

**Die Bedeutung des Proteins Scarecrow-like 14 bei der
Regulation der Transkription von Stressgenen**

Dissertation

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

vorgelegt von
Tanja Siemsen
aus Göttingen

Göttingen, 2005

D7

Referentin:

Professorin Dr. Christiane Gatz

Korreferent:

PD Dr. Wolfgang Droege-Laser

Tag der mündlichen Prüfung:

3. November 2005

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Die pflanzliche Reaktion auf abiotischen und biotischen Stress	3
2.2	Reaktive Sauerstoffspezies als Signaltransduktoren	4
2.3	Das an pflanzlicher Stressantwort beteiligte cis-Element as-1	9
2.4	Die Proteine der TGA-Familie binden an das as-1 Element	12
2.5	Protein-Protein-Interaktionspartner der TGA-Familie	18
2.6	Die GRAS-Genfamilie	19
2.7	Zielsetzung und methodischer Ansatz	22
3	Material	23
3.1	Geräte	23
3.2	Verbrauchsmaterialien	24
3.3	Chemikalien	25
3.4	Kits	27
3.5	Proteine	28
3.5.1	Enzyme	28
3.5.2	Proteinstandard	28
3.5.3	Antikörper	28
3.6	Nukleinsäuren	29
3.6.1	Primer	29
3.6.2	Plasmide	32
3.6.3	Hybridisierungssonden	40
3.6.4	DNA-Fragmentlängenstandard	40
3.7	Organismen	41
3.7.1	Bakterien	41
3.7.2	Hefestämme	42
3.7.3	Arabidopsis thaliana Pflanzen	42
3.8	Nährmedien und Zusätze	43
3.8.1	Nährmedien für Bakterien	43
3.8.2	Nährmedien für Hefen	44
3.8.3	Nährmedien für Pflanzen	44
3.8.4	Medium für BY-2-Suspensionskulturen	44
3.8.5	Zusätze	44
3.9	Standardlösungen und Puffer	45

4 Methoden 46

4.1 Anzucht und Kultivierung von Mikroorganismen und Pflanzen 46

4.1.1	Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	46
4.1.2	Anzucht von <i>Pseudomonas syringae</i>	46
4.1.3	Anzucht von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	46
4.1.4	Anzucht von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	47
4.1.5	Kultivierung von Tabak BY-2-Suspensionskulturen	47
4.1.6	Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Pflanzen	47
4.1.6.1	Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Pflanzen auf Erde	47
4.1.6.2	Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Pflanzen in Sterilkultur	47
4.1.7	Oberflächensterilisation von Samen	48
4.1.8	Kreuzung von <i>Arabidopsis thaliana</i>	48
4.1.9	Infektion von <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen mit Pseudomonaden	48
4.1.9.1	Bestimmung des Pseudomonadenwachstums in der Pflanze	49
4.1.9.2	Infektion von <i>Arabidopsis thaliana</i> mit Pseudomonaden für eine RNA-Isolation	49
4.1.10	Induktion der Genexpression in <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen	49

4.2 Molekularbiologische Methoden 50

4.2.1	Methoden zur Isolierung von Plasmid-DNA	50
4.2.1.1	Analytische Mengen	50
4.2.1.1.1	Alkalische Lyse	50
4.2.1.1.2	Plasmidisolierung mit dem QIAprep Spin Miniprep-Kit	50
4.2.1.1.3	Schnellyse von <i>E. coli</i> Zellen für eine anschließende PCR	50
4.2.1.2	Präparative Mengen	51
4.2.1.2.1	DNA-Elution aus Agarosegelen	51
4.2.2	Methode zur Isolierung von genomischer DNA aus <i>Arabidopsis</i>	51
4.2.3	Methoden zur Charakterisierung von Nukleinsäuren	52
4.2.3.1	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren	52
4.2.3.2	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	52
4.2.3.2.1	Auftrennung von DNA in Agarosegelen	52
4.2.3.2.2	Auftrennung von RNA in denaturierenden Agarosegelen	53
4.2.3.2.3	Sequenzierung von DNA	53
4.2.3.2.4	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	54
4.2.3.3	Methoden zur Modifikation von Nukleinsäuren	55
4.2.3.3.1	Restriktionsspaltung von DNA	55
4.2.3.3.2	Ligation	56
4.2.3.3.3	Alkalische Phosphatase Behandlung der DNA	56
4.2.3.3.4	Klonierung mit dem GATEWAY-System	56
4.2.3.4	Transformation von Mikroorganismen und Pflanzen	57
4.2.3.4.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	57
4.2.3.4.2	Transformation von <i>E. coli</i>	57
4.2.3.4.3	Herstellung kompetenter Hefezellen	58
4.2.3.4.4	Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	58
4.2.3.4.5	Herstellung kompetenter Agrobakterien-Zellen	58
4.2.3.4.6	Gentransfer in <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	59
4.2.3.4.7	Transiente Transfektion von Protoplasten aus <i>Nicotiana tabacum</i> cv. Bright Yellow 2- (BY-2-) Suspensionskulturen	59
4.2.3.4.8	Stabile Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	60
4.2.3.5	Northern Blot Analyse	61
4.2.3.5.1	Isolierung von RNA aus Pflanzen mit dem Invisorb Spin Plant RNA Mini Kit	61
4.2.3.5.2	Isolierung von RNA aus Pflanzen mit Trizol	61
4.2.3.5.3	Kapillar Blot	62
4.2.3.5.4	Herstellung eines radioaktiv markierten DNA-Fragments	62
4.2.3.5.5	Hybridisierung des Filters	63
4.2.3.5.6	Waschen der Northern-Blot-Membran	63
4.2.3.5.7	Rehybridisierung	63

4.2.3.6	Southern Blot Analyse	64
4.2.3.6.1	Restriktionsspaltung	64
4.2.3.6.2	Elektrophoretische Auftrennung von DNA	64
4.2.3.6.3	Denaturieren und Neutralisieren der DNA-Gele	65
4.2.3.6.4	Southern Blot (Transfer der DNA auf Nylonmembrane)	65
4.2.4	Transkriptomanalyse mit „ARIZONA whole genome arrays“	65
4.2.4.1	Amplifikation der eingesetzten RNA	66
4.2.4.2	Indirekte Markierung der aRNA	66
4.2.4.3	Hybridisierung der ARIZONA „whole genome arrays“	67
4.2.5	Konstruktion von verwendeten Plasmiden	68
4.2.5.1	Eingangsplasmid	68
4.2.5.1.1	Klonierung von pENTR207/SCL14	68
4.2.5.2	Plasmide für die Transformation von Arabidopsis thaliana	68
4.2.5.2.1	Klonierung von pAlligator2/SCL14	68
4.2.5.2.2	Klonierung von pB2GW7/SCL14	68
4.2.5.2.3	Klonierung von pFGCA7/SCL14-GR	69
4.2.5.3	Plasmide für die transiente Expression von Proteinen in BY-2-Suspensionskulturen	69
4.2.5.3.1	Klonierung von pHBT/SCL14-sGFP	69
4.2.5.3.2	Klonierung von pHBTL/SCL14 ohne GFP	70
4.2.5.4	Plasmide für die Expression von Proteinen in E. coli	70
4.2.5.4.1	Klonierung von pDEST17/SCL14	70
4.3	Biochemische Methoden	70
4.3.1	Präparation von Proteinextrakten	70
4.3.1.1	Expression und Aufreinigung von Proteinen aus E. coli	70
4.3.1.2	Elektroelution von Proteinen	71
4.3.1.3	Denaturierte Gesamtzellextrakte aus Hefe	71
4.3.1.4	Denaturierte Gesamtzellextrakte aus Arabidopsis thaliana	72
4.3.1.5	Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten	72
4.3.1.6	Reportergenassays	73
4.3.1.6.1	GUS-Färbung	73
4.3.1.6.2	Bestimmung der β -Glucuronidase (GUS)-Aktivität in Extrakten aus BY-2-Suspensionskulturen oder Arabidopsis thaliana	73
4.3.1.6.3	Bestimmung der β -Galactosidase (β -Gal)-Aktivität in Hefeextrakten (oNPG-Assay)	74
4.3.1.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	75
4.3.1.8	Coomassie-Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen	76
4.3.1.9	Immuno-Blotting (Western-Blot-Analyse)	76
4.3.1.9.1	Semi-Dry Proteinblot	76
4.3.1.9.2	Immunologische Detektion geblotteter Proteine	77
4.3.1.9.3	Rehybridisierung	77
4.4	Verwendete Computerprogramme	78
5	Ergebnisse	79
5.1	Analyse der Interaktion von SCL14 und TGA2 im Hefe- Ein- und Zweihybridsystem	79
5.2	Interaktionsstudien zwischen TGA2 und verwandten Scarecrow-like Proteinen	82
5.3	Pull-down-Analyse von SCL14 und TGA2	88
5.4	Transiente Analysen der as-1-Aktivität in BY-2-Protoplasten	89

5.5	Analysen der subzellulären Lokalisation in transient transformierten BY-2-Protoplasten	92
5.5.1	Subzelluläre Lokalisierung von SCL14 und TGA2	92
5.5.2	Subzelluläre Lokalisierung von SCL14 nach Inhibierung des Kernexports durch LMB	95
5.6	Herstellung und Charakterisierung eines SCL14-Antiserums	95
5.7	Überexpression von Scarecrow-like 14 (SCL14) in Arabidopsis thaliana	96
5.7.1	Konstitutive Überexpression von SCL14 in transgenen Arabidopsis thaliana Pflanzen	96
5.7.2	Analyse der as-1::GUS-Aktivität in SCL14-überexprimierenden Pflanzen	98
5.7.2.1	Histologischer Nachweis der GUS-Reportergenaktivität	98
5.7.2.2	Analyse der as-1::GUS-Aktivität nach verschiedenen Stimuli	99
5.8	Identifizierung einer T-DNA-Insertionslinie	101
5.8.1	Analyse der as-1::GUS-Aktivität in der SCL14-ko-Linie	104
5.9	Beeinflusst die Lokalisation von SCL14 das as-1-Element ?	106
5.9.1	Expression von SCL14-GR in Arabidopsis thaliana	107
5.9.1.1	Analyse der as-1::GUS-Aktivität nach Dexamethason-Induktion	108
5.9.2	Inhibierung des Kernexports durch LMB hat keinen Einfluß auf die Aktivität des as-1-Elements	110
5.10	Einfluß der Überexpression von SCL14 bzw. T-DNA-Insertion auf die pflanzliche Abwehr gegen das bakterielle Pathogen Pseudomonas syringae	111
5.11	Einfluß abiotischer Faktoren auf die Expression von SCL14	112
5.11.1	Induktion der Transkription von SCL14 durch dunkel-induzierte Seneszenz	112
5.11.2	Induktion der Transkription von SCL14 durch Ozon	113
5.11.3	Keimungsanalyse unter oxidativem Stress	115
5.12	Mikroarray-Analyse	117
5.12.1	Analyse der verwendeten RNA	118
5.12.2	Ergebnis der Mikroarray-Analyse	119
5.12.3	Auswertung der Mikroarray-Analyse	121
6	Diskussion	137
6.1	Überprüfung der Spezifität der TGA2-SCL14-Interaktion in heterologen Hefesystemen	138
6.2	Einfluss von SCL14 auf as-1-vermittelte Expression	141
6.3	Die Bedeutung der SCL14-Lokalisation für die Aktivierung des as-1-Elements	145

