

Die Reduktion des pro Zellkernisoliationsansatz benötigten Blattmaterials erlaubt Experimente unter Verhältnissen, bei denen man nur auf eingeschränkten Raum für eine Kultivierung der Pflanzen zurückgreifen kann. Da eine Proteinextraktion mit der Methode 3.11.2 in 90 min abgeschlossen ist, sind darüber hinaus Experimente möglich, in denen Kernproteine aus Zeitreihen benötigt werden.

Bei Kernproteinextrakten von Niggeweg (1999) konnte die Degradation von TGA2.1 nicht verhindert werden. Native Kernproteinextrakte, in denen TGA2.1 unverdaut vorliegt, konnten auch in dieser Arbeit nicht gewonnen werden, wie die immunochemische Untersuchung zeigte. Die Änderungen des Kernproteinprotokolls für native Extrakte zeigte trotzdem qualitative Verbesserungen, wie aus den Gelshifftanalysen hervorgeht (siehe 5.3). Wie beim Gesamtzellextrakt wurde bei der Zellkernproteinisolierung das Protokoll zeitlich stark verkürzt (von 48 h auf weniger als 12 h). Des weiteren wurde der Zusatz von Proteinase-Inhibitoren erweitert und Chelatoren zugefügt. Als letzte qualitative Änderung des Protokolls ist der Verzicht auf die Dialyse zugunsten der Verwendung von Centricon-30® Ultrafiltrationsröhrchen anzusehen. Somit wurde gewährleistet, dass die Proteinase-Inhibitoren in allen Schritten der Extraktion in den Lösungen in ausreichenden Konzentrationen vorlagen und bei einer gleichzeitigen Verringerung des Zeitaufwands.

Die Western-Blot-Analyse von Zellkernproteinen gewonnen bei einem pH-Wert von 6.1 (4°C) mit dem AK anti-Strep-tag® II (Abb. 4.12) konnte zeigen, dass die TGA2.1-Degradation N-terminal stattfindet. N-terminale Deletionen wurden bei TGA-Faktoren aus *Arabidopsis* im Zusammenhang mit NPR1-Interaktionen diskutiert und eine mögliche physiologische Rolle erwähnt (Zhou et al., 2000). Die Möglichkeit der Aktivierung von TGA2.1 im Verlauf einer SA-Zeitreihe durch posttranslationale Deletion des N-terminus an der Stelle, welche die TGA2.1-Instabilität bei der Proteinextraktion verursacht, kann ausgeschlossen werden (Abb. 4.22). Bei dem TGA2.1-Abbau handelt es sich vermutlich um eine physiko-chemische Eigenschaft des Proteins.

5.3 Gelshift

Im Blattgewebe von *Nicotiana tabacum* sind in der Literatur bisher zwei *as-1*-bindende Proteinkomplexe beschrieben worden. Im EMSA konnte in Gesamtzellextrakten ein *as-1*-assoziiertes Proteinkomplex nachgewiesen werden, dessen *as-1*-Bindung von SA abhing und als 'salicylic acid responsive protein' (SARP) bezeichnet wurde (Jupin und Chua, 1996). Der entsprechende *as-1*-bindende Komplex aus Zellkernextrakten wurde 'activating sequence factor 1' (ASF-1) genannt (Lam et al., 1990). Eine genauere Beschreibung des SARP-Komplexes und des ASF-1 in w.t.-Tabakblattgewebe wurde mittels Supershiftanalysen durchgeführt (Niggeweg, 1999; Niggeweg et al., 2000a). TGA1a ist nicht Bestandteil von ASF-1 und SARP, ganz im Gegensatz zu TGA2.1 und TGA2.2. Mit dem AK anti-TGA2.1 wurden 10% von ASF-1 und 20% von SARP retardiert, mit dem AK anti-TGA2.2 80% in beiden Komplexen (Niggeweg, 1999; Niggeweg et al., 2000a).

Die Gelshiftanalysen in dieser Arbeit geben aufgrund des mangelhaften Zustands des AK anti-TGA2.2 N-term keine Antwort auf den TGA2.2-Anteil in den beiden Komplexen in den weiterentwickelten Proteinextraktionsprotokollen (Abb. 4.20 und Abb. 4.21). Bei der Supershiftanalyse mit dem AK anti-TGA2.1 N-term (Abb. 4.20 und Abb. 4.21; Tab. 4.2 bis Tab. 4.4) weicht das Ergebnis der Quantifizierung von den publizierten Werten ab (Niggeweg, 1999; Niggeweg et al., 2000a). Der durch den AK anti-TGA2.1 N-term retardierte SARP-Anteil wurde mit 40% im w.t.-Gesamtextrakt bestimmt, mit dem AK anti-TGA2.1 N-term konnten 24% von ASF-1 im w.t.-Zellkernextrakt im Laufverhalten verzögert werden.

Die scheinbare Diskrepanz der ermittelten Werte zu den publizierten kann auf zwei Dinge zurückzuführen sein. Zum einen wurde in dieser Arbeit ein *as-1*-Gelshift-Fragment entwickelt, das eine doppelt so hohe spezifische Aktivität besitzt wie das für die erstmalige Charakterisierung verwendete *as-1*-Gelshift-Fragment (Niggeweg, 1999; Niggeweg et al., 2000a). Die erhöhte Signalstärke führt dazu, dass sehr schwache Signale, wie z.B. die durch den anti-TGA2.1 AK supergeschiftete Bande im EMSA, besser zu bestimmen sind und klarer vom Hintergrund abgegrenzt werden können. Dies bietet die Möglichkeit einer genaueren Quantifizierung von schwachen Signalen, welches einen Teil der abweichenden Anteile von TGA2.1 in ASF-1/SARP erklären könnte.

Zum zweiten ist die Qualität der Proteinextrakte eine mögliche Quelle für Unterschiede bezüglich der TGA2.1-Anteile in den *as-1*-bindenden Komplexen. Wie Niggeweg (1999) bereits andeutete und in dieser Arbeit gezeigt wurde, unterliegt TGA2.1 bei der Gewinnung

von Proteinextrakten einer Instabilität, die zum Verlust eines Teiles des N-Terminus führt. Die Änderungen der Extraktionsprotokolle (siehe 5.2) führen zum Erhalt von Vollängen-TGA2.1 in Gesamtzellextrakten (siehe Abb. 4.17). Die Western-Blot-Analyse von Gesamtzellextrakten (Abb. 4.17) beweist nicht, dass bei der Durchführung des EMSA TGA2.1 vollständig als Vollängenprotein erhalten bleibt, doch ist anzunehmen, dass es nach der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methode zu weniger proteolytischem Abbau von TGA-Faktoren in der Bindereaktion und dem anschließenden Gelshift-Lauf kommt. So ist das Ausgangsproteinmaterial weit weniger von Proteolyse betroffen. Darüber hinaus wurden in dieser Arbeit der Bindereaktion Proteinaseinhibitoren hinzugefügt. Als Indikator für die Verbesserung der Gesamtzellextrakte ist der erstmalige Nachweis der TGA2.1/2.2-Bande in der Höhe der TGA2.1/2.2-Bande der *in vitro*-Translationsprodukte in dem EMSA (Abb. 4.18) zu sehen.

Bei nativen Zellkernproteinextrakten waren die Versuche, TGA2.1-Vollängenprotein zu erhalten, nicht erfolgreich, wie die immunochemische Untersuchung zeigte (Abb. 4.14). Eine verbesserte Qualität der Kernproteinextrakte im Vergleich zu den von Niggeweg (1999) verwendeten zeigt sich an der ASF-1-Aktivität pro μg Protein. Niggeweg lud $10 \mu\text{g}$ w.t.-Zellkernprotein, welches maximal 25% der freien Sonde retardierte. Im Vergleich dazu wurden bei den hier dokumentierten Kernextraktgelshifts $3 \mu\text{g}$ Zellkernprotein eingesetzt, welches im Falle von Extrakten aus dem w.t. 50% der Sonde retardierte (Niggeweg, 1999; siehe Abb. 4.20 und Abb. 4.21). Die molare Menge der von Niggeweg zur Detektion verwendeten Sonden-DNA war identisch zu der hier dokumentierten. Dies bedeutet eine um den Faktor sechs gesteigerte ASF-1-Aktivität für das hier beschriebene Protokoll (3.11.2). Die gesteigerte ASF-1-Aktivität im Zellkernproteinextrakt kann als Indikator für den geringeren Umfang an proteolytischem TGA2.1-Abbau gesehen werden. Der höhere Anteil an TGA2.1 im ASF-1-Komplex scheint eine direkte Folge der Änderungen am Proteinprotokoll zu sein. Die sechsfache Steigerung der ASF-1-Aktivität bedeutet darüber hinaus auch, dass TGA2.2 in höheren Konzentrationen vorliegen muss. Die schnellere Kernproteinextraktionsmethode unterbindet folglich signifikant den Abbau der TGA-Faktoren TGA2.1 und TGA2.2, wobei TGA2.1 anfälliger für Proteinabbau ist.

Die in dieser Arbeit durchgeführten EMSA-Experimente stellen zwar eine geeignete Methode zur Charakterisierung der SARP/ASF-1-Aktivität dar, spiegeln aber nicht die Situation *in planta* bezüglich der *as-1*-Bindung im uninduzierten Zustand wieder. I. Lenk (persönliche Mitteilung) konnte zeigen, dass Pflanzen mit dem Konstrukt TGA2.2-VP16 ohne Stimulus keine Aktivierung über das isolierte *as-1*-Element vermitteln. Da die VP16-Domäne

konstitutiv aktiv ist, folgt daraus, dass im uninduzierten Zustand die TGA-Faktoren nicht an das *as-1*-Element binden. Unter den in dieser Arbeit gewählten Bedingungen für die Proteinextraktion spiegelt sich dies nicht im EMSA wieder. Die durch SA induzierte Bindung von SARP/ASF-1 an das *as-1*-Element wurde in der Literatur gezeigt (Jupin und Chua, 1996; Stange et al., 1997). Eine Reproduktion dieser Ergebnisse konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht erreicht werden (ferner I. Lenk, R. Niggeweg, C. Thurow, persönliche Mitteilung).

5.4 Wirkung der Änderung der TGA-Faktoren-Konzentration auf Zielgene

Die TGA-Faktorenklasse umfasst in Tabak bis jetzt fünf klonierte Gene. Neben den hier untersuchten TGA-Faktoren 2.1 und 2.2 sind die Gene TGA1a, PG13 und TGA7 bekannt, die nicht in die Untersuchungen dieser Arbeit einbezogen wurden. TGA7 wurde nicht berücksichtigt, da er nicht Teil von SARP/ASF-1 im Blattgewebe ist (A. Schiermeyer, persönliche Mitteilung). TGA1a und PG13 sind im N-Terminus fast identisch. R. Niggeweg (1999) konnte zeigen, dass TGA1a/PG13 nicht Teil des *as-1*-bindenden Proteinkomplexes ist. Der EMSA mit dem verbesserten Gesamtzellproteinprotokoll bestätigt diese Beobachtung (Abb. 4.18). Darüber hinaus wurde TGA1a bisher nur in Wurzelgewebe immunochemisch nachgewiesen (Klinedinst et al., 2000). In der Literatur gibt es bis zum jetzigen Zeitpunkt keine Hinweise auf die Beteiligung von PG13 an SARP/ASF-1. Ferner ist PG13 ein präferentiell im Wurzelgewebe exprimiertes Gen. Aus diesen Gründen konzentrierte sich die Analyse der Auswirkung von TGA-Faktoren auf Zielgene in Tabakblattgewebe auf die Proteine TGA2.1 und TGA2.2.

Zu dem untersuchten Zielgen *Nt103* müssen einige Anmerkungen gemacht werden. Die gewählte Sonde umspannt den zentralen Teil des Gens *Nt103*. In der ausgewählten Region ist dieses GST-Gen auf DNA- und RNA-Ebene zu über 93% identisch zu den GST-Genen *Nt35* und *Nt1* (van der Zaal et al., 1991). Die Signale der Northern-Analyse stellen vermutlich die Transkripte von zwei bzw. drei Genen dar. Diese Annahme wird gestützt von Beobachtungen in Tabakkeimlingen. Auxin induzierte in Experimenten sowohl das *Nt1*- als auch das *Nt35*-Transkript in gleichem Maße (Klinedinst et al., 2000). Der Promotor des *Nt103*-Gens unterscheidet sich wiederum kaum von dem des *Nt35*-Gens (Droog et al., 1995b). Bei der quantitativen Auswertung der Northern-Analysen wurden zwei Banden für die Messung vereinigt, da diese bei der Elektrophorese nicht weit genug voneinander zu trennen waren, um

sie einzeln auszuwerten. In Abb. 4.28 a] kann man die beiden Banden, die vermutlich Transkripte von zwei oder drei Genen darstellen, gut erkennen.

Die Rolle des *as-1-cis*-Elementes bei der Induktion der Genexpression durch SA (u. a. Qin et al., 1994; Strompen et al., 1998; Zhang und Singh, 1994), 2,4-D bzw. andere Auxine (u. a. An et al., 1990; Liu und Lam, 1994; Zhang und Singh, 1994) und MeJA (Guevara-Garcia et al., 1998; Kim et al., 1993a) ist vielfach belegt. Das in dieser Arbeit untersuchte GST-Gen *Nt103* besitzt ein *as-1*-Element, dem eine zentrale Rolle bei der Transkriptionsinduktion durch SA (Niggeweg et al., 2000a; van der Zaal et al., 1996) und 2,4-D (Droog et al., 1995b; Niggeweg et al., 2000a) zukommt.

Zielsetzung dieser Arbeit war es, die Rolle von TGA2.1 im SARP-/ASF-1-Komplex bei der *as-1*-vermittelten Transkriptionsaktivierung in Reaktion auf die Induktoren SA, 2,4-D und MeJA spezifisch zu beleuchten. Neben dem Volllängen-TGA2.1 wurde auch ein TGA2.1-Derivat erstellt und in Pflanzen transformiert, welchem die 29 N-terminalen Aminosäuren fehlen (TGA Δ N29). Das TGA Δ N29-Derivat wurde aufgrund verschiedener Hinweise bezüglich des N-terminus untersucht. Zum einen befinden sich im N-terminalen Bereich der TGA2.1-cDNA mehrere Methionine, die potentiell als Translationsstart dienen könnten (Lindahl und Hinnebusch, 1992; Oh und Sarnow, 1993). Zum anderen wurde beobachtet, dass in *E. coli* rekombinant exprimiertes TGA2.1 bei einem leicht höheren Molekulargewicht in der Elektrophorese migriert als die Volllängenbande von TGA2.1 aus Pflanzenextrakten (Niggeweg, 1999). Interessanterweise wurde beim immunochemischen Nachweis von TGA2.1 in w.t.-Kernextrakten eine Doppelbande im Molekulargewichtsbereich von 62-68 kDa detektiert (Niggeweg, 1999). Bei diesen beiden Banden könnte es sich um zwei Proteinderivate, bedingt durch alternative Translationsstartpunkte von TGA2.1, handeln. Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde die Doppelbande mehrfach im w.t.-Kernextrakt detektiert, wobei der Normalfall im immunochemischen Nachweis die Einfachbande war. Der genaue Translationsstart *in planta* wurde nicht ermittelt. Er könnte eine Regulationsmöglichkeit darstellen, um unterschiedlich lange TGA2.1-Proteine zu synthetisieren mit unterschiedlichen Eigenschaften, determiniert in dem Vorhandensein des N-terminus oder dem Fehlen von Teilen desselben.

5.4.1 TGA2.1-Überexpression moduliert die *Nt103*-Expression

Die TGA Δ N29-Pflanzen unterschieden sich bei den Induktionsversuchen mit einer Ausnahme nicht von den Volllängen-TGA2.1-Derivaten (siehe weiter unten).

Die Überexpression von TGA2.1 in Pflanzen in der Vollängenform und in der gekürzten Form führt zu einer deutlichen Steigerung von SARP/ASF-1 im EMSA. Die Shiftverstärkung von ASF-1 bei den TGA2.2UE-Pflanzen ist in der Größenordnung vergleichbar. Alle TGA-Überexpressionpflanzen (TGA2.1/2.1ΔN29/2.2UE) zeigen bei SA-Induktionsexperimenten vergleichbare Effekte auf den Promotor *Nt103* (Niggeweg, 1999; diese Arbeit). Im Falle der TGA2.1-Derivate muss dieses auf den erhöhten Anteil an TGA2.1 zurückzuführen sein, während bei TGA2.2UE der Anteil an TGA2.2 im ASF-1 erhöht ist. Es liegt damit bei SA-Induktionen eine funktionelle Redundanz in dem beschriebenen Bereich dieser Transkriptionsfaktoren-Familie vor. Es scheint bei der Steigerung der Transkription über das *as-1*-Element in Reaktion auf SA-Applikation nicht auf die genaue Komposition von ASF-1 anzukommen, denn sowohl die Steigerung des TGA2.2- als auch des TGA2.1-Anteils führt zur Transkriptionssteigerung von *Nt103*.

Während bei den TGA2.1-Pflanzen die Überexpression von TGA2.1 zu einer Akkumulation von TGA2.1 im Zellkern führt, ist bei den TGA2.2UE-Pflanzen mit Hilfe des Western-Blots keine detektierbare Änderung der TGA2.2-Menge zu erkennen. Entweder liegt die Steigerung der TGA2.2-Menge unter der Auflösung der Methode oder es kommt nicht zu einer Erhöhung der TGA2.2-Menge im Zellkern im uninduzierten Zustand. Ergebnisse von A. Klingebiel (persönliche Mitteilung) deuten auf letzteres hin. Die Verstärkung von ASF-1 bei den TGA2.2UE-Pflanzen müsste dann auf einen indirekten Effekt zurückzuführen sein, da der EMSA eine deutliche Steigung des *as-1*-bindenden Teils nachweist. Möglich wäre, dass zwar die gesteigerten Mengen an TGA2.2 nicht in den Zellkern gelangen, jedoch einen TGA-assoziierten Faktor im Cytosol binden, der reprimierend in Bezug auf die DNA-Bindung wirkt, und somit das Fehlen des Faktors im Zellkern indirekt zu einer Steigerung der ASF-1-Aktivität führt. Handelt es sich um eine Steigerung der TGA2.2-Mengen im Kern, die immunochemisch nicht nachweisbar ist, so müssten in diesem Falle bereits geringe Konzentrationsänderungen von TGA2.2 (Faktor 1.5) zu einer sehr deutlichen Verstärkung des retardierten Anteils der Sonde im EMSA führen (Faktor ≥ 2.8).