6.4	SCL14 scheint nicht an der pflanzlichen Pathogenabwehr beteiligt zu sein	148
6.5	Expression von SCL14 unter abiotischem Stress	149
6.6	Keimungsverhalten transgener Pflanzen unter oxidativem Stress	150
6.7	Identifizierung potentieller Zielgene von SCL14	151
7	Literaturverzeichnis	157
8	Anhang	175
8.1	Vektorkarten der im Rahmen dieser Arbeit erstellten Plasmide	175
8.2	Alignments	176
8.2.1	Aminosäure-Alignment der C-Termini von SCL14, SCL26 und SCL27	176
8.2.2	Aminosäure-Alignment von TGA2, TGA5 und TGA6	177
8.3	Glossar	178
	Danksagung	182

1 Zusammenfassung

Das *cis*-regulatorische Element *as-1* ist durch Salizylsäure (SA) und Auxin induzierbar. Dabei wird eine Beteiligung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) vermutet. Transkriptionsfaktoren der TGA-Familie binden an das *as-1*-Element und führen so zu einer Aktivierung der Genexpression. Für TGA2.2 aus Tabak konnte in Hefe gezeigt werden, dass er an DNA bindet, aber keine Aktivierung der Genexpression bewirkt.

In einem modifizierten Hefe Einhybridsystem mit dem orthologen Faktor TGA2 aus *Arabidopsis thaliana* konnte Scarecrow-like 14 (SCL14) als Co-Aktivatorprotein identifiziert werden, das mit TGA2, der an ein dreifaches *as-1*-Element gebunden vorlag, interagiert.

SCL14 ist ein Mitglied der *GRAS*-Genfamilie, die eine Reihe putativer Transkriptionsfaktoren umfasst.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Interaktion *in vitro* in einer pull down-Analyse bestätigt, und die Spezifität der Interaktion zwischen TGA2 und SCL14 im Vergleich mit nah-verwandten Proteinen der GRAS-Familie gezeigt werden.

Die Überexpression von SCL14 *in planta* hatte eine gesteigerte Aktivität eines *as-1::GUS*-Konstrukts (REDMAN et al., 2002) zur Folge, die unabhängig von den bekannten Stimuli SA oder 2,4-D, einem Auxin-Analogon, zu sein scheint. In T-DNA-Insertionspflanzen (ko), die *SCL14* nicht exprimieren, konnte kein *GUS*-Signal detektiert werden. Dies deutet auf eine essentielle Bedeutung von SCL14 für die Aktivierung der *as-1*-vermittelten Genexpression hin.

Ein weiterer Interaktionspartner von SCL14 ist der Kernexportrezeptor XPO1 (Thomas MERKLE, unveröffentlicht). Der XPO1-vermittelte Kernexport kann durch Behandlung mit Leptomycin B (LMB) inhibiert werden. In mit SCL14-GFP transient transfizierten Tabak BY-2-Protoplasten führt die Behandlung mit LMB zu einer ausschließlichen Lokalisierung im Zellkern. Dies spricht dafür, dass die SCL14-Lokalisierung im

Cytosol auf den XPO1-vermittelten Kernexport zurückzuführen ist. Die Inhibierung hat aber keinen Einfluss auf die Aktivität der *as-1*-vermittelten Genexpression.

In Pflanzen, die SCL14 sowohl endogen als auch fusioniert mit der Glucocorticoidrezeptor-Bindedomäne (GR) exprimierten, konnte das SCL14-GR-Fusionsprotein in uninduziertem Zustand außerhalb des Kerns gehalten werden. In diesem Zustand konnte bereits eine erhöhte *as-1::GUS*-Aktivität detektiert werden. Induktion mit Dexamethason hatte eine weitere Erhöhung der Aktivität zur Folge. Daher kann ein positiver Einfluss von SCL14 sowohl bei Vorhandensein im Zellkern als auch im Cytosol auf die *as-1*-vermittelte Genexpression postuliert werden.

Die Expression von SCL14 wird durch dunkel-induzierte Seneszenz und Ozon erhöht. Eine Gemeinsamkeit beider Stresse ist, dass in ihrem Verlauf ROS entstehen. Daher könnte die Verstärkung der SCL14-Expression durch einen erhöhten ROS-Gehalt induziert werden.

Des Weiteren können Samen der SCL14-ko-Linie unter oxidativem Stress, verursacht durch Paraquat, nicht auskeimen. Dies deutet auf eine mögliche Beteiligung von SCL14 an der Unschädlichmachung von ROS hin.

Da bisher keine Beteiligung von SCL14 an der Regulation der Expression bekannter Gene, die *as-1*-ähnliche Elemente im Promotorbereich tragen, gezeigt werden konnte, wurde in Mikroarray Analysen nach möglichen Zielgenen gesucht. Dabei konnten zwei Gene der *NAM*-Familie (At1g01720 und At1g77450) identifiziert werden, die in der ko-Linie schwach und in der OE-Linie stark exprimiert werden. Beide Gene werden, wie SCL14 auch, verstärkt in Samen exprimiert und enthalten in ihren Promotoren TGA-Bindestellen. Dies deutet auf eine SCL14-TGA2-abhängige Expression hin.

2 Einleitung

2.1 Die pflanzliche Reaktion auf abiotischen und biotischen Stress

Pflanzen sind an einen Standort gebunden und müssen sich daher an verschiedene Umweltbedingungen anpassen können. Im Laufe der Evolution haben sie verschiedene Mechanismen entwickelt, mit denen sie auf Umweltveränderungen reagieren können (KUHLEMEIER *et al.*, 1987). Starke Temperaturschwankungen, Wassermangel oder Veränderungen der Lichtintensität zählen zu den wesentlichen abiotischen Stressfaktoren. Doch Pflanzen können auch biotischen Stressen, wie Pilzen, Bakterien, Viren oder Fraßfeinden, ausgesetzt sein. Zur Abwehr solcher Stresse machen sie sich verschiedene Strategien zu nutze. Zum einen wehrt sich die Pflanze passiv durch physikalische Barrieren wie die Kutikula und Zellwände, aber auch chemische Barrieren wie antimikrobielle Substanzen dienen ihrem Schutz. Gelingt es dem Pathogen diese Barrieren zu überwinden, kann es zu Krankheitssymptomen kommen. Bei rechtzeitiger Erkennung des Pathogens durch die Pflanze wird eine induzierte Abwehr ausgelöst. Diese Abwehr hat zum Ziel, eine Vermehrung und Ausbreitung des Pathogens zu verhindern. Eine lokale Abwehrreaktion ist die hypersensitive Reaktion (HR), in dessen Verlauf nekrotische Läsionen am Infektionsort auftreten, die auf lokal begrenzten programmierten Zelltod zurückzuführen sind (LAM *et al.*, 2001). Parallel dazu kann eine systemisch erworbene Resistenz (SAR) entstehen. Dabei handelt es sich um eine erhöhte Resistenz einer Pflanze, die eine Erstinfektion von Pathogenen überlebt hat, gegen weitere Sekundärinfektionen (RYALS *et al.*, 1996). Ein wichtiges Signalmolekül der SAR ist Salizylsäure (SA).

2.2 Reaktive Sauerstoffspezies als Signaltransduktoren

Im Rahmen der HR kommt es zu einem sogenannten oxidativen „burst“, bei dem reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie Superoxid, Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxyl-Radikale entstehen. Diese ROS können in der Pflanze durch ein NADPH-abhängiges Oxidase-System gebildet werden, das die Reduktion von Sauerstoff zu Superoxid katalysiert (APEL und HIRT, 2004). NADPH dient dabei als Elektronen-Donor. Das entstandene Superoxid bildet dann das Ausgangsprodukt für die Entstehung weiterer ROS.

Auch unter abiotischem Stress werden ROS gebildet, die als Signalmoleküle dienen. Metabolische Prozesse, wie Respiration und Photosynthese, führen unter nicht optimalen Bedingungen unvermeidlich zur Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in Mitochondrien, Chloroplasten und Peroxisomen (FOYER *et al.*, 1994). ROS können Proteine, DNA oder Lipide schädigen. Eine gut abgestimmte Balance zwischen H_2O_2 -Entstehung und seiner Entfernung ist entscheidend für das Überleben einer Pflanze. Eine Störung in dieser Balance führt zur Schädigung von Zellen. Sogar ein leicht erhöhter H_2O_2 -Gehalt als Folge von biotischem und abiotischem Stress induziert bereits eine Abwehrreaktion (DAT *et al.*, 2000). Solch eine Abwehrantwort umfasst beispielsweise die Anpassung an unterschiedliche Lichtbedingungen (KARPINSKI *et al.*, 1999; PRASAD *et al.*, 1994), eine gleichzeitige Toleranz gegenüber verschiedenen Stressen durch die Nutzung gleicher Signaltransduktionswege bzw. gleicher Signalmoleküle („cross tolerance“) (BOWLER und FLUHR, 2000; PASTORI und FOYER, 2002) sowie die Induktion von aktiven Zelltod-Prozessen z.B. durch Ozon, UV-Bestrahlung oder Kälte (DAT *et al.*, 2003; LEVINE *et al.*, 1994).

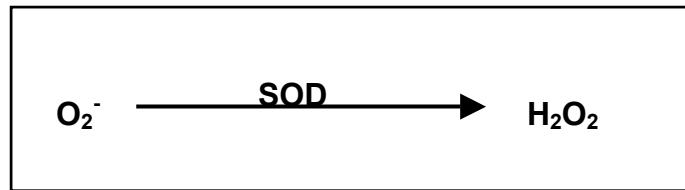
Wie andere Eukaryoten auch, besitzen Pflanzen ein kompliziertes System, um den intrazellulären ROS-Gehalt während wechselnder Umweltbedingungen zu kontrollieren. Die verschiedenen Komponenten des enzymatischen antioxidativen Systems unterscheiden sich in ihrer „Reinigungskapazität“ nicht nur in Bezug auf Spezifität und Affinität bezüglich verschiedener ROS-Spezies (z.B. Superoxide, H_2O_2 , Singulett Sauerstoff), sondern auch in ihrer subzellulären Lokalisation in der Nähe von ROS-Produktionsstellen (VRANOVÁ *et al.*, 2002). Eine Hauptquelle von H_2O_2 ist die

Photorespiration (KARPINSKI et al., 2003; NOCTOR et al., 2002). Die dabei entstandene große H_2O_2 -Menge wird hauptsächlich durch peroxisomale Katalasen unschädlich gemacht, obwohl auch andere antioxidative Enzyme in Blattperoxisomen aktiv sind (CORPAS et al., 2001). Zusätzlich erfolgt die Bildung von H_2O_2 bei Lichtstress durch das photochemische „quenching“ von überschüssiger Lichtenergie durch die Mehler-Reaktion.