Ein analoges Verhalten der Überexpressionspflanzen zu dem der SA-Experimente findet sich bei den Induktionsversuchen mit MeJA wieder. Die Wirkung der Überexpression von TGA2.1/2.2 ist ähnlich in Bezug auf die Steigerung der Transkriptmenge von *Nt103*. Die Transkriptmenge von *Nt103* ist im zeitlichen Verlauf einer MeJA-Induktion sehr variabel und erlaubt keine quantitative Aussagen. Im Falle von MeJA ist das *as-1*-Element allein nicht ausreichend, um die Transkriptionsaktivierung im *nos*-Promotor zu vermitteln (Kim et al., 1993a). Das zweite im *nos*-Promotor beschriebene *cis*-Element, welchem eine Rolle in der

MeJA-Responsivität zugeschrieben wird, ist eine CAAT-Box. Es ist vermutlich diese höhere Komplexität der Regulation des *Nt103*-Transkriptes in Reaktion auf MeJA, welche die genaue quantitative Auswertung erschwert. Sie kommt z.B. bei *nos*-CAT-Fusionen (*nos*-Promotor/CAT-Reporter) in Tabakblättern zum Ausdruck. Eine Altersabhängigkeit der CAT-Aktivität in Reaktion auf MeJA wurde beobachtet (Kim et al., 1993a). In jüngeren Blättern ist die CAT-Aktivität höher als in älteren. Die CAT-Aktivität steigt jedoch bei den gleichen Pflanzen bei SA als Induktor mit dem Alter der Blätter (Kim et al., 1993a), ein Phänomen, das dem *as-1*-Element zugeschrieben wird (Liu und Lam, 1994; Strompen et al., 1998). Der in dieser Arbeit gewählte experimentelle Ansatz konnte diese Regulationskreise des *Nt103*-Promotors nicht auflösen.

Die Überexpression der Proteine TGA2.1II und TGA2.1ΔN in den transgenen Pflanzen wirkt sich bei 2,4-D-Induktionen weniger auf die *Nt103*-Transkriptmenge aus, als dies bei Induktion mit SA der Fall ist. Die Steigerung der *Nt103*-Transkriptmenge bei den TGAΔN-Pflanzen entspricht der in TGA2.2-Überexpressionspflanzen (Abb. 4.30; Niggeweg, 1999; Niggeweg et al., 2000a). Die Pflanzen mit dem Volllängen-TGA2.1 zeigen nur eine marginal erhöhte *Nt103*-Expression unterhalb der Auflösung der Methode (Abb. 4.30). Die stärkere Modulierbarkeit durch die Überexpression von TGAΔN29 kann einerseits durch die geänderten Eigenschaften des gekürzten Proteins erklärt werden, andererseits könnte es sich um einen Effekt handeln, der auf unterschiedlich starke Überexpression der beiden TGA2.1-Derivate zurückzuführen ist (Abb. 4.8). Die SARP-Aktivität im EMSA fällt bei den TGAΔN29-Gesamtzellextrakten doppelt so hoch aus wie bei den TGA2.1II-Gesamtzellextrakten (Abb. 4.19 und Abb. 4.20; Tab. 4.2 bis Tab. 4.4), aber auch dieser Unterschied kann auf die unterschiedlichen Bindeeigenschaften der Proteine TGA2.1II/ΔN29 an das *as-1*-Element oder auf die unterschiedlich starke Expression der eingeführten cDNAs in der Pflanze zurückzuführen sein.

Bei Zugabe von 2,6-D wiesen alle TGA2.1-Derivate eine GST-Transkriptmenge auf, die um ein vielfaches unter den Werten der 2,4-D-Induktion des w.t.'s lagen. Die TGAΔN29-Pflanzen hingegen wiesen zum Zeitpunkt $t = 12$ h das 0.5 bis 0.7^{fache} des vergleichbaren Zeitpunktes beim w.t. der 2,4-D-Induktion auf. Bei der Abwägung, ob diese Daten als Artefakt der 2,6-D-Induktion zu bewerten sind oder auf einen tatsächlichen Effekt vermittelt über die N-terminal gestutzte TGA2.1-Variante beruhen, sind zwei Dinge zu beachten. Zum einen wurde der Versuch mit zwei unabhängigen TGAΔN29-Pflanzen durchgeführt, deren *Nt103*-Transkriptverläufe in Reaktion auf die 2,6-D-Induktion sich qualitativ und quantitativ von denen anderer Pflanzen abhoben. Zum anderen wurde die 2,6-D-Zeitreihe der Pflanze

TGAΔN29#5-7 parallel mit anderen Pflanzen, die in Abb. 4.29 zusehen sind, durchgeführt. Die 2,6-D-Zeitreihe mit der Pflanze TGAΔN29#8 wurde zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt. Die parallele Durchführung der 2,6-D-Induktion der Pflanze TGAΔN29#5-7 mit den anderen (u. a. TGA2.1II#17 und #22) spricht gegen eine Verwechslung des Induktors. Die zeitlich getrennte Durchführung der beiden TGAΔN-Derivatspflanzen stärkt ebenfalls das vorliegende Ergebnis, da es sich um zwei völlig unabhängige Experimente handelt.

Die um 29 Aminosäuren gekürzten TGA2.1-Faktoren können von der Pflanze in die xenobiotische Transkriptionsaktivierung des *Nt103* eingebunden werden, im Gegensatz zu dem Volllängen-TGA2.1. Interessanterweise steigert in BY-2 Zellen sowohl 2,4-D als auch 2,6-D die Transkription von einem Minimalpromotor mit dem *as-1*-Element aus *Nt103* um vergleichbare Mengen (van der Zaal et al., 1996). Der Effekt über das isolierte *as-1*-Element ist folglich bei xenobiotischem Stress so hoch wie beim Phytohormon. Wurde der gesamte *Nt103*-Promotor verwendet, so war in BY-2 Zellen die Steigerung durch 2,4-D deutlich höher, aber auch 2,6-D-vermittelt war eine Steigerung der Transkription gegenüber der Kontrolle zu beobachten (van der Zaal et al., 1996). Das *Nt103*-Gen wird bei xenobiotischem Stress in BY-2-Zellen hochreguliert (van der Zaal et al., 1996) und es wurde gezeigt, dass GST1-1 (Protein des *Nt103*-Gens) 2,4-D und als Phytohormon physiologisch inaktive Substanzen wie z.B. 3,5-Dichlorophenoxyessigsäure und 2,4,5-Trichlorophenoxyessigsäure als Substrat akzeptiert werden (Droog et al., 1995a). Dies ist ein weiteres Argument für die Rolle von GST1-1 bei xenobiotischem Stress, wobei die Regulation von *Nt103* auf den phytochemischen Stress in den Geweben unterschiedlich erfolgt.

5.4.2 Transdominante Suppression von TGA2.1 moduliert die *Nt103*-Expression, nicht aber die Expression von anderen Zielgenen

Die transdominante Suppression durch die Expression eines in der basischen Domäne mutierten TGA2.1 (TGA2.1traD) in Pflanzen führte bei MeJA- und bei SA-Induktionen zu verminderten *Nt103*-Transkriptmengen im Vergleich zum w.t.. Vergleicht man in SA-Experimenten TGA2.1- mit TGA2.2-transdominanten Suppressor-Pflanzen, so sind die Auswirkungen auf die *Nt103*-Transkriptmengen unterschiedlich stark. SA-Induktionen in TGA2.2traD-Pflanzen führen zu einer Reduktion der *Nt103*-Transkriptmengen auf 15% und weniger (Niggeweg, 1999, Abb. 4.24) im Vergleich zu einer Reduktion auf 25-36% im Falle der TGA2.1traD-Pflanzen (Abb. 4.23, Abb. 4.24).

Dass es sich dabei um einen signifikanten Unterschied zwischen TGA2.1traD und TGA2.2traD handelt, zeigt sich auch bei der 2,4-D-Induktion der *Nt103*-Transkripte.

Während TGA2.1traD bei 2,4-D-Induktionen keinen signifikanten Einfluss auf die *Nt103*-Expression im Vergleich zum w.t. hat (Abb. 4.30), konnte R. Niggeweg (1999) zeigen, dass TGA2.2traD-Pflanzen bei analogen Induktionsversuchen die *Nt103*-Transkriptmengen auf ein Viertel reduzieren. Die beschriebene Redundanz der TGA-Faktoren 2.1/2.2 bei der Überexpression in Wirkung auf *Nt103* (siehe oben) scheint bei der transdominanten Suppression nicht vorzuliegen.

Der EMSA liefert die unmittelbare Erklärung für das unterschiedliche Vermögen der beiden TGAtraD-Faktoren, die *Nt103*-Transkription zu beeinflussen. Im EMSA mit Gesamtzellextrakten senkt die Expression von TGA2.1traD wie auch TGA2.2traD den retardierten Anteil auf ein Fünftel. Die Betrachtung der EMSA mit Zellkernproteinextrakten offenbart jedoch stark voneinander abweichende Einflüsse der beiden transgen exprimierten traD-Proteine. TGA2.2traD führt auch im Zellkern zu einer Reduktion des Shifts im EMSA auf 40% im Vergleich zum w.t.. Diese Reduktion des ASF-1-Komplexes erklärt die verminderte Transkriptmenge von *Nt103* bei Induktionsversuchen. Der EMSA mit Kernproteinen aus TGA2.1traD-Pflanzen zeigt keine Reduktion des Shifts, sondern eine leichte Verstärkung (Faktor 1.6 des w.t.-Wertes). Die Reduktion der ASF-1-Aktivität kann also nicht als Erklärung für die Auswirkungen auf die *Nt103*-Transkriptmenge dienen.

Die ASF-1-Aktivität ist im Zusammenhang mit den Mengen an TGA2.1traD im Zellkern zu sehen (Abb. 4.14). TGA2.1traD liegt im Vergleich zum endogenen TGA2.1 im mehrfachen molaren Überschuss im Zellkern vor. Da TGA2.1 aber nur 20% von ASF-1 konstituiert, sind die Auswirkungen der TGA2.1traD-Überexpression auf die addierte Menge von TGA2.2 und TGA2.1 nur moderat. In diesen Pflanzen scheint die supprimierende Wirkung von TGA2.1traD im Zellkern kompensiert zu werden, welches offensichtlich in den TGA2.2traD-Pflanzen nicht möglich ist.

Ein zweiter Aspekt, der das unterschiedliche EMSA-Verhalten erklären könnte, ist die Möglichkeit, dass TGA-assoziierte Proteine analog zu den bei TGA1a gemachten Beobachtungen (Johnson et al., 2001) die DNA-Bindung modulieren. Folglich könnte die Änderung der *Nt103*-Transkriptmenge in TGA2.1traD-Pflanzen bei SA-Induktionen durch einen indirekten Effekt zustande kommen. Möglich wäre, dass SARP/ASF-1-assoziierte Proteine, welche die *as-1*-Bindung modulieren könnten, im Cytosol oder im Zellkern durch die Überexpression von TGA2.1traD begrenzt sind und über TGA2.1traD dem bindenden ASF-1-Komplex entzogen werden. Möglicherweise ist dieses bereits 1996 postulierte Protein (Stange et al., 1997) bei TGA2.1 und TGA2.2 nicht identisch oder es bindet nur an einen der

beiden TGA-Faktoren des ASF-1/SARP. Eine genaue Erklärung der Effekte der TGA-transdominanten Suppressor-Linien auf die *Nt103*-Transkription ist mit den zur Verfügung stehenden experimentellen und publizierten Daten derzeit nicht möglich.

Die genauere Analyse der MeJA-Experimente ist aus oben genannten Gründen nicht möglich. Auffällig ist jedoch, dass die supprimierende Wirkung von TGA2.2traD und von TGA2.1traD auf die *Nt103*-Transkription gleich stark ausfällt (Abb. 4.28).

Vergleicht man die Auswirkung der transdominanten Suppression zwischen den TGA2.1traD- und mit den TGA2.2traD-Pflanzen bezüglich der Zielgene *IEGT*, *parA* und *PR1a* bei dem Stimulies SA, so führt nur die Suppression bei der TGA2.2traD-Pflanze zu Expressionsänderungen (Niggeweg, 1999; diese Arbeit). Eine Erklärung für das Ausbleiben der Wirkung auf Zielgene bei den TGA2.1traD-Pflanzen bietet der EMSA. Bei den TGA2.1traD-Pflanzen kommt es mit Kernproteinen zu keiner Abschwächung des Gelshifts im Gegensatz zu TGA2.2traD-Kernextrakten (siehe 5.3). Die im Falle des *Nt103*-Promotors postulierten Effekte indirekter Art (siehe oben) wirken sich folglich nicht generell auf die Promotoraktivität aus, sondern sind promotorkontextspezifisch.

5.4.3 Unterschiedliche Wirkung von TGA2.1- und TGA2.2-Überexpression auf Zielgene

Die TGA2.1-Überexpression hat keinen Einfluss auf die *IEGT*-Transkriptionsrate in Reaktion auf SA. Gleichzeitig führt SA-Induktion bei denselben Pflanzen im gleichen zeitlichen Fenster ($t=1-5$ h) zu einer Steigerung der Transkriptmenge beim *Nt103*-Gen. Folglich muss TGA2.1 in der Blatzelle in diesem Zeitfenster in der aktiven Form vorliegen, wird jedoch im *IEGT*-Promotor nicht eingebunden. Die Erklärung, dass möglicherweise die *IEGT*-Transkriptionsrate nicht mehr zu steigern ist, weil das *as-1*-Element im SA-induzierten Zustand mit der w.t.-TGA-Konzentration bereits vollständig besetzt ist, kann ausgeschlossen werden. R. Niggeweg (1999) konnte mit TGA2.2-Überexpressionspflanzen in analogen Experimenten die SA-induzierte Expression des *IEGT*-Gens signifikant beeinflussen. Die für TGA2.2 postulierte Einbindung in den Promotor findet bei TGA2.1 nicht statt. Somit liegt ein funktioneller Unterschied dieser beiden Transkriptionsfaktoren im *IEGT*-Promotor bei der SA-Induktion vor. Vermutlich liegt die Information für die unterschiedliche Wechselwirkung mit dem Restpromotor des *IEGT*-Gens im N-Terminus, da sich die Proteine in dieser Domäne sehr stark unterscheiden und die Homologie im Restprotein sehr hoch ist.

Im Falle des *PR1a*-Promotors konnte weder die Überexpression von TGA2.1 noch von TGA2.2 eine Steigerung der Promotoraktivität erzielen. Beim *PR1a*-Promotor handelt es sich

um einen ausgesprochen starken Promotor in Reaktion auf die SA-Induktion. Vermutlich kann die Aktivität nicht mehr durch eine Erhöhung der TGA-Faktorenkonzentration gesteigert werden.

Auch im Falle des *parA*-Promotors hatte die Überexpression beider TGA-Faktoren keine steigernde Wirkung auf die Promotoraktivität in Reaktion auf die SA-Applikation. Analog zu der Erklärung beim *PRIa*-Promotor ist vermutlich die Transkriptionsaktivierung über das *as-1*-Element nicht steigerbar.

5.5 Abschließende Bemerkungen

Im Vergleich zu TGA2.2 besitzt TGA2.1 einen um 140 AS längeren N-Terminus, der im Hefe-Zwei-Hybrid-System die Transkription stimuliert. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass TGA2.1 in Pflanzen ein wirksamerer Transkriptionsaktivator ist als TGA2.2. Der Vergleich von Pflanzen, die ähnliche Mengen an transgenem TGA2.1 und TGA2.2 exprimieren, unterstützt diese Hypothese jedoch nicht. Die mögliche Aktivierungsdomäne von TGA2.1 führt *in vivo* bei den TGA2.1-Überexpressionspflanzen bei keinem der untersuchten Promotoren zu einer sich von der TGA2.2-Überexpression abhebenden Steigerung der Transkriptmenge. TGA2.1 konnte keine Funktion bei der Steigerung der Transkriptmengen von Zielgenen zugeordnet werden, die TGA2.2 nicht ebenfalls abdecken kann. Umgekehrt besitzt TGA2.2 Funktionen im *IEGT*-Promotor, welche nicht von TGA2.1 kompensiert werden können. Somit ist *in vivo* für TGA2.1 keine transkriptionelle Aktivierungsdomäne nachweisbar.

Es ist jedoch denkbar, dass es durchaus eine spezielle Rolle von TGA2.1 gibt, diese aber in dem untersuchten Gewebe nicht zum Tragen kommt. Solche Redundanzen in Teilbereichen zweier verwandter Proteine mit spezifischen Funktionen in anderen Zellfunktionen wurden beschrieben (Fitzgerald et al., 1993; Pickett und Meeks-Wagner, 1995). In diesem Zusammenhang ist zu klären, ob es sich um funktionelle Unterschiede der beiden Proteine handelt (z.B. bedingt durch die unterschiedlichen N-Termini von TGA2.1 und TGA2.2) oder einfach um ein Ergebnis unterschiedlicher Expressionsmuster (so ist es denkbar, dass TGA2.1 in Epidermiszellen, nicht aber Geleitzellen exprimiert wird, während das Expressionsmuster von TGA2.2 genau umgekehrt wäre). Viele Gene sind in der Entwicklung sehr genau reguliert und differenzielle Expression ist stark abhängig vom Zelltyp (Sterky et al., 1998). Aus diesen Gründen scheint es lohnend, andere Zelltypen zu untersuchen (z.B. Epidermis-, Stomata-, Mesophyllzellen). Zwei experimentelle Ansätze bieten sich zur Beantwortung dieser Frage an. Zum einen könnte über *in situ*-Hybridisation geklärt werden, ob es in den

einzelnen Zelltypen zu einer differentiellen Expression des einen TGA-Faktors kommt, während das Transkript des anderen TGA-Faktors nicht detektierbar ist. Ein weiterer Ansatz wäre die Isolation der Promotoren der Transkriptionsfaktoren TGA2.1 und TGA2.2, um mit Promotor-Reportergenfusionen die zellspezifische Expression der Transkriptionsfaktoren zu klären (Jefferson, 1987; Jefferson et al., 1987).