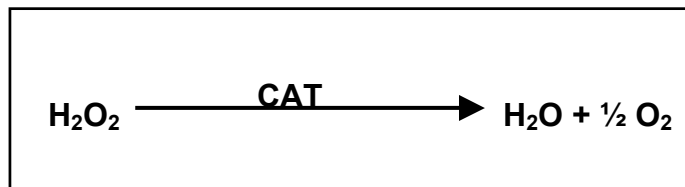
Neben den Katalasen (CAT) gibt es weitere Enzyme, die an der Vernichtung von ROS in der Pflanze beteiligt sind, wie z.B. die Superoxid-Dismutase (SOD), Ascorbat Peroxidase (APX) und die Glutathion Peroxidase (GPX). Zunächst dismutieren Superoxid-Dismutasen Superoxide zu H_2O_2 . Dann detoxifizieren APX, GPX und CAT das entstandene H_2O_2 . Im Gegensatz zu CAT benötigt APX ein Ascorbat- und Glutathion-Regenerationssystem, den Ascorbat-Glutathion-Zyklus. Das Zusammenspiel der Enzyme ist in Abbildung 2.1 dargestellt.

Ein Unterschied zwischen der Detoxifizierung durch APX und GPX ist, dass GPX das Zwischenprodukt Glutathion (GSH) direkt als reduzierendes Agens nutzt. Im Ascorbat-Glutathion-Zyklus entsteht hingegen Dehydroascorbat spontan aus Monodehydroascorbat (MDA) und wird durch eine Dehydroascorbat Reduktase (DHAR) unter Beteiligung von Glutathion reduziert. Der GPX-Zyklus wird durch die Regeneration von GSH zu oxidiertem Glutathion (GSSG) durch die Glutathion Reduktase (GR) geschlossen. Pflanzen besitzen wie die meisten Organismen eine Vielzahl von Genen, die für SOD und APX kodieren. Verschiedene Isoforme befinden sich sowohl in Chloroplasten, Mitochondrien, Peroxisomen, als auch im Cytosol und im Apoplasten (ASADA et al., 1987). Während GPX im Cytosol zu finden ist, ist CAT hauptsächlich in Peroxisomen lokalisiert.

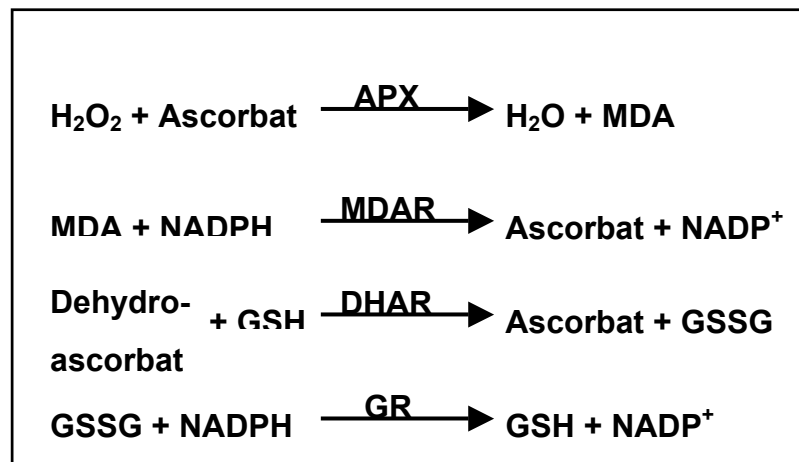
A



B



C



D

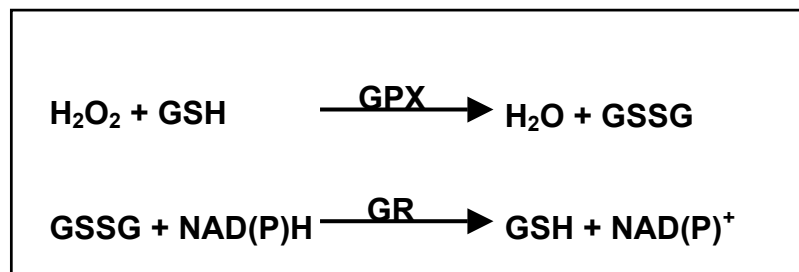


Abbildung 2.1: Darstellung enzymatischer Reaktionen während der Detoxifizierung von ROS nach APEL und HIRT, 2004. A: Superoxid Dismutase-Reaktion, B: Katalase-Reaktion, C: Ascorbat-Glutathion-Zyklus, D: Glutathion Peroxidase-Zyklus. SOD: Superoxid Dismutase, CAT: Katalase, APX: Ascorbat Peroxidase, MDA: Monodehydroascorbat, MDAR: MDA Reduktase, DHAR: Dehydroascorbat Reduktase, GSSG: oxidiertes Glutathion, GR: Glutathion Reduktase, GSH: Glutathion, GPX: Glutathion Peroxidase

WILLEKENS et al. (1997) fanden heraus, dass Katalasen der *CAT*-Multigenfamilie unentbehrlich sind, um eine Toleranz gegenüber oxidativem Stress zu entwickeln. Sie konnten zeigen, dass Tabakpflanzen mit verringerter *CAT*-Aktivität einen erhöhten ROS-Gehalt als Reaktion auf abiotischen und biotischen Stress aufwiesen und sensitiver auf oxidativen Stress reagieren (KANDALL et al., 1983; WILLEKENS et al., 1997). *Arabidopsis*-Pflanzen, die eine geringe *CAT2*-Aktivität aufwiesen, reagierten sensitiver auf Ozon-Stress (VANDENABEELE et al., 2004).

In Katalase-defizienten Tabak-Pflanzen kann das bei der Photorespiration entstehende H_2O_2 die lokale und systemische Abwehr induzieren und ein Zelltodprogramm aktivieren, das einige Parallelen zu programmiertem Zelltod (PCD) aufweist (CHAMNONGPOL et al., 1998; DAT et al., 2003). Für Katalase-defiziente Gerste konnte gezeigt werden, dass das bei der Photorespiration entstandene H_2O_2 den antioxidativen Redox-Status in Blättern stören kann (NOCTOR et al., 2002). Solch eine Störung kann potentiell die Signaltransduktion auf biochemischer und auf Ebene der Genexpression aktivieren (DESIKAN et al., 2001; VANDENABEELE et al., 2003).

Bei Fehlen von *CAT* wurde die Enzymaktivität von *APX* und *GPX* verstärkt. Interessanterweise konnte von RIZHKY et al. (2002) gezeigt werden, dass sich Pflanzen, denen *APX* und *CAT* fehlten, weniger sensitiv verhielten. Da in diesen Pflanzen metabolische Gene, u.a. aus dem Pentosephosphatweg, sowie ein chloroplastidäres Homolog der mitochondrialen alternativen Oxidase induziert waren, und die photosynthetische Aktivität verringert war, wurde postuliert, dass die Pflanze auf diesem Weg das Fehlen von *APX* und *CAT* kompensieren kann. Das Ausmaß von oxidativem Stress in einer Zelle wird durch die Menge an Superoxid, H_2O_2 und Hydroxyl-Radikalen bestimmt. Daher ist ein ausgeglichenes Vorhandensein von *SOD*, *APX* und *CAT* entscheidend, um vorhandene Mengen an ROS möglichst gering zu halten. Eine Veränderung des Verhältnisses zwischen den Enzymen würde kompensatorische Mechanismen induzieren.

ALLEN konnte 1995 zeigen, dass eine Überexpression von chloroplastidärer *SOD* in Tabak die Toleranz gegenüber oxidativem Stress nicht verändert. Daraus wurde geschlossen, dass andere antioxidative Mechanismen limitierend wirken. Die Überexpression von chloroplastidärer *SOD* aus Erbsen in Tabak erhöhte hingegen die

Resistenz gegenüber Methylviologen (Paraquat), einem ROS-induzierenden Agens (ALLEN, 1995).

Generierung von ROS in verschiedenen Kompartimenten der Zelle führt zu Veränderungen des Kern-Transkriptoms. Dies deutet darauf hin, dass eine Informationsübermittlung zwischen den Organellen und dem Kern stattfinden muss. Zwar haben Pflanzen, ähnlich wie Hefen, eine MAPK-Signaltransduktionskaskade und verschiedene Proteinphosphatasen entwickelt, um ROS-Signale weiterzuleiten, jedoch ist der genaue Signalweg bisher weitgehend unbekannt. Es sind jedoch verschiedene Wege der Signalübermittlung denkbar. Es könnte eine Aktivierung von ROS-Rezeptoren erfolgen, die eine Signalkaskade induzieren, welche schließlich zu veränderter Genexpression führt. Denkbar wäre auch, dass einzelne Komponenten des Signalweges durch ROS direkt oxidiert werden. Ein Beispiel für einen Redox-sensitiven Regulator ist NPR1 (nonexpressor of *PR* genes), ein Protein, das an der Salizylsäure (SA)-vermittelten Genexpression beteiligt ist. MOU et al. (2003) konnten zeigen, dass NPR1 uninduziert als Oligomer im Cytosol vorliegt. Nach SA-Induktion werden Cysteinreste des NPR1-Proteins, die in uninduziertem Zustand zur Ausbildung von Disulfidbrücken führen, reduziert und NPR1 kann als Monomer in den Zellkern gelangen und dort die Genexpression aktivieren.

In Hefe dienen homologe Transkriptionsfaktoren von ATF und AP-1 aus Säugetieren als Schlüsselvermittler von verschiedenen Stresssignalen, indem sie an konservierte *cis*-Regionen von stress-induzierbaren Promotoren binden (CHEN et al., 2003; GASCH et al., 2000). Auch in *Arabidopsis* konnten potentielle H₂O₂-responsive *cis*-Elemente in Genen gefunden werden, die auf oxidativen Stress reagieren (DESIKAN et al., 2001). Eines dieser Elemente ist das *as-1*-Promotorelement, das starke Homologie zu dem Redox-sensitiven AP-1 *cis*-Element aus Säugetieren aufweist (KARIN et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, dass beispielsweise Superoxid-Radikale das *as-1*-Element aktivieren können. Allerdings führt H₂O₂ nicht zu einer Aktivierung (GARRETÓN et al., 2002). Die Aktivierbarkeit scheint somit spezifisch für bestimmte ROS zu sein. Das *as-1*-Element dient als Bindestelle des Redox-sensitiven Transkriptionsfaktors TGA1 aus *Arabidopsis thaliana*. Die Induktion von TGA1 mit Salizylsäure (SA), einem Signalmolekül der SAR, führt zu einer Reduktion des Faktors (DESPRÉS et al., 2003).

Diese Reduktion des Proteins ermöglicht eine Interaktion mit NPR1, das ebenfalls an der Entwicklung einer SAR beteiligt ist.