Möglicherweise ist aber auch der in dieser Arbeit gewählte experimentelle Ansatz der Überexpression nicht geeignet, da andere Faktoren limitierend sind. Die Erstellung von transgenen Pflanzen, in denen kein bzw. geringste Mengen TGA2.1 oder TGA2.2 vorliegen, mit Hilfe der RNAi-Methode bietet in diesem Fall eine Lösung (Chuang und Meyerowitz, 2000; Smith et al., 2000; Waterhouse et al., 1998). Ein weiteres Spektrum an Zielgenen wäre für diese Untersuchungen erstrebenswert. So ist denkbar, dass spezifische TGA2.1-Funktionen nicht erkannt wurden, da der Transkriptionsfaktor in den untersuchten Genen keine spezifische Rolle hat, wohl aber in anderen Promotoren, die nicht untersucht wurden. In den RNAi-Pflanzen würde die Methode des 'differential displays' zur Anwendung kommen, um Gene zu identifizieren, die veränderte Transkriptmengen aufweisen und somit potentielle Zielgene sind. Ein alternativer Weg zum 'differential display' für die Identifikation von veränderten Transkriptmengen in den RNAi-Pflanzen ist die Verwendung von 'microarrays' (Maleck et al., 2000; Schenk et al., 2000). Derzeitig ist jedoch kein 'chip' mit ausreichend vielen Tabak-ESTs verfügbar.

Das Ausschalten beider TGA-Faktoren über die RNAi-Methode sollte in Erwägung gezogen werden, da bekannt ist, dass sich TGA2.1 und TGA2.2 in einigen Funktionen überlappen. So führte z.B. erst das Ausschalten der drei Transkriptionsfaktoren SEP1, SEP2 und SEP3, die alle eine Rolle bei der Blütenentwicklung spielen, zu einem drastischen Phänotyp, während die Eliminierung eines Gens sehr wenig Auswirkung auf die Blütenentwicklung hatte (Pelaz et al., 2000; Bouche und Bouchez, 2001). Solche funktionellen Redundanzen wurden auch bei den SHATTERPROOF Genen SHP1 und SHP2 beobachtet, bei denen ebenfalls das Ausschalten eines einzelnen Gens zu keinem erkennbaren Phänotyp führte, die Eliminierung beider Gene dagegen deutliche Änderungen zur Folge hatte (Liljegren et al., 2000).

Ein letzter wichtiger Aspekt für die Entschlüsselung der Rolle der Transkriptionsfaktoren im ASF-1-Komplex ist die Identifizierung von assoziierten Proteinen, die eine entscheidende Rolle bei der Regulation der DNA-Bindung des ASF-1-Komplexes spielen könnten. Im Falle von TGA1a gibt es ein 120 kDa-Protein, das an den C-Terminus von TGA1a im nicht-induzierten Zustand bindet und somit die DNA-TGA1a-Bindung zu unterdrücken scheint. Ein

Modell dieser Art für einen Repressor von SARP wurde bereits 1996 von Jupin und Chua vorgeschlagen. Diese postulierten assoziierten Proteine sind unter Umständen spezifisch für jeweils einen der beiden TGA-Faktoren. Eine experimentelle Vorgehensweise wäre in diesem Zusammenhang, wie im Falle von TGA1a-assoziierten Proteinen über Immunopräzipitation und/oder über das Hefe-Zwei-Hybrid-System assoziierte Proteine zu identifizieren (Johnson et al., 2001).

6 Zusammenfassung

Das aus dem CaMV35S-Promotor stammende *cis*-Element *activation sequence-1* (*as-1*) vermittelt in höheren Pflanzen die Salizylsäure-, Methyljasmonat- und Auxin-induzierte Expression von Genen. Das *as-1*-Element wurde als funktionelles *cis*-Element in Pflanzenpromotoren nachgewiesen, die durch diese Signalsubstanzen induziert werden. Der an das *as-1*-Element bindende Proteinkomplex SARP/ASF-1 beinhaltet in Tabakblattgewebe den bZIP-Transkriptionsfaktor TGA2.2 als Hauptkomponente.

Um die Funktion von TGA2.1 *in vivo* zu untersuchen, wurden transgene Pflanzen hergestellt, die TGA2.1 ektopisch überexprimierten. In diesen Pflanzen war die Induzierbarkeit des das *as-1*-Element enthaltenden Promotors des *Nt103* Gens auf Gabe von Salizylsäure, Auxin und Methyljasmonat signifikant erhöht. Bereits vorhandene Pflanzen, die TGA2.2 in vergleichbaren Mengen überexprimierten, zeigten eine ähnliche Reaktion, so dass beide Faktoren in Bezug auf den *Nt103*-Promotor redundant sind. Ein voneinander abweichendes Verhalten der beiden TGA-Faktoren zeigte sich beim *IEGT*-Promotor. Während die Überexpression von TGA2.2 bei der SA-Induktion zu einer signifikanten Steigerung der Transkriptmenge führte, hatte die TGA2.1-Überexpression keinen Einfluss.

Des Weiteren wurden Pflanzen hergestellt, die eine TGA2.1-Mutante (TGA2.1traD) exprimierten, welche eine Mutation in der DNA-Bindedomäne enthielt und in denen es somit zu einer transdominanten Suppression kam. Die TGA2.1traD-Pflanzen wiesen genauso wie TGA2.2-transdominante Suppressorpflanzen (TGA2.2traD) in Gelverzögerungsexperimenten (EMSA) eine geringere Retardation der *as-1*-Sonde auf als w.t.-Extrakte. Bei EMSA-Experimenten mit Zellkernproteinen kam es nur bei den TGA2.2traD-Pflanzen zu einer Reduktion der retardierten Fraktion. In TGA2.1traD-Pflanzen hatte eine SA-Induktion nur auf den *Nt103*-Promotor Einfluss und führte zu einer Verminderung der Transkriptmenge.

Für die immunochemische Charakterisierung sowie für Gelverzögerungsexperimente wurden neue Proteinextraktionsmethoden erarbeitet, bei denen die proteolytische Spaltung von TGA2.1 in Gesamtzellextrakten bzw. in denaturierten Kernextrakten vollständig unterdrückt wurde. Damit konnte die TGA2.1-Prozessierung als Artefakt des Proteinaufschlusses definiert und eine regulative Funktion *in vivo* ausgeschlossen werden. Die entwickelten Extraktionsprotokolle führten zu einer höheren ASF-1-Aktivität und auch der relative Anteil an TGA2.1 im ASF-1-Komplex in Gelverzögerungsexperimenten stieg an.

7 Literaturverzeichnis

Alexander, D., Goodman, R. M., Gut-Rella, M., Glascock, C., Weymann, K., Friedrich, L., Maddox, D., Ahl-Goy, P., Luntz, T., Ward, E. und Ryals, J. (1993). Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7327-7331.

Alting-Mees, M. A. und Short, J. M. (1989). pBluescript II: gene mapping vectors, *Nucleic Acids Res* 17, 9494.

An, G., Costa, M. A. und Ha, S.-B. (1990). Nopaline synthase promoter is wound inducible and auxin inducible, *Plant Cell* 2, 225-233.

Baker, C. J. und Orlandi, E. W. (1995). Active oxygen in plant pathogenesis, *Ann Rev Phytopath* 33, 299-321.

Benfey, P. N. und Chua, N. H. (1990). The cauliflower mosaic virus 35S promoter: combinatorial regulation of transcription in plants, *Science* 250, 959-966.

Benfey, P. N., Ren, L. und Chua, N. H. (1989). The CaMV 35S enhancer contains at least two domains which can offer different developmental and tissue-specific expression patterns, *Embo J* 8, 2195-2202.

Berhane, K., Widersten, M., Engstrom, A., Kozarich, J. und Mannervik, B. (1994). Detoxication of base propenals and other α , β -unsaturated aldehyde products of radical reactions and lipid peroxidation by human glutathione S-transferases, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1480-1484.

Bouche, N. und Bouchez, D. (2001). *Arabidopsis* gene knockout: phenotypes wanted, *Current Opinion in Plant Biology* 4, 111-117.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* 72, 248-54.

Bullock, W. O., Fernandez, J. M. und Short, J. M. (1987). XL1-Blue a high efficiency plasmid transforming *recA-Escherichia coli* strain with beta galactosidase selection, *Biotechniques* 5, 376-379.

Chuang, C. F. und Meyerowitz, E. M. (2000). Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4985-90.

Chuang, C. F., Running, M. P., Williams, R. W. und Meyerowitz, E. M. (1999). The PERANTHIA gene encodes a bZIP protein involved in the determination of floral organ number in *Arabidopsis thaliana*, *Genes Dev* 13, 334-44.

Cornelissen, B. J. C., Horowitz, J., Van Kan, J. A., Goldberg, R. B. und Bol, J. F. (1987). Structure of tobacco genes encoding pathogenesis-related proteins from The PR-1 group, *Nucleic Acids Res* 15, 6799-6811.

- Creighton, T. E. (1993). *Proteins Structures and molecular properties*, Second edition edn (New York, w. H. Freeman and company).
- Dower, W., Miller, J. und Ragsdale, C. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation, *Nucleic Acids Res* *16*, 6127-45.
- Droog, F. N., Hooykaas, P. J., Libbenga, K. R. und van der Zaal, E. J. (1993). Proteins encoded by an auxin-regulated gene family of tobacco share limited but significant homology with glutathione S-transferases and one member indeed shows in vitro GST activity, *Plant Mol Biol* *21*, 965-72.
- Droog, F. N., Hooykaas, P. J. und van der Zaal, B. J. (1995a). 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid and related chlorinated compounds inhibit two auxin-regulated type-III tobacco glutathione S-Transferase, *Plant Physiol* *107*, 1139-1146.
- Droog, F. N., Spek, A., van der Kooy, A., de Ruyter, A., Hoge, H., Libbenga, K., Hooykaas, P. J. und van der Zaal, B. J. (1995b). Promoter analysis of the auxin-regulated tobacco glutathione S-transferase genes Nt103-1 and Nt103-35, *Plant Mol Biol* *29*, 413-429.
- Dunbar, B. S. (1994). *Protein Blotting* (Oxford, Oxford University Press).
- Edwards, R., Dixon, D. P. und Walbot, V. (2000). Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health, *Trends Plant Sci* *5*, 193-8.
- Ellenberger, T. E., Brandl, C. J., Struhl, K. und Harrison, S. C. (1992). The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted alpha helices: crystal structure of the protein-DNA complex, *Cell* *71*, 1223-37.
- Ellis, J. G., Tokuhisa, J. G., Llewellyn, D. J., Bouchez, D., Singh, K., Dennis, E. S. und Peacock, W. J. (1993). Does the *ocs*-element occur as a functional component of the promoters of plant genes?, *Plant J* *4*, 433-43.
- Feltkamp, D., Masterson, R., Starke, J. und Rosahl, S. (1994). Analysis of the involvement of *ocs*-like bZip-binding elements in the differential strength of the bidirectional *mas1'2'* promoter, *Plant Physiol* *105*, 259-68.
- Fitzgerald, K., Wilkinson, H. A. und Greenwald, I. (1993). *glp-1* can substitute for *lin-12* in specifying cell fate decisions in *Caenorhabditis elegans*, *Development* *119*, 1019-1027.
- Fromm, H., Katagiri, F. und Chua, N. H. (1989). An octopine synthase enhancer element directs tissue-specific expression and binds ASF-1, a factor from tobacco nuclear extracts, *Plant Cell* *1*, 977-84.
- Fromm, H., Katagiri, F. und Chua, N. H. (1991). The tobacco transcription activator TGA1a binds to a sequence in the 5' upstream region of a gene encoding a TGA1a-related protein, *Mol Gen Genet* *229*, 181-8.
- Gatz, C., Kaiser, A. und Wendenburg, R. (1991). Regulation of a modified CaMV 35S promoter by the *Tn10*-encoded Tet repressor in transgenic tobacco, *Mol Gen Genet* *227*, 229-37.

- Guevara-Garcia, A., Lopez-Ochoa, L., Lopez-Bucio, J., Simpson, J. und Herrera-Estrella, L. (1998). A 42 bp fragment of the *pmas1'* promoter containing an *ocs*-like element confers a developmental, wound- and chemically inducible expression pattern, *Plant Mol Biol* 38, 743-53.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *J Biol Chem* 166, 556-580.
- Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffmann, D., Eichholtz, D., Rogers, S. G. und Fraley, R. T. (1985). A simple and general method for transferring genes into plants, *Science* 227, 1229-1231.
- Horvath, D. M. und Chua, N. H. (1996). Identification of an immediate-early salicylic acid-inducible tobacco gene and characterization of induction by other compounds, *Plant Mol Biol* 31, 1061-72.
- Horvath, D. M., Huang, D. J. und Chua, N. H. (1998). Four classes of salicylate-induced tobacco genes, *Mol Plant Microbe Interact* 11, 895-905.
- Inoue, H., Nojima, H. und Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *Gene* 96, 23-8.
- Jefferson, R. A. (1987). Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system, *Mol Biol Rep* 5, 387-405.
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. und Bevan, M. W. (1987). GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants, *Embo J* 6, 3901-3907.
- Johnson, C., Glover, G. und Arias, J. (2001). Regulation of DNA binding and trans-activation by a xenobiotic stress-activated plant transcription factor, *J Biol Chem* 276, 172-178.
- Jones, J. D. G., Dean, C., Gidoni, Gilbert, D., Bond-Nutter, D., Lee, R., Bedbrook, J. und Dunsmuir, P. (1988). Expression of bacterial chitinase protein in tobacco leaves using two photosynthetic gene promoters, *Mol Gen Genet* 212, 536-542.
- Jupin, I. und Chua, N. H. (1996). Activation of the CaMV *as-1 cis*-element by salicylic acid: differential DNA-binding of a factor related to TGA1a, *Embo J* 15, 5679-5689.
- Kalderon, D., Richardson, W. D., Markham, A. F. und Smith, A. E. (1984). Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen, *Nature* 311, 33-38.
- Katagiri, F., Lam, E. und Chua, N. H. (1989). Two tobacco DNA-binding proteins with homology to the nuclear factor CREB, *Nature* 340, 727-30.
- Katagiri, F., Seipel, K. und Chua, N. H. (1992). Identification of a novel dimer stabilization region in a plant bZIP transcription activator, *Mol Cell Biol* 12, 4809-16.
- Kawata, T., Imada, T., Shiraishi, H., Okada, K., Shimura, Y. und Iwabuchi, M. (1992). A cDNA clone encoding HBP-1b homologue in *Arabidopsis thaliana*, *Nucleic Acids Res* 20, 1141.

- Kim, J., Tzamarias, D., Ellenberger, T., Harrison, S. C. und Struhl, K. (1993a). Adaptability at the protein-DNA interface is an important aspect of sequence recognition by bZIP proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 4513-7.
- Kim, S.-R., Kim, Y. und An, G. (1993b). Identification of methyl jasmonate and salicylic acid response elements from the nopaline synthase (*nos*) promoter, *Plant Physiol* *103*, 97-103.
- Kinkema, M., Fan, W. und Dong, X. (2000). Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression, *Plant Cell* *12*, 2339-2350.
- Kleemiss, M. H., Gilges, M. und Schomburg, G. (1993). Capillary electrophoresis of DNA restriction fragments with solutions of entangled polymers, *Electrophoresis* *14*, 515-22.
- Klinedinst, S., Pascuzzi, P., Redman, J., Desai, M. und Arias, J. (2000). A xenobiotic-stress-activated transcription factor and its cognate target genes are preferentially expressed in root tip meristems, *Plant Mol Biol* *42*, 679-88.
- Konz, C. und Schell, J. (1986). The promoter of T_L-DNA gene 5 controls the tissue -specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary Vector, *Mol Gen Genet* *204*, 383-396.
- Koziel, M. G., Carozzi, N. B. und Desai, N. (1996). Optimizing expression of transgenes with an emphasis on post-transcriptional events, *Plant Mol Biol* *32*, 393-405.
- Krawczyk, S. (1999) Charakterisierung der DNA-Bindungseigenschaften des pflanzlichen bZIP-Transkriptionsfaktors TGA2.1 aus *Nicotiana tabacum*, Georg-August-Universität, Göttingen.
- Kusaba, M., Takahashi, Y. und Nagata, T. (1996). A multiple-stimuli-responsive *as-1*-related element of *parA* gene confers responsiveness to cadmium but not to copper, *Plant Physiol* *111*, 1161-1167.
- Kyhse-Andersen, J. (1984). Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose, *J Biochem Biophys Methods* *10*, 203-209.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* *227*, 680-685.
- Lam, E., Katagiri, F. und Chua, N. H. (1990). Plant nuclear factor ASF-1 binds to an essential region of the nopaline synthase promoter, *J Biol Chem* *265*, 9909-13.
- Lam, E. und Lam, Y. K. (1995). Binding site requirements and differential representation of TGF factors in nuclear ASF-1 activity, *Nucleic Acids Res* *23*, 3778-85.
- Landschulz, W. H., Johnson, P. F. und McKnight, S. L. (1988). The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins, *Science* *240*, 1759-1764.

- Liljegren, S. J., Ditta, G. S., Eshed, Y., Savidge, B., Bowman, J. L. und Yanofsky, M. F. (2000). SHATTERPROOF MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*, *Nature* 404, 766-770.
- Lindahl, L. und Hinnebusch, A. (1992). Diversity of mechanisms in the regulation of translation in prokaryotes and lower eukaryotes, *Curr Opin Genet Dev* 2, 720-726.
- Liu, X. und Lam, E. (1994). Two binding sites for the plant transcription factor ASF-1 can respond to auxin treatments in transgenic tobacco, *J Biol Chem* 269, 668-675.
- Lutcke, H. A., Chow, K. C., Mickel, F. S., Moss, K. A., Kern, H. F. und Scheele, G. A. (1987). Selection of AUG initiation codons differs in plants and animals, *Embo J* 6, 43-48.
- Maleck, K., Levine, A., Eulgem, T., Morgan, A., Schmid, J., Lawton, K. A., Dangl, J. L. und Dietrich, R. A. (2000). The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance, *Nat Genet* 26, 403-10.
- Marrs, K. A. (1996). The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants, *Annu Rev Physiol Plant Biol* 47, 127-158.
- Marschuk, D., Drumm, M., Saulino, A. und Collins, F. S. (1990). Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products, *Nucleic Acids Res* 19, 1154.
- McPherson, M. J., Quirke, P. und Taylor, G. R. (1991). PCR (Oxford, Oxford University Press).
- Miao, Z. H. und Lam, E. (1995). Construction of a trans-dominant inhibitor for members of the TGA family of transcription factors conserved in higher plants, *Plant J* 7, 887-96.
- Miao, Z. H., Liu, X. und Lam, E. (1994). TGA3 is a distinct member of the TGA family of bZIP transcription factors in *ss*, *Plant Mol Biol* 25, 1-11.
- Mullis, K. B. und Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction, *Methods in enzymology*.
- Murashige, T. und Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture, *Plant Physiol* 15, 473-497.
- Niggeweg, R. (1999) Salizylsäure- und Auxin-induzierte Genexpression in *Nicotiana tabacum*: Funktionelle Bedeutung der TGA-Faktoren der Subklasse II, Doktorarbeit, Universität Bielefeld, Bielefeld.
- Niggeweg, R. und Gatz, C. (1997). Isolation of TGA2.1 (Accession No. U90214), a member of a new subclass of the TGA-family of bZIP-transcription-factors in *Nicotiana tabacum*, *Plant Physiol* 113, 1464.
- Niggeweg, R., Thurow, C., Kegler, C. und Gatz, C. (2000a). Tobacco transcription factor TGA2.2 is the main component of as-1-binding factor ASF-1 and is involved in salicylic acid- and auxin-inducible expression of as-1-containing target promoters, *J Biol Chem* 275, 19897-905.