2.3 Das an pflanzlicher Stressantwort beteiligte *cis*-Element *as-1*

Das *as-1*-Element („*activating sequence-1*“) wurde bereits 1989 von BENFEY et al. als funktionelles *cis*-Element im *35S*-Promotor des Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) beschrieben. Das CaMV ist ein DNA-Virus mit einem ausgedehnten Wirtsbereich, der verschiedene Arten von Nachtschattengewächsen (*Solanaceae*), Kreuzblütlern (*Brassicaceae*) und Monokotylen umfasst (FROMM et al., 1989). Das 8,2 kb große Genom des Cauliflower Mosaic Virus enthält die beiden Promotoren *19S* und *35S*. ODELL et al. (1985) haben gezeigt, dass eine stabile Integration des *35S*-Promotors in das pflanzliche Genom zu einer hohen Expressionsrate von nachgeschalteten Genen in Pflanzen führt. Der Nachweis gelang auch im transienten Expressionssystem. Die konstitutive Genexpression lässt sich auf eine Promotorsequenz zurückführen, die 351 bp lang ist und den Bereich von -343 bis +8 relativ zum Transkriptionsstartpunkt umfasst (OW et al., 1987). Er kann in die beiden Domänen A (-90 bis +8) und B (-343 bis -90) unterteilt werden. Beide Domänen sind in verschiedene Subdomänen untergliedert, die charakteristische Expressionsspezifitäten aufweisen und miteinander sowohl additiv als auch synergistisch in Wechselwirkung treten (BENFEY et al., 1989; BENFEY und CHUA, 1990). Domäne A ist für die Genexpression in Wurzeln und im Bereich des Apikalmeristems in Sprossen verantwortlich. Domäne B kontrolliert die Genexpression hingegen nur im oberirdischen Bereich der Pflanze, wie den Blättern und dem Gefäßsystem (BENFEY und CHUA, 1990). Werden die Sequenzen stromaufwärts der Position -90 deletiert (CaMV *35S* (-90); entsprechend Domäne A), erfolgt die Expression des Reportergens nur noch in Wurzelspitzen, Kalluszellen, Protoplasten und Auxin- oder SA-induzierten Blättern (BENFEY et al., 1989; FROMM et al., 1989; LIU und LAM, 1994; QIN et al., 1994). Dieses gewebespezifische und induzierbare Expressionsmuster ist auf das 17 bp lange *as-1*-Element zurückzuführen,

welches 34 bp stromaufwärts der TATA-Box des *CaMV* 35S-Promotors lokalisiert ist. Dieses *cis*-Element wird als *activation sequence-1 (as-1)* bezeichnet und weist zwei nicht perfekte Kopien des Palindroms TGACGTCA auf:

5'-TGACGTAAgggaTGACGCA-3'

LAM et al. (1989) konnten zeigen, dass die Anwesenheit beider TGACG-Motive essentiell für die Funktion des *as-1*-Elementes ist.

LEBEL et al. (1998) konnten mittels „linker-scanning“ Mutationen zwei Bereiche des Promotors von *PR1 (pathogenesis-related 1)*, einem an der Pathogenabwehr beteiligten Gens, identifizieren, die die chemische Induktion eines Reportergens durch INA, ein biologisch aktives SA-Analogon, vermitteln. Die eine Mutation umfasst das nicht perfekte 3'-Palindrom des *as-1*-ähnlichen Elements, welches für die Induktion des *PR1*-Promotors sowohl durch INA als auch durch SA essentiell ist. Der zweite identifizierte Bereich hat Ähnlichkeit mit einer Erkennungssequenz für Dof (DNA binding with one finger)-Transkriptionsfaktoren, die u.a. an der pflanzlichen Abwehr beteiligt sind (CHEN et al., 1996; KANG und SINGH, 2000).

Neben dem *CaMV35S*-Promotor enthalten auch die Promotoren des *Figwort Mosaic Virus* (BOUCHEZ et al., 1989; COOKE, 1990) und des *Commelina Mottle Virus* (MEDBERRY et al., 1992) ein *as-1*-ähnliches-Element. *as-1*-ähnliche Elemente werden auch in Promotoren von Bakterien (z.B. *Agrobacterium tumefaciens*) gefunden, die Bakterien-kodierte Gene in der Pflanze exprimieren (BOUCHEZ et al., 1989; FROMM et al., 1989). Beispiele für solche Promotoren sind der Octopin-Synthase- (BOUCHEZ et al., 1989; FROMM et al., 1989), der Nopalin-Synthase- (LAM et al., 1990) und der Mannopin-Synthase-Promotor (FELTKAMP et al., 1994). Untersuchungen haben ergeben, dass *as-1*-ähnliche Elemente in verschiedenen pflanzlichen Promotoren vertreten sind (ELLIS et al., 1993), u.a. auch in Promotoren von Abwehrgenen wie *gnt1* und *gnt35* aus Tabak (VAN DER ZAAL et al., 1991) sowie des *GH2/4*-Gens aus Sojabohne (ELLIS et al., 1993). Die genannten Gene werden sehr schnell nach SA-Stimulus exprimiert, benötigen für die Induktion keine Proteinneusynthese und werden als „frühe“ Gene bezeichnet. „Frühe“ Gene sind neben Salizylsäure (SA) auch durch Auxin induzierbar (QIN et al., 1994; LIU und LAM, 1994; ZHANG et al., 1994;

DROOG *et al.*, 1995; TAKAHASHI *et al.*, 1989; DONG, 1998) und weisen einen konservierten Abstand von 12 bp zwischen den palindromischen Symmetrieachsen des *as-1*-ähnlichen Promotorelements auf. Der konservierte Abstand und das Vorhandensein beider Palindrome sind für die Funktionalität der isolierten *as-1*-ähnlichen Elemente in transienten Expressionsstudien essentiell (BOUCHEZ *et al.*, 1989; SINGH *et al.*, 1989; ELLIS *et al.*, 1993; KRAWCZYK *et al.*, 2002).

„Späte“ Gene, wie *PR1a* aus Tabak, sind nur durch SA und nicht durch Auxin induzierbar (STROMPEN *et al.*, 1998). Ihre Induktion ist abhängig von einer Proteinneusynthese und der Abstand zwischen den palindromischen Symmetrieachsen des *as-1*-ähnlichen Promotorelements ist nicht konserviert.

Anhand von isolierten *as-1*-ähnlichen Elementen in Verbindung mit einem Minimalpromotor konnte die Induktion eines Reportergens sowohl durch SA und Auxin als auch durch Methyljasmonat gezeigt werden (KIM *et al.*, 1994; LIU und LAM, 1994; QIN *et al.*, 1994; ULMASOV *et al.*, 1994; VAN DER ZAAL *et al.*, 1996; XIANG *et al.*, 1996; ZHANG und SINGH, 1994). Auch biologisch inaktive Strukturanaloga von SA und Auxin führen in Suspensionskulturen zu einer Induktion *as-1*-ähnlicher Elemente. Daher wird diskutiert, ob die Wirkung jener Phytohormone auf ihre Phytotoxizität zurückzuführen ist, anstelle einer Funktion als Signalmolekül (ULMASOV *et al.*, 1994; XIANG *et al.*, 1996). Eine effektive Induktion *as-1*-ähnlicher Elemente durch phytotoxische Chemikalien erfordert hohe (eventuell sogar unphysiologisch hohe) Konzentrationen (PASCUZZI *et al.*, 1998). Auch diese Beobachtung spricht für die Phytotoxizität-Hypothese.

NIGGEWEG *et al.* (2000b) konnten hingegen in Tabakblättern zeigen, dass nur aktive Salizylsäure zu einer Induktion sowohl „früher“ als auch „später“ Gene führte. Behandlung mit 3-Hydroxybenzoesäure (HBA), einem inaktiven Strukturanalogon von SA, konnte die Genexpression nicht aktivieren. Sie postulierten daher, dass nur die aktive Form der Salizylsäure eine Genexpression bewirken kann.

Da auch pflanzliche Glutathion-S-Transferasen wie GH2/4, die cytotoxische Produkte detoxifizieren können und das Gewebe vor oxidativen Schäden schützen (DANIEL,

1993; LEVINE et al., 1994), *as-1*-ähnliche Elemente in ihren Promotoren tragen, deutet dies auf einen durch chemischen Stress induzierbaren Signaltransduktionsweg hin. Chemischer Stress entsteht u.a. beim oxidativen „burst“ während der pflanzlichen Pathogenabwehr (siehe 2.2).

GARRETÓN et al. (2002) haben zu klären versucht, ob der aktivierende Effekt von SA auf *as-1*-ähnliche Elemente durch oxidative Spezies vermittelt werden kann. Sie fanden heraus, dass antioxidative Substanzen wie DMTU und BHA zu einer Inhibierung der SA-induzierten Transkription des *GNT35*-Promotors bzw. des Reportergenkonstrukts (*as-1*)₄/GUS führen. Gleichzeitig konnte *in vitro* in Gelshiftanalysen gezeigt werden, dass die SA-aktivierte DNA-Bindung in Kernextrakten inhibiert ist. Sowohl erhöhte Lichtintensität als auch Paraquat, eine Chemikalie, die oxidativen Stress induziert, führten zu einer Steigerung der SA-induzierten Aktivierung. Weder H₂O₂ noch der Katalase-Inhibitor 3-AT führten zu einer Aktivierung, wobei 3-AT die von SA-vermittelte Aktivierung sogar inhibierte. Aus diesen Ergebnissen schlossen GARRETÓN et al., dass oxidative Spezies die SA-induzierte Aktivierung *as-1*-ähnlicher Elemente vermitteln. H₂O₂ ist an dieser Vermittlung jedoch nicht beteiligt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *as-1*-ähnliche Elemente in die koordinierte Induktion pflanzlicher Abwehrgene involviert sind. Eine funktionelle Bedeutung dieser *cis*-Elemente konnte für die Regulation der Expression sowohl der frühen (*immediate-early*) als auch der späten (*late*) SA-induzierbaren Gene belegt werden. Das isolierte *as-1*-Element stellt ein gut handhabbares Modellsystem dar, um Hormon- oder ROS-vermittelte Transkriptionsaktivierung zu untersuchen.

2.4 Die Proteine der TGA-Familie binden an das *as-1* Element

TGA-Faktoren bilden eine eigene Klasse von pflanzlichen bZIP-Transkriptionsfaktoren. Sie binden im allgemeinen als Homo- oder Heterodimere an *cis*-Elemente, die TGACG-Motive aufweisen.