Niggeweg, R., Thurow, C., Weigel, R., Pfitzner, U. und Gatz, C. (2000b). Tobacco TGA factors differ with respect to interaction with NPR1, activation potential and DNA-binding properties, *Plant Mol Biol* 42, 775-88.

Odell, J. T., Nagy, F. und Chua, N. H. (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter, *Nature* 313, 810-2.

Oh, S. K. und Sarnow, P. (1993). Gene regulation: translational initiation by internal ribosome binding, *Curr Opin Genet Dev* 3, 295-300.

Ohshima, M., Matsuoka, M., Yamamoto, N., Tanaka, Y., Kano-Murakami, Y., Ozeki, Y., Kato, A., Harada, N. und Ohashi, Y. (1987). Nucleotide sequence of the PR-1 gene of *Nicotiana tabacum*, *FEBS Lett* 225, 243-246.

Olmsted, J. B. (1981). Affinity purification of antibodies from diazotized paper blots of heterogeneous protein samples, *J Biol Chem* 256, 11955-11957.

O'Shea, E. K., Klemm, J. D., Kim, P. S. und Alber, T. (1991). X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil, *Science* 254, 539-44.

Paithankar, K. R. und Prasad, K. S. (1991). Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol, *Nucleic Acids Res* 19, 1346.

Pascuzzi, P., Hamilton, D., Bodily, K. und Arias, J. (1998). Auxin-induced stress potentiates trans-activation by a conserved plant basic/leucine-zipper factor, *J Biol Chem* 273, 26631-7.

Payne, G., Parks, T. D., Burkhart, W., Dincher, S., Ahl, P., Mettraux, J. P. und Ryals, J. (1988). Isolation of the genomic clone for pathogenesis-related protein 1a from *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc., *Plant Mol Biol* 11, 89-94.

Pelaz, S., Ditta, G. S., Baumann, E., Wisman, E. und Yanosfsky, M. F. (2000). B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes, *Nature* 405, 200-203.

Perlman, D., Chikarmane, H. und Halvorson, H. (1987). Improved resolution of DNA fragments in polysaccharide-supplemented agarose gels, *Anal Biochem* 163, 247-54.

Pickett, F. B. und Meeks-Wagner, D. R. (1995). Seeing double: appreciating genetic redundancy, *Plant Cell* 7, 1347-56.

Prat, S., Willmitzer, L. und Sánchez-Serrano, J. J. (1989). Nuclear proteins binding to a cauliflower mosaic virus 35S truncated promoter, *Mol Gen Genet* 217, 209-214.

Qin, X. F., Holuigue, L., Horvath, D. M. und Chua, N. H. (1994). Immediate early transcription activation by salicylic acid via the cauliflower mosaic virus as-1 element, *Plant Cell* 6, 863-74.

Ransone, L. J., Visvader, J., Wamsley, P. und Verma, I. M. (1990). Trans-dominant negative mutants of Fos and Jun, *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 3806-10.

- Rieping, M., Fritz, M., Prat, S. und Gatz, C. (1994). A dominant negative mutant of PG13 suppresses transcription from a cauliflower mosaic virus 35S truncated promoter in transgenic plants, *Plant Cell* 6, 1087-1098.
- Roxas, V. P., Lodhi, S., Garrett, D. K., Mahan, J. R. und Allen, R. D. (2000). Stress tolerance in transgenic tobacco seedlings that overexpress glutathione S-transferase/glutathione peroxidase, *Plant Cell Physiol* 4, 1229-1234.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science* 239, 487-91.
- Sakai, T., Takahashi, Y. und Nagata, T. (1998). The identification of DNA binding factors specific for as-1-like sequences in auxin-responsive regions of parA, parB and parC, *Plant Cell Physiol* 39, 731-9.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition edn (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Schenk, P. M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J. P., Richmond, T., Somerville, S. C. und Manners, J. M. (2000). Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 11655-60.
- Schindler, U., Beckmann, H. und Cashmore, A. R. (1992). TGA1 and G-box binding factors: two distinct classes of *Arabidopsis* leucine zipper proteins compete for the G-box-like element TGACGTGG, *Plant Cell* 4, 1309-1319.
- Smith, L. S., Lewis, T. L. und Matsui, S. M. (1995). Increased yield of small DNA fragments purified by silica binding, *Biotechniques* 18, 970-2, 974-5.
- Smith, N. A., Singh, S. P., Wang, M. B., Stoutjesdijk, P. A., Green, A. G. und Waterhouse, P. M. (2000). Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs, *Nature* 407, 319-20.
- Stange, C., Ramirez, I., Gomez, I., Jordana, X. und Holuigue, L. (1997). Phosphorylation of nuclear proteins directs binding to salicylic acid-responsive elements, *Plant J* 11, 1315-24.
- Sterky, F., Regan, S., Karlsson, J., Hertzberg, M., Rohde, A., Holmberg, A., Amini, B., Bhalerao, R., Larsson, M., Villarreal, R., *et al.* (1998). Gene discovery in the wood-forming tissues of poplar: analysis of 5, 692 expressed sequence tags, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13330-5.
- Strompen, G., Grüner, R. und Pfitzner, U. (1998). An as-1-like motif controls the level of expression of the gene for the pathogenesis-related protein 1a from tobacco, *Plant Mol Biol* 37, 871-883.
- Sutherland, M. W. (1991). The generation of oxygen radicals during host plant responses to infection, *Physiol Mol Plant Pathol* 39, 79-93.
- Takahashi, Y., Hasezawa, S., Kusaba, M. und Nagata, T. (1995). Expression of the auxin-regulated parA gene in transgenic tobacco and nuclear localization of its gene products, *Planta* 196, 111-7.

Takahashi, Y., Kuroda, H., Tanaka, R. und Nagata, T. (1989). Isolation of an auxin-regulated gene cDNA expressed during the transition from G₀ to S phase in tobacco mesophyll protoplasts, *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 9279-9283.

Takahashi, Y., Niwa, Y., Machida, Y. und Nagata, T. (1990). Location of the cis-acting auxin-responsive region in the promoter of the par gene from tobacco mesophyll protoplasts, *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 8013-6.

Truesdale, M. R., Doherty, H. M., Loake, G. J., McPherson, G. J., Roberts, M. R. und Bowles, D. J. (1996). Molecular cloning of a novel wound-induced gene from tomato: *twi1*, *Plant Physiol* 112, 446-450.

Ulmasov, T., Hagen, G. und Guilfoyle, T. (1994). The ocs element in the soybean GH2/4 promoter is activated by both active and inactive auxin and salicylic acid analogues, *Plant Mol Biol* 26, 1055-64.

van der Krol, A. R. und Chua, N. H. (1991). The basic domain of plant b-ZIP proteins facilitates import of a reporter protein into plant nuclei, *Plant Cell* 3, 667-675.

van der Zaal, B. J., Droog, F. N., Pieterse, F. J. und Hooykaas, P. J. (1996). Auxin-sensitive elements from promoters of tobacco GST genes and a consensus as-1-like element differ only in relative strength, *Plant Physiol* 110, 79-88.

van der Zaal, B. J., Droog, F. N. J., Boot, C. J. M., Hensgens, L. A., Hoge, J. H. C. und Schilperoort, R. A. (1991). Promoters of auxin-induced genes from tobacco can lead to auxin-inducible and root tip-specific expression, *Plant Mol Biol* 10, 145-157.

van der Zaal, E. J., Mennes, A. M. und Libbenga, K. R. (1987). Auxin -induced rapid changes in translatable mRNAs in tobacco cell suspension, *Planta* 172, 514-519.

Vinson, C., Sigler, P. B. und McKnight, S. L. (1989). Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins, *Science* 246, 911-916.

Waterhouse, P. M., Graham, M. W. und Wang, M. B. (1998). Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13959-64.

Xiang, C., Miao, Z. und Lam, E. (1995). Isolation of TGA6 (Accession No. L42327), a new member of the TGA family of bZIP transcription factors in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Physiol* 109, 721.

Xiang, C., Miao, Z. und Lam, E. (1997). DNA-binding properties, genomic organization and expression pattern of TGA6, a new member of the TGA family of bZIP transcription factors in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Mol Biol* 34, 403-15.

Xiang, C., Miao, Z. H. und Lam, E. (1996). Coordinated activation of as-1-type elements and a tobacco glutathione S-transferase gene by auxins, salicylic acid, methyl-jasmonate and hydrogen peroxide, *Plant Mol Biol* 32, 415-26.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. und Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors, *Gene* 33, 103-119.

Zhang, B., Foley, R. C. und Singh, K. B. (1993). Isolation and characterization of two related *Arabidopsis ocs*-element bZIP binding proteins, *Plant J* 4, 711-6.