KATAGIRI et al. gelang es 1989, mit Hilfe eines Tabak-cDNA-Bank-Screens unter Verwendung des TGACG-Motivs im *hex1*-Promotorelement, das erste Mitglied der TGA-Familie, TGA1a, zu isolieren. Die Bindespezifität des Proteins war somit namensgebend. Durch *in vitro* Experimente mit Deletionsderivaten konnte die Domänenstruktur von TGA1a identifiziert und charakterisiert werden (KATAGIRI et al., 1992). Das Protein besitzt eine basische Domäne, die innerhalb der TGA-Familie hochgradig konserviert und für die Bindung des Proteins an die DNA verantwortlich ist. Direkt anschließend befindet sich eine Leucin-Zipper-Region, die durch die spezifische Anordnung von Leucin-Resten in einer amphipatischen α -Helix die Dimerisierung zweier Faktoren ermöglicht. Die Ausbildung eines Dimers wird durch eine carboxyterminale Domäne stabilisiert.

Eine Glutamin-reiche Region im C-terminalen sowie eine saure Domäne im aminoterminalen Bereich verfügen über Aktivierungspotential (NEUHAUS et al., 1994; PASCUZZI et al., 1998).

Anhand von Sequenzhomologien konnte in *Arabidopsis thaliana* bislang die größte Anzahl an TGA-Transkriptionsfaktoren identifiziert werden. Ihre Einteilung in Klassen erfolgte aufgrund von Aminosäuresequenz-Homologien (MIAO et al., 1994; XIANG et al., 1997; SCHIERMEYER et al., 2003; Tabelle 2.1).

TGA-Faktoren, die an *as-1*-ähnliche Elemente binden, konnten bisher u.a. auch aus Mais (SINGH et al., 1990; FOLEY et al., 1993; WALSH et al., 1997), Weizen (TABATA et al., 1991), Kartoffel (FELTKAMP et al., 1994), Tomate (ZHANG et al., 1999) und Reis (FITZGERALD et al., 2005; CHERN et al., 2001) isoliert werden.

Tabelle 2.1: Schematische Einteilung der bekannten TGA-Faktoren.

	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
Subklasse I	TGA1	TGA1a
	[SCHINDLER et al., 1992]	[KATAGIRI et al., 1989]
	TGA4 (OBF4)	PG13
	[ZHANG et al., 1993]	[FROMM et al., 1991]
Subklasse II	TGA2 (AHBP1b)	TGA2.1
	[KAWATA et al., 1992]	[NIGGEWEG et al., 1997]
	TGA5 (OBF5)	TGA2.2
	[ZHANG et al., 1993]	[NIGGEWEG et al., 2000a]
	TGA6	
	[XIANG et al., 1995]	
Subklasse III	TGA3	
	[MIAO et al., 1994]	
	AtbZIP50	
	[JAKOBY et al., 2002]	
Subklasse IV	PERIANTHIA	
	[CHUANG et al., 1999]	
Subklasse V	AtbZIP21	
	[JAKOBY et al., 2002]	
Subklasse VI	AtbZIP65	TGA10
	[JAKOBY et al., 2002]	[SCHIERMEYER et al., 2003]

In Bindestudien, die *in vitro* mit Kernextrakten aus Tabakblättern unter Verwendung des *as-1*-Elements durchgeführt wurden, konnte ein Proteinkomplex identifiziert werden, der als ASF-1 (= *activation sequence factor-1*) bezeichnet wurde (LAM et al., 1989; PRAT et al., 1989). Ein entsprechender Proteinkomplex konnte auch in Gesamtzellextrakten nachgewiesen werden und wird dort mit SARP (*salicylic acid response protein*) bezeichnet (JUPIN und CHUA, 1996). Da alle Mitglieder der TGA-Familie an das *as-1*-Element binden, könnten alle Faktoren potentielle Komponenten von ASF-1 darstellen. In *Arabidopsis thaliana* konnte TGA2 als Bestandteil von ASF-1 identifiziert werden (LAM und LAM, 1995). Die zur Identifizierung verwendeten Kernextrakte stammten aus Wurzel- und Blattgewebe. Es konnte gezeigt werden, dass nur maximal 33 % der ASF-1-Aktivität in Kernextrakten aus Wurzel sowie maximal 50 % der ASF-1-Aktivität in Blatt-Kernextrakten auf TGA2 zurückzuführen sind. TGA2 kann daher nicht alleiniger Bestandteil von ASF-1 sein. TGA1 konnte jedoch nicht als Bestandteil von ASF-1 identifiziert werden (LAM und LAM, 1995). Dabei ist jedoch noch unklar, ob der Faktor nicht vorhanden ist, oder ob er *in vitro* nicht an das *as-1*-Element binden kann. JOHNSON et al. (2003) konnten inzwischen in Chromatin-Immunpräzipitations-Experimenten zeigen, dass TGA2 und TGA3 an den *PRI*-Promotor binden können, wenn SA und NPR1 vorhanden sind.

Bisher konnten fünf TGA-Faktoren aus *Nicotiana tabacum* isoliert werden. TGA1a und PG13 wurden der Subklasse I zugeordnet, die der Klasse I aus *Arabidopsis* homolog ist. TGA2.1 und TGA2.2 konnten isoliert werden und wurden aufgrund eines hohen Homologiegrades zu TGA2 aus *Arabidopsis thaliana* der Subklasse II zugeordnet. Der fünfte bisher beschriebene TGA-Faktor aus Tabak ist TGA10, der aufgrund seiner Sequenzhomologie zu AtbZIP65 in die Subklasse VI eingeteilt wurde (SCHIERMEYER et al., 2003). NIGGEWEG et al. (1999) gelang es mittels Supershiftanalysen die Faktoren TGA2.1 und TGA2.2 im ASF-1- und SARP-Komplex aus Tabakblättern nachzuweisen; TGA1a war hingegen nicht nachweisbar.

Mutationen im *as-1*-Element, welche die Aktivität des CaMV 35S-Promotors verringern, resultieren in einer verminderten DNA-Bindung von ASF-1 (LAM et al., 1989). QIN et al. (1994) konnten wiederum zeigen, dass eine erhöhte Bindeaktivität von ASF-1 an ein *as-1*-Element mit zwei perfekten palindromischen Sequenzmotiven mit der verstärkten SA-Induzierbarkeit dieses Elements korreliert. Eine Funktion von ASF-1

könnte daher die Aktivierung der Transkription durch das SA-induzierbare *as-1*-Element sein. Dafür spricht, dass transgene Tabakpflanzen, die dominant negative TGA-Mutanten mit einer veränderten oder deletierten DNA-Bindedomäne exprimieren, sowohl eine verringerte *as-1*-Aktivität *in vivo* als auch eine reduzierte Menge an ASF-1 *in vitro* zeigen (RIEPING *et al.*, 1994; MIAO und LAM, 1995; NIGGEWEG *et al.*, 2000b; KEGLER, 2001; PONTIER *et al.*, 2001). Möglicherweise ist dies auf die Bildung bindeinaktiver Heterodimere zwischen den ASF-1-Komponenten und der TGA-Mutante zurückzuführen.

Die Expression einer transdominant negativen TGA2-Mutante bewirkt eine verstärkte Aktivität des Tabak *PR1a*-Promotors *in vivo* (PONTIER *et al.*, 2001). PONTIER *et al.* (2001) postulierten, dass TGA-Faktoren die durch das *as-1*-Element vermittelte Transkription sowohl aktivieren als auch reprimieren können.

In Tabak konnte hingegen gezeigt werden, dass eine transdominante TGA2.2-Mutante nach Behandlung mit 2,4-D (2,4-Dichlorphenoxyessigsäure) eine deutlich verringerte Expression der Gene *Nt103*, *IEGT* und *parA* aufweist (NIGGEWEG *et al.*, 2000b). Neueste Untersuchungen ergaben, dass Tabakpflanzen mit reduziertem TGA2.1- und TGA2.2-Gehalt eine reduzierte SA-Induktion der Gene *GST* und *PR1a* zeigen (THUROW *et al.*, 2005). Die Autoren postulieren, dass der *PR1a*-Promotor sowohl von positiven als auch von negativen Aktivitäten reguliert wird. TGA2.2 führt gemeinsam mit NPR1 in Anwesenheit von SA zu einer Unterdrückung der negativen Aktivität, sodass es zu einer Induktion der *PR1a*-Expression kommt. Ein reduzierter TGA2.1- und TGA2.2-Gehalt führt zu einer reduzierten Unterdrückung der negativen Aktivität und die Genexpression wird induziert.

Die Auxin-induzierte Transkriptionsaktivierung eines *as-1*-abhängigen Promotors ist sowohl unabhängig von einem erhöhten ASF-1-Spiegel als auch von einer *de novo* Proteinsynthese (LIU und LAM, 1994). In BY-2 (Bright Yellow-2)-Tabaksuspensionskulturen führt xenobiotischer Stress aufgrund hoher Konzentrationen des synthetischen Auxins 2,4-D zu einer verstärkten Bindung von TGA1a an bestimmte *as-1*-ähnliche Element. Die entsprechenden Zielgene zeigen zur gleichen Zeit eine erhöhte Transkriptionsaktivierung (PASCUZZI *et al.*, 1998; KLINEDINST *et al.*, 2000; JOHNSON *et al.*, 2001a+b). Ein 120 kDa-Korepressor verhindert die Bindung von

TGA1a an das *as-1*-Element und somit die Aktivierung, indem er an die C-terminale Domäne des Transkriptionsfaktors bindet. In Anwesenheit von Auxin löst sich der Korepressor ab und TGA1a kann an das *as-1*-Element in den Promotoren der Gene *Nt103-1* und *Nt103-35* binden und deren Expression induzieren.

Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass die frühe Geninduktion in Tabakblättern durch Salizylsäure möglicherweise ebenfalls über einen Inhibitor der DNA-Bindung reguliert wird. Einerseits konnte gezeigt werden, dass die *in vitro* Bindeaktivität von ASF-1 in SA-induzierten Blättern höher ist als in nicht-induzierten, und dass die SA-induzierte Bindung unabhängig von der Proteinneusynthese ist (JUPIN und CHUA, 1996; STANGE et al., 1997). Die Zugabe von Detergenzien führte zu einer verstärkten Bindung von ASF-1 in nicht-induzierten Blättern. JUPIN und CHUA (1996) schlossen daraus, dass die beteiligten TGA-Faktoren bereits in einer inaktiven Form in der Zelle vorliegen und durch Ablösung eines inhibitorischen Proteins SAI (SA-inhibitor) aktiviert werden. Des weiteren konnte eine Beteiligung von Phosphorylierungsreaktionen an der Regulation der Bindeaktivität ASF-1 gezeigt werden (JUPIN und CHUA, 1996; STANGE et al., 1997). Neuere Chromatin-Immunopräzipitations-Untersuchungen in Tabak haben gezeigt, dass die Subklasse II der TGA-Faktoren konstitutiv an ein isoliertes *as-1*-Element sowie an ein *as-1*-ähnliches Element im Promotor des „frühen“ Gens *parA* bindet (BUTTERBRODT et al., 2005). Für den *PR1a*-Promotor war hingegen nach SA-Behandlung eine deutliche Induzierbarkeit der Bindung zu erkennen. BUTTERBRODT et al. (2005) postulierten daher, dass die Bindung von TGA2.2 an *as-1*-ähnliche Elemente „früher“ Gene nicht reguliert ist.

Eine Triplemutante der TGA-Faktoren 2,5 und 6 aus *Arabidopsis thaliana*, *tga6-1 tga2-1 tga5-1*, zeigte nach SA-Behandlung keine *PR*-Genexpression und war in der SAR blockiert (ZHANG et al., 2003). In uninduziertem Zustand wiesen die Pflanzen eine reduzierte Toleranz für hohe SA-Level auf und akkumulierten höhere Basallevel von PR1. ZHANG et al. (2003) postulierten daher, dass TGA2, 5 und 6 essentielle positive Regulatoren der SAR darstellen. Zusätzlich sind sie wichtig für die Ausbildung der SA-Toleranz und die negative Regulation der basalen Expression von *PR1*.

2.5 Protein-Protein-Interaktionspartner der TGA-Familie

In *Arabidopsis* konnte NPR1 (nonexpresser of *PR* genes 1) als ein Interaktionspartner der TGA-Faktoren identifiziert werden (ZHANG et al., 1999; DESPRÉS et al., 2000; ZHOU et al., 2000; CHERN et al., 2001). NPR1 ist ein Schlüsselregulator bei der Signaltransduktion, die zur Entwicklung der systemischen Resistenz (SAR) in der Pflanze führt. Das 65 kDA-Protein enthält vier Ankyrinmotive und eine BTB/POZ (broad-complex, tramtrack, bric-à-brac/poxvirus, zinc finger)-Domäne, die für Protein-Protein-Interaktionen wichtig ist (CAO et al., 1997; RYALS et al., 1997). MOU et al. (2003) konnten zeigen, dass NPR1 als GFP-Fusionsprotein in der Zelle oligomerisiert und während der SAR in reduzierter Form als Monomer im Zellkern akkumuliert (KINKEMA et al., 2000). Diese Akkumulation ist SA-abhängig und korreliert mit der Expression der *PR*-Gene. Eine Interaktion von NPR1 mit TGA-Faktoren konnte bereits mehrfach nachgewiesen werden und wird über den C-Terminus der TGA-Faktoren vermittelt (ZHANG et al., 1999; DESPRÉS et al., 2000; ZHOU et al., 2000; CHERN et al., 2001; FAN und DONG, 2002; DESPRÉS et al., 2003; UQUILLAS et al., 2004). ZHOU et al. (2000) haben eine unterschiedliche Affinität bezüglich der Interaktion zwischen NPR1 und den *Arabidopsis* TGA-Faktoren beschrieben. Dabei konnte folgende Reihenfolge aufgestellt werden: TGA3 > TGA2 > TGA5 > TGA6 > TGA1. Eine Interaktion von NPR1 mit TGA4 konnte zunächst nicht nachgewiesen werden.

In neueren Untersuchungen von DESPRÉS et al. (2003) konnte die Affinität von TGA1 und TGA4 gegenüber NPR1 durch Veränderung des Redox-Zustands deutlich erhöht werden. In oxidiertem Form verhindern intramolekulare Disulfidbrücken zwischen TGA1-Molekülen eine Interaktion mit NPR1. Durch SA-Induktion werden Cysteinreste von TGA1 reduziert, es kommt zur Auflösung der Disulfidbrücken, sodass eine Interaktion stattfinden kann. NPR1 stimuliert dabei als Redox-sensitiver Co-Faktor die DNA-Bindeaktivität von TGA1 (FOBERT und DESPRÉS, 2005).

Die Interaktion von TGA2 mit NPR1 kann ebenfalls durch SA-Behandlung induziert werden und erfolgt hauptsächlich im Zellkern (SUBRAMANIAM et al., 2001). DESPRÉS et al. (2000) konnten zeigen, dass die *in vitro* Bindung von TGA2 an das

as-1-Element durch die Interaktion mit NPR1 verstärkt wird. Die Anwesenheit von NPR1 ist für die DNA-Bindeaktivität von TGA2 erforderlich (FAN und DONG, 2002).

Mutanten von NPR1 zeigen eine stark verringerte Expression der *PR*-Gene nach SA-Behandlung und können keine SAR ausbilden. Sobald ein zweites Gen, *SNI1* (suppressor of *npr1-1*, inducible), in diesen Pflanzen mutiert wird, verhalten sie sich wie der Wildtyp (LI et al., 1999). SNI1 könnte also einen Repressor der *PR*-Gene darstellen und somit als negativer Regulator der SAR fungieren. LI et al. (1999) postulieren, dass das durch SA aktivierte NPR1 die Wirkung des putativen Repressors SNI1 aufhebt. In *sn1npr1*-Doppelmutanten kann keine starke konstitutive *PR*-Genexpression nachgewiesen werden. Diese erfolgt nur nach Induktion wie im Wildtyp. Es muss daher ein zweiter, von NPR1 unabhängiger Aktivierungsschritt postuliert werden. Denkbar wäre, dass ein Transkriptionsfaktor als positiver Regulator durch die Wirkung von SA aktiviert wird.

Die Bindung von TGA2 an den *PR1*-Promotor wird durch SA induziert und über NPR1 vermittelt (JOHNSON et al., 2003). Möglicherweise hat die Interaktion von NPR1 und TGA2 eine Rekrutierung des TGA-Faktors in den Promotorkontext der *PR*-Gene zur Folge, ein weiterer positiver Regulator ist aber auch hier nötig, um den Effekt des putativen Repressors überwinden zu können.

Ein weiterer beschriebener Interaktionspartner von TGA2 ist das Protein SCL14, das in dieser Arbeit genauer untersucht wird (PYSH et al., 1999; SIEMSEN, 2002). SCL14 ist ein Mitglied der *GRAS*-Genfamilie.

2.6 Die *GRAS*-Genfamilie

Die *GRAS*-Genfamilie umfasst eine Reihe putativer Transkriptionsfaktoren und wurde nach den ersten funktionell charakterisierten Mitgliedern, *GAI* (*Gibberellinsäure* insensitiv), *RGA* (Repressor der Mutante *gal-3*) und *SCR* (Scarecrow), benannt (PYSH et al., 1999). Eine Vielzahl von Genen dieser Familie wurden bisher in mehreren

Pflanzenspezies, u.a. in *Arabidopsis*, Reis, Erbse und Moosen, identifiziert (PYSH et al., 1999; BOLLE, 2004; TIAN et al., 2004; SASSA et al., 2001; NISHIYAMA et al., 2003). Eine Beteiligung an vielen verschiedenen Prozessen des Wachstums und der Entwicklung einer Pflanze u.a. durch Gibberellin-Signaltransduktion (PENG et al., 1997 & 1999; SILVERSTONE et al., 1998; IKEDA et al., 2001), Axillarmeristem-Initiation (SCHUMACHER et al., 1999; GREB et al., 2003; LI et al., 2003), Sproßmeristem-Entwicklung (STUURMAN et al., 2002), radiale Organisation der Wurzeln (DI LAURENZIO et al., 1996; HELARIUTTA et al., 2000), Phytochrom A-Signaltransduktion (Bolle et al., 2000) und männliche Gametogenese (MOROHASHI et al., 2003) konnte einzelnen GRAS-Genen zugeordnet werden. Entsprechend ihrer Einordnung als Transkriptionsregulatoren sind die meisten GRAS-Proteine im Zellkern lokalisiert.

GRAS-Proteine weisen in ihren C-Termini verschiedene konservierte Domänen auf. Dazu zählen u.a. zwei Leucin-Heptad-Wiederholungen (LHRI und LHRII), die für die Homodimerisierung der Proteine notwendig sein könnten und eine VHIID-Domäne einschließen, sowie die distinkten Domänen PFYRE, RVER und SAW. Eine konkrete Funktion konnte jedoch bisher nicht nachgewiesen werden. Die VHIID-Domäne wurde von Pysh et al. (1999) als basische DNA-Bindedomäne diskutiert. Allerdings konnte bisher keine direkte DNA-Bindung für GRAS-Proteine beschrieben werden. ITOH et al. (2002) konnten zeigen, dass der C-Terminus von SLR1 (slender rice 1), der ebenfalls über die Domänen VHIID, PFYRE und SAW verfügt, als Repressor-Domäne fungiert. Zusätzlich enthalten einige GRAS-Proteine in ihrem C-terminalen Teil ein LXXLL-Motiv, das in Säugetieren die Bindung eines Steroidrezeptor-Coaktivator-Komplexes vermittelt (HEERY et al., 1997; ARANDA und PASCUAL, 2001).

Die Amino-termini der GRAS-Proteine sind im Gegensatz zu ihren C-termini sehr variabel, sodass die Spezifität der einzelnen regulatorischen Proteine eher hier begründet zu sein scheint.

Richards et al. (2000) haben Ähnlichkeiten zwischen GRAS-Proteinen und Proteinen der STAT-Familie (Signal Transducers and Activators of Transcription) gefunden, die in verschiedenen tierischen Systemen identifiziert wurden. Es wäre also möglich, dass GRAS-Proteine ebenfalls an der Signaltransduktion beteiligt sind bzw. als Transkriptionsaktivatoren in Pflanzen dienen.

Bereits 1999 untersuchten PYSH et al. verschiedene *Arabidopsis* ESTs (expressed sequence tags), die Homologien zu den bekannten *GRAS*-Genen *SCR*, *RGA* und *GAI* aufwiesen und nannten sie *SCARECROW-LIKE* (*SCL*). Eines dieser Gene ist der putative Transkriptionsfaktor SCL14, der inzwischen als Interaktionspartner von TGA2 bzw. TGA6 in Hefe identifiziert wurde (SIEMSEN, 2002). TGA2 kann in Hefe an das *as-1*-Element binden, benötigt aber den Co-Aktivator SCL14, um die Genexpression eines Reportergens zu aktivieren.

THOMAS MERKLE konnte SCL14 zusätzlich in einem Hefe Zwei-Hybridsystem als Interaktionspartner des Kernexportrezeptors XPO1 isolieren (unveröffentlicht). Da in der Aminosäuresequenz von SCL14 auch ein Kernlokalisierungssignal (NLS) beschrieben wurde, wäre es möglich, dass SCL14 in der Pflanze über XPO1 aus dem Zellkern transportiert wird, um im Cytosol einen Stimulus zu empfangen, der die Bedingungen für die Aktivierung der Genexpression schafft.

Die Expression von *SCL14* erfolgt ubiquitär. LIN und WU (2004) konnten allerdings eine Induktion der *SCL14*-Genexpression durch dunkel-induzierte Seneszenz zeigen. Da auch Gene, die ein *as-1*-Element im Promotorbereich tragen, während Seneszenzprozessen verstärkt exprimiert werden (HANFREY et al., 1996; BUCHANAN-WOLLASTON et al., 2003), könnte hier ein Zusammenhang mit der SCL14-TGA2-Interaktion bestehen.