Zhang, B. und Singh, K. (1994). *ocs* element promoter sequences are activated by auxin and salicylic acid in *Arabidopsis*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 2507-2511.

Zhou, J. M., Trifa, Y., Silva, H., Pontier, D., Lam, E., Shah, J. und Klessig, D. F. (2000). NPR1 differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the PR-1 gene required for induction by salicylic acid, *Mol Plant Microbe Interact* 13, 191-202.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

2,4-D	2,4-Dichlorophenoxyessigsäure
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
μ	micro ($\times 10^{-6}$)
°C	Grad Celsius
2,6-D	2,6-Dichlorophenoxyessigsäure
³² P	Phosphorisotop der relativen Masse 32
A	Adenosin
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
<i>as-1</i>	<i>activation sequence-1</i>
ASF-1	activating sequence factor-1
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bZIP	basische Domäne/Leucin-Zipper
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	zirka
CaMV	Blumenkohlmosaikvirus „Cauliflower Mosaic Virus“
cDNA	Kopie-DNA von RNA-Sequenzen
CHX	Cycloheximid
Ci	Curie
cpm	Radioaktive Zerfälle pro Minute
d.h.	das heißt
dATP	2'-Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxy-Cytidin-5'-Triphosphat
ddT	Didesoxythymidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	2'-Desoxy-Guanosin-5'-Triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
dTTP	2'-Desoxy-Thymidin-5'-Triphosphat

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	'electrophoretic mobility shift assay' = Gelshift
EST	'expressed sequence tags'
<i>et al.</i>	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
g	Gramm
G	Guanosin
GST	Glutathion S-Transferase
Gus	β-Glucuronidase
h	Stunde(n)
HEC	Hydroxyethylcellulose
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1- ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase 'horseradishperoxidase'
HSP	Heringssperma-DNA
INA	'2,6-dichloroisonicotinic acid'
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galaktosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kb	Kilobasen
kD	Kilo-Dalton
l	Liter
LB	Luria/Bertani-Medium
Lsg.	Lösung
m	milli (x 10 ⁻³)
M	molar
mcs	multiple cloning site, Polylinker
MeJA	Methyljasmonsäure
MES	2-Morpholino-ethansulfonsäure
min	Minute(n)
mind.	Mindestens
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
MS	Murashige und Skoog Medium
MW	Molekulargewicht
n	nano (x 10 ⁻⁹)
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
NAA	α-Naphtalinessigsäure
OD	optische Dichte
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
p	pico (x 10 ⁻¹²)
PAA	Polyacrylamid
PCR	polymerase chain reaction (=

PEG	Polymerasekettenreaktion)
pH	Polyethylenglycol
PIPES	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PR	Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfonsäure)
PVDF	pathogen related
RNA	Polyvinylidenfluorid
RNase A	Ribonukleinsäure
ROS	Ribonuklease A
RT	reactive oxygen species
s	Raumtemperatur
s.o.	Sekunde(n)
SA	siehe oben
SAR	Salizylsäure
SDS	systemic acquired resistance
sec	Natriumdodecylsulfat
SNN	Sekunden
SSC	Samsun NN, Tabakkultivar
ssDNA	standard saline citrat buffer
T	Einzelstrang-DNA
Tab.	Thymin
TAPS	Tabelle
	N-[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-3-aminopropansulfonsäure
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit (=Einheit) der Enzymaktivität
u.a.	unter anderem
u.U.	unter Umständen
ü/N	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
Vol	Volumen
Vol	Volumen
X-Gal	5-Chlor-4-Brom-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid
z.B.	zum Beispiel

8.2 Danksagung

Frau Prof. Dr. C. Gatz danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas, die Unterstützung und die hilfreichen Diskussionen und Anregungen.

Herrn Prof. Dr. R. Tischner, der sich freundlicherweise bereit erklärt hat, die Begutachtung der Arbeit zu übernehmen.

Meinen Eltern, dafür dass ihr mir immer den Freiraum gegeben habt, meinen Weg zu gehen und für eure liberale Erziehung, deren Produkt ich bin. Nicht zu vergessen meiner Schwester, dafür dass wir uns trotz unserer Eigenarten verstehen und gegenseitig unterstützen.

Katrin, dir Danke ich, neben deiner Hilfe in Fragen zur deutschen Sprache, vor allem dafür, dass wir uns gefunden haben. Deine menschlichen Qualitäten sind, es die ich so sehr liebe.

Alexandra T. und Andreas R. einerseits für eure Unterstützung beim Verfassen dieser Arbeit. Andreas, dir danke ich besonders für deine ruhige Art, deine wissenschaftliche Stringenz, die mich beeindruckt und für deine Freundschaft. Alexandra, dir danke ich besonders für dein unendliches menschliches Potential, für deine beeindruckenden naturwissenschaftlichen Fähigkeiten und für deine Freundschaft.

Maren, Carsten, Nina, Katja und Steffi neben meinen anderen nicht extra hervorgehobenen Freunden für euren Anteil, den ihr alle in unterschiedlicher Weise hattet, in dem langen Weg zu diesem Werk.

Zaria for your influence you had and have on me and for your never ending loyalty. Knowing you and being a friend of yours means a great deal to me.

Den Leuten aus dem Labor, der Abteilung, die ihr mir meine manchmal schwierige Art nie nachgetragen habt. Den meisten fühle ich mich nachhaltig freundschaftlich verbunden. Für eure Unterstützung seien besonders erwähnt: Wolfram, für deine nicht endende Bereitschaft zur Hilfe in Computerfragen und anderen Dingen; Ingo für die schöne Zusammenarbeit im Labor und für deine Toleranz gegenüber meiner Musik; Ricarda für die schöne Zusammenarbeit mit dir und für die Grundlagen, die du gelegt hast; Corinna dafür, dass du mir meine manchmal üble Art nie nachgetragen hast; Steffen für die gute Laune und die vielen Kaffeediskussionen; Steffi für deine Art und dafür, dass wir so gut miteinander auskommen; Anne dafür dass du so bist wie du bist, wofür ich dich sehr mag, und für deine positiv kompromisslose Art in manchen Dingen; Wolfgang für die Hilfe in vielen Problemdiskussionen und für deine Freundschaft; Ralf für dein Wesen, dass mich sehr an das Gedicht 'I Don't Enclose...' erinnert, in welchem ich mich selbst wiederfinde.

Alexandra F., Ronald und Anette danke ich für euren Einsatz in eurer Funktion als TA, der immer über das Motto 'Arbeit nach Vorschrift' hinaus ging. Ronald dir möchte ich ausdrücklich für deine gute Laune und für die Arbeit, die du für mich geleistet hast, als ich im Krankenhaus sein durfte. Alex, dir möchte ich ausdrücklich danken, für deine Freundschaft und für deinen Einsatz. Felicitas (Feli) Glasenapp für deinen Rat in Sachen Pflanzenbetreuung und als allgemeiner Ratgeber in Sachen 'grüner Daumen'.

Dann wären hier noch zu erwähnen im Rahmen des Dankes: William Faulkner für 'Light in August' und 'The Unvanquished'; Carson McCullers für 'The Heart is a Lonely Hunter', Ansel Adams, Edward Weston, Annie Leibowitz, Martin Parr, Robert Lebeck, Eve Arnold, James Nachtwey, Duane Michals, Elias Canetti für 'Masse und Macht', Andrej Tarkovskij, Jurek Becker, Misha Glenny für 'The Fall of Yugoslavia' und 'The Balkans', Martin Bell, Tony Parker u.a. für 'The Violence of our Lives', Joseph Conrad für 'The Heart of Darkness', Francis Ford Coppola für 'Apocalypse Now', Tom Tykwer, Ken Loach für 'Kes', Lynne Ramsay für 'Ratcatcher', Shane Meadows für 'TwentyfourSeven', Stanley Kubrick, Sergey Chudakov, Aleksandr Kushner, Jeff Buckley für 'Grace', Leonhard Cohen, Radiohead, Massive Attack, Paul Weller, Ben Harper, Randy Newman, Bob Dylan für 'time out of Mind', Ocean Colour Scene, Herbie Hancock, Abdullah Ibrahim, Cassandra Wilson, Elaine Delmar, Dee Dee Bridgewater, John Coltrane für 'My Favorite Things'.

8.3 Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass die Dissertation mit dem Thema
'Analyse des Transkriptionsfaktors TGA2.1 aus *Nicotiana tabacum*'
selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt wurde.

Göttingen, den 23/05/2001

8.4 Lebenslauf/Curriculum vitae

28/September/1967	geboren in Bremen, deutsche Staatsangehörigkeit
von 1974-1978	Grundschule Delfter Straße, Bremen
von 1978-1987	Gymnasium Schulzentrum Huchting, Bremen
Juni 1987	Abschluss Abitur: 05/06/1987
1989-1996	Studium der Biologie auf Diplom an der Georg-August-Universität Göttingen
Juni/1995-August/1996	Diplomarbeit unter Betreuung von Prof. Jan E. Graebe, Ph. D., Titel: 'Molekulare Charakterisierung ausgewählter Gibberellin-20-Oxidasen'
Oktober 1996	Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation im Albrecht-von Haller-Institut für Pflanzenwissenschaften, Abteilung 'Allgemeine und Entwicklungsphysiologie der Pflanze' (Prof. Dr. C. Gatz)