SCL14 (At1g07530) ist innerhalb der *GRAS*-Genfamilie am nächsten mit SCL26 (At1g07520) und SCL27 (At2g29060), die bisher noch nicht genauer charakterisiert wurden, verwandt (benannt nach GAO et al., 2004). SCL14 wird aufgrund von Sequenzhomologien der SCL9-Gruppe zugeordnet, in die auch SCL11 einsortiert wurde. Die Funktion von SCL9 (At2g37650) ist noch unbekannt.

Ein SCL11-homologes Protein aus Tabak, NtAI7 (*Nicotiana tabacum* Antimycin induced 7), wurde als durch Antimycin A, einen Inhibitor des mitochondrialen Elektronentransports, H₂O₂ und SA induzierbar beschrieben (MAXWELL et al., 2002). Dies legt die Vermutung nahe, dass auch andere Mitglieder der *GRAS*-Familie durch oxidativen Stress induzierbar sein könnten.

2.7 Zielsetzung und methodischer Ansatz

Um tiefere Einblicke in die *as-1*-abhängige Promotoraktivität und die Regulation am *as-1*-Element zu bekommen, ist es erforderlich, die an der Aktivierung beteiligten Komponenten genau zu charakterisieren.

TGA2 aus *Arabidopsis thaliana* ist als Bestandteil des ASF-1-Komplexes beschrieben worden (LAM und LAM, 1995), hat jedoch in Hefe kein eigenes Genaktivierungspotential und benötigt daher einen Co-Aktivator zur Genaktivierung. Als solcher Co-Aktivator konnte SCL14 identifiziert werden (SIEMSEN, 2002).

In dieser Arbeit soll zunächst geklärt werden, ob die Interaktion zwischen TGA2 und SCL14 spezifisch ist oder ob verwandte Proteine der *GRAS*-Familie ebenfalls mit TGA2 interagieren können. Des Weiteren soll die Funktion von SCL14 genauer charakterisiert werden. Dazu soll der Einfluss von SCL14 auf ein *as-1::GUS*-Konstrukt (REDMAN et al., 2002) in Überexprimierer- und knock out-Pflanzen nach verschiedenen Stimuli untersucht werden. Die Herstellung bzw. Charakterisierung der dafür benötigten Pflanzenlinien, u.a. mit Hilfe eines im Rahmen dieser Arbeit hergestellten antiSCL14-Antiserums, werden beschrieben.

An der Regulation der *as-1::GUS*-Aktivität könnte ein „Shuttling“ von SCL14 beteiligt sein. Es soll daher neben der Lokalisierung von SCL14 überprüft werden, ob eine Inhibierung des Kernexports oder eine Induktion des Kernimports die *as-1::GUS*-Aktivität beeinflussen.

Zusätzlich wird das Expressionsmuster von SCL14 nach Seneszenz- und Ozon-Induktion, sowie das Keimungsverhalten der Überexpressions- und der knock-out-Linie unter oxidativen Stressbedingungen untersucht.

Für das Verständnis der Funktion ist es sehr wichtig, die Zielgene von SCL14 zu identifizieren. Dies wird im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe von Mikroarray Analysen der Überexpressions- und knock out-Pflanzen durchgeführt werden.

3 Material

3.1 Geräte

Geräte	Modell	Hersteller/Bezugsquelle
Autoklav	3870 ELV	Tuttnauer
Automatische Pipetten		Gilson
Bioimager /Phosphoimager	BAS-1000	Fuji
Elektroelutionsapparatur		Werkstatt der Universität
Elektroporationsapparatur	Gene Pulser [®] II	BioRad
Fluorometer	CytoFluorII Plate Reader	PerSeptive
Geldokumentationsstation		MWG Biotech
Gelelektrophoresekammern		Werkstatt der Universität
Handmonitor	Contamat	Eberline
Heizblock		Boekel Scientific
Heizrührer	RCT basic	IKA Labortechnik
Heizschüttler	Thermomixer 5436	Eppendorf
Hybridisierungssofen		Bachhofer
Hybridisierungswasserbad	Belly Dancer	Stovall
Inkubationsschränke		WTC binder; Memmert
Kühlzentrifuge	Sorvall RC 5B Plus	DuPont
Netzgeräte	E323	Benedikt Heinemann
Netzgeräte	EC 105	EC Apparatus Corporation
PCR-Geräte	MiniCycler [™] PTC-150	MJ Research
Peristaltikpumpe	Cyclo 1	Roth
pH-Meter	HI 9321	Hanna Instruments
Photometer	Unikon 720 LC	Kontron
RNA-/DNA-Calculator	GeneQuant II	Pharmacia

Geräte	Modell	Hersteller/Bezugsquelle
Scanner	ScanJet 4c	Hewlett Packard
Sequenzanalysegerät	ABI PRISM 310	Perkin-Elmer
Spektralphotometer für Mikrotiterplatten	MRX Dynex Plate Reader	Dynex
Standzentrifuge mit Ausschwingrotor	UJ3S	Christ
Sterilbank, horizontales Gebläse	Microflow Laminar	Nunc
Sterilbank, vertikales Gebläse	Microflow Biohazard	Nunc
Szintillationsmeßgerät		Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH
Tischzentrifuge	Biofuge pico	Heraeus Christ
Tischzentrifuge, kühlbar	5403	Eppendorf
Ultraschallgerät	Soniprep 150	MSE
UV-Transilluminator	FLX-20 M	Vilber Lourmat
Vortex	L46	Labinco BV, Niederlande
Wasseraufbereitungsanlage	Option 4, Maxima	ELGA
Zählkammer	Fuchs-Rosenthal	Brand

3.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller / Bezugsquelle
Elektroporationsküvetten	BioRad
Fließpapier 3MM	Whatman
Kunststoff-Einwegmaterial	Biozym; Eppendorf; Greiner; Roth; Sarstedt
Mikrotiterplatten	Roth
Nylon-Membran Hybond N ⁺	Amersham

Produkt	Hersteller / Bezugsquelle
Parafilm M	American National Can™
PVDF-Membran Immobilon™-P	Millipor
Röntgenfilme Cronex 4, Cronex 10T	DuPont

3.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller / Lieferant
30 % (w/v) Acrylamid:N,N'-Methylenbisacrylamid (37,5:1)	Roth
Agarose SeaKem LE	Biozym
Ampicillin	AGS
Antipain	Serva
APS (Ammoniumpersulfat)	Biometra
Bakto Pepton	Difco
Bradford-Reagenz	Roth
Bromphenolblau	Roth
BSA (Rinder-Serum-Albumin)	Serva
Cefotaxim	Duchefa
Coomassie Brilliant Blue G-250	BioRad
[α - ³² P] dATP ; 800 Ci/mmol	Hartmann Analytic
[α - ³³ P]	Hartmann Analytic
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D)	Sigma
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth
N,N-Dimethylformamid (DMF)	J.T. Baker Chemicals B.V.
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
dNTPs	MBI; Roth

Chemikalie	Hersteller / Lieferant
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	AppliChem
Ethidiumbromid	Roth
HEPES	Roth
Heringssperma-DNA (HSP)	Sigma
Hydroxyethyl-Cellulose medium vis. (HEC)	Fluka
Isopropylthiogalactosid (IPTG)	Bio Tech Trade
Kanamycin	Sigma
Leptomycin B	LC Laboratories [®]
Leupeptin	Serva
Magermilchpulver	Glücksklee
β -Mercaptoethanol	Roth
Methylumbelliferon (4-MU)	Sigma
Methylumbelliferyl- β D-Glucoronid (MUG)	Duchefa
2[N-Morpholino]ethansulfonsäure (MES)	Sigma
Murashige und Skoog Medium	Duchefa
Orange G	Sigma
Pefabloc SC	Roche Diagnostics
Phenol	AppliChem
Phenylmethansulfonylchlorid (PMSF)	Fluka
Polydesoxyinosin-desoxycytidylsäure (PolydI/dC)	Sigma
Ponceau S	Sigma
Rifampicin	Duchefa
Röntgen-Entwickler LX24	Kodak
Röntgen-Fixierer AL4	Kodak
Salicylsäure (SA)	Merck
Select Agar	Life Technologies
Select Yeast Extract (Hefeextrakt)	GIBCO BRL

Chemikalie	Hersteller / Lieferant
TEMED	Roth
Trypton	Oxoid
Triton X-100	Roth
Tween20	Roth
X-Gal	Bio Tech Trade
X-Gluc	Roth
Xylencyanol FF	Roth
Yeast Nitrogen Base (ohne Aminosäuren)	Difco

3.4 Kits

Kit	Hersteller / Bezugsquelle
BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin-Elmer Corporation
Enhanced Chemiluminescence Plus™ Kit (ECL+)	Amersham Life Science
ET-Mix	ABI PRISM™
Invisorb® Spin Plant RNA Mini Kit	Invitek
Megaprime™ DNA Labelling Systems	Amersham Life Science
Nucleo Spin® Extrakt II	Macherey-Nagel
Nucleo Spin® Plasmid	Macherey-Nagel
pGEM®-T Vector System	Promega
Qiagen Plasmid Preparation Kits (Midi, Maxi)	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen

3.5 Proteine

3.5.1 Enzyme

Enzym	Hersteller / Bezugsquelle
AmpliTaq [®] DNA Polymerase, FS	ABI PRISM [™]
Cellulase "Onozuka R-10"	Serva
Klenow-DNA-Polymerase exo ⁻	MBI Fermentas
Lyticase	Sigma
Macerozym R-10	Serva
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas
RNase A (DNase-frei)	Qiagen
T4 DNA-Ligase	MBI Fermentas

3.5.2 Proteinstandard

Proteinstandard	Hersteller / Bezugsquelle
Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas

3.5.3 Antikörper

Bezeichnung	Spezifität	Eigenschaften	Referenz
anti-HIS		polyklonal aus Kaninchen (1:5000)	BioScience
anti-HA-tag		polyklonal aus Kaninchen (1:1000)	Santa Cruz Biotechnology

Bezeichnung	Spezifität	Eigenschaften	Referenz
anti rabbit Ig	Kaninchen-Immunglobulin	polyklonal aus Esel, Peroxidase gekoppelt (1:10000)	Amersham
anti-SCL14-Serum	SCL14-Vollänge	polyklonal aus Kaninchen, Rohserum (final bleeding) (1:2000)	diese Arbeit

3.6 Nukleinsäuren

3.6.1 Primer

Die Primer wurden von den Firmen OPERON Biotechnologies, GIBCO BRL sowie MWG synthetisiert.

Die Schmelzpunkte (T_m) errechnen sich nach folgender Formel:

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

Primer	Sequenz 5' → 3'	T_m [°C]
19.11 Sal bck NEU	GAG TCG ACC TAT GAA GAC GAA GGA ACC C	68,0
19.11 Sal fwd	AGG TCG ACT CCA CAT GGG TTC TTA TCC GGA TGG	72,0
CHSABACK	CAC TTA CTT ACA CTT GCC TTG GAG	51,0
CHSAFRONT	CCA ATT AAG ATA AAA CGT TGA ATG	44,0
GUS (#42)	TCG CGA TCC AGA CTG AAT GCC CAC	66,0
GUS antisense (#255)	TGC AAC CAC CTG TTG ATC CG	57,0

Primer	Sequenz 5' → 3'	T _m [°C]
GUS sense (#254)	GAT CAG CGT TGG TGG GAA AG	54,0
ICS1-2 fwd	GCT GTT TCT TCT CTC GTC G	47,2
ICS1 rev	CTG CCC TAG TTA CAA CCC GAA AAG	57,3
LBb1	GCG TGG ACC GCT TGC TGC AAC T	65,1
pBD2	TCA TCG GAA GAG AGT AGT AAC	58,66
pGADL1	CCA CTA CAA TGG ATG ATG TAT A	44,4
pGADL2	GTG CAC GAT GCA CAG TTG AAG T	55,1
p-GR1	GAG CTG TGG TAA TGC TGC AGG AAC	66,28
RD29a bck	CAC TAC CAA AGC CCA TCG	59,9
RD29a fwd	TTA CAC CAA ACC CAC TGA ATC	58,66
sGFP-II	TTC AGG GTC AGC TTG CCG TAG G	53,4
SCL14~300 fwd	CTG ATG ACG CTG ATT TCT CTG	60,61
SCL14~600 fwd	CTT CTA GGT CCA ACA GTG TC	60,4
SCL14~900 fwd	TAG CTA TGC TCC TCC TCC	59,9
SCL14~1200 fwd	CTC TTT TGG TGT TAT GTG C	55,85
SCL14~1500 fwd	AAA CGC CAA CAC GAT CCA C	60,16
SCL14~1600 bck	CCT TTC TTG AAC TGC ATA GCC	60,61

Primer	Sequenz 5' → 3'	T _m [°C]
SCL14~1960 fwd	TCA TTA CTC GGC TGT GTT TG	58,35
SCL14~2000 bck	CCA CTC TCT CTG TTC CTT CAC	62,57
SCL-C Acc/Bsp fwd	GTC TAG GTA CCG CAG TAT GTA CAT GTC AGC GAC ACA ATG TTC	72,52
SCL-C BamHI bck	TAC GGA TCC TGA AGA CGA AGG AAC CCA T	67,54
SCL-C BamHI2 bck	TAC GGA TCC GAT GAA GAC GAA GGA ACC CAT	68,73
SCL14 gate bck	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG TCG ACC TAT GAA GAC GAA GGA ACC C	69,0
SCL14 gate fwd	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT GGT ACC AAC CAT GGG TTC TTA TCC GGA TGG	68,0
SCL14 UTR fwd	TGG GTT TTT GGA GTT GG	54,78
SCL14 UTR2 fwd	TTT GGG TTT TTG GAG TTG G	55,85
SCL14 UTR3 fwd	CCC AAG AAG TTG CCT GAT CG	62,45
WRKY6 bck	GGA TTT TGG TAC GAA ACA G	55,85
WRKY6 fwd	CTC CTT CGT TAA TCT CGT G	58,0

3.6.2 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pAlligator2	Gateway TM Pflanzentransformationsvektor, enthält den CaMV 35S- Promotor, den <i>nos</i> -Terminator, ein 3x HA-tag (N-terminal), sowie einen GFP- Selektionsmarker unter Kontrolle des Samen- spezifischen Promotors At2S3, <i>spn^r</i>	PARCY, F. http://www.isv.cnrs-gif.fr/JG/alligator/intro.html
pAlligator2/SCL14	pAlligator2-Derivat, enthält die Kodierregion der SCL14- cDNA fusioniert an das 3'- Ende des 3x HA-tags unter Kontrolle des CaMV 35S- Promotors, <i>spn^r</i>	diese Arbeit
pDEST17	Gateway TM Expressionsvektor, enthält den T7-Promotor sowie ein His-tag (N-terminal), <i>amp^r</i>	Invitrogen TM
pDEST17/SCL14	pDEST17-Derivat, enthält die Kodierregion der SCL14- cDNA fusioniert an das 3'- Ende des 3x HA-tags unter Kontrolle des T7-Promotors, <i>amp^r</i>	diese Arbeit
pDEST22	Gateway TM Vektor für die Expression von <i>GAL4-AD</i> - Fusionsproteinen unter Kontrolle des <i>ADH</i> -Promotors in Hefe, <i>TRP1</i> , <i>amp^r</i>	Invitrogen TM
pDEST22/SCL14	pDEST22-Derivat, enthält die Kodierregion der SCL14- cDNA fusioniert an das 3'- Ende der <i>GAL4-AD</i> unter Kontrolle des <i>ADH</i> -Promotors, <i>TRP1</i> , <i>amp^r</i>	KUSHNIR, S. (unveröffentlicht)

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pDEST22/SCR1	pDEST22-Derivat, enthält die Kodierregion der At4g08250-cDNA fusioniert an das 3'-Ende der <i>GAL4-AD</i> unter Kontrolle des <i>ADH</i> -Promotors, <i>TRP1</i> , <i>amp^r</i>	KUSHNIR, S. (unveröffentlicht)
pDEST22/SCR2	pDEST22-Derivat, enthält die Kodierregion der PAT1-cDNA fusioniert an das 3'-Ende der <i>GAL4-AD</i> unter Kontrolle des <i>ADH</i> -Promotors, <i>TRP1</i> , <i>amp^r</i>	KUSHNIR, S. (unveröffentlicht)
pDEST22/SCR3	pDEST22-Derivat, enthält die Kodierregion der SCL13-cDNA fusioniert an das 3'-Ende der <i>GAL4-AD</i> unter Kontrolle des <i>ADH</i> -Promotors, <i>TRP1</i> , <i>amp^r</i>	KUSHNIR, S. (unveröffentlicht)
pDEST22/SCR4	pDEST22-Derivat, enthält die Kodierregion der At1g55580-cDNA fusioniert an das 3'-Ende der <i>GAL4-AD</i> unter Kontrolle des <i>ADH</i> -Promotors, <i>TRP1</i> , <i>amp^r</i>	KUSHNIR, S. (unveröffentlicht)
pDEST22/SCR5	pDEST22-Derivat, enthält die Kodierregion der SCL21-cDNA fusioniert an das 3'-Ende der <i>GAL4-AD</i> unter Kontrolle des <i>ADH</i> -Promotors, <i>TRP1</i> , <i>amp^r</i>	KUSHNIR, S. (unveröffentlicht)
pDEST22/SCR6	pDEST22-Derivat, enthält die Kodierregion der At3g49950-cDNA fusioniert an das 3'-Ende der <i>GAL4-AD</i> unter Kontrolle des <i>ADH</i> -Promotors, <i>TRP1</i> , <i>amp^r</i>	KUSHNIR, S. (unveröffentlicht)

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pDEST22/SCR7	pDEST22-Derivat, enthält die Kodierregion der SCL6-cDNA fusioniert an das 3'-Ende der <i>GAL4-AD</i> unter Kontrolle des <i>ADH</i> -Promotors, <i>TRP1</i> , <i>amp^r</i>	KUSHNIR, S. (unveröffentlicht)
pDEST22/SCR8	pDEST22-Derivat, enthält die Kodierregion der SCL11-cDNA fusioniert an das 3'-Ende der <i>GAL4-AD</i> unter Kontrolle des <i>ADH</i> -Promotors, <i>TRP1</i> , <i>amp^r</i>	KUSHNIR, S. (unveröffentlicht)
pDEST22/SCR10	pDEST22-Derivat, enthält die Kodierregion der At4g23440-cDNA fusioniert an das 3'-Ende der <i>GAL4-AD</i> unter Kontrolle des <i>ADH</i> -Promotors, <i>TRP1</i> , <i>amp^r</i>	KUSHNIR, S. (unveröffentlicht)
pDEST22/SCR13	pDEST22-Derivat, enthält die Kodierregion der At3g03450-cDNA fusioniert an das 3'-Ende der <i>GAL4-AD</i> unter Kontrolle des <i>ADH</i> -Promotors, <i>TRP1</i> , <i>amp^r</i>	KUSHNIR, S. (unveröffentlicht)
pDEST22/SCR14	pDEST22-Derivat, enthält die Kodierregion der At1g66350-cDNA fusioniert an das 3'-Ende der <i>GAL4-AD</i> unter Kontrolle des <i>ADH</i> -Promotors, <i>TRP1</i> , <i>amp^r</i>	KUSHNIR, S. (unveröffentlicht)
pDEST22/SCR15	pDEST22-Derivat, enthält die Kodierregion der SCL9-cDNA fusioniert an das 3'-Ende der <i>GAL4-AD</i> unter Kontrolle des <i>ADH</i> -Promotors, <i>TRP1</i> , <i>amp^r</i>	KUSHNIR, S. (unveröffentlicht)

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pDEST22/SCR18	pDEST22-Derivat, enthält die Kodierregion der SCL7-cDNA fusioniert an das 3'-Ende der <i>GAL4-AD</i> unter Kontrolle des <i>ADH</i> -Promotors, <i>TRP1</i> , <i>amp^r</i>	KUSHNIR, S. (unveröffentlicht)
pDEST22/SCR20	pDEST22-Derivat, enthält die Kodierregion der SCL1-cDNA fusioniert an das 3'-Ende der <i>GAL4-AD</i> unter Kontrolle des <i>ADH</i> -Promotors, <i>TRP1</i> , <i>amp^r</i>	KUSHNIR, S. (unveröffentlicht)
pDEST22/SCR22	pDEST22-Derivat, enthält die Kodierregion der At2g45160-cDNA fusioniert an das 3'-Ende der <i>GAL4-AD</i> unter Kontrolle des <i>ADH</i> -Promotors, <i>TRP1</i> , <i>amp^r</i>	KUSHNIR, S. (unveröffentlicht)
pDEST22/SCR23	pDEST22-Derivat, enthält die Kodierregion der SCL27-cDNA fusioniert an das 3'-Ende der <i>GAL4-AD</i> unter Kontrolle des <i>ADH</i> -Promotors, <i>TRP1</i> , <i>amp^r</i>	KUSHNIR, S. (unveröffentlicht)
pDEST22/SCR32	pDEST22-Derivat, enthält die Kodierregion der At5g66770-cDNA fusioniert an das 3'-Ende der <i>GAL4-AD</i> unter Kontrolle des <i>ADH</i> -Promotors, <i>TRP1</i> , <i>amp^r</i>	KUSHNIR, S. (unveröffentlicht)
pDEST22/SCR33	pDEST22-Derivat, enthält die Kodierregion der At5g17490-cDNA fusioniert an das 3'-Ende der <i>GAL4-AD</i> unter Kontrolle des <i>ADH</i> -Promotors, <i>TRP1</i> , <i>amp^r</i>	KUSHNIR, S. (unveröffentlicht)

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pDEST22/SCR34	pDEST22-Derivat, enthält die Kodierregion der At5g41920-cDNA fusioniert an das 3'-Ende der <i>GAL4-AD</i> unter Kontrolle des <i>ADH</i> -Promotors, <i>TRP1</i> , <i>amp^r</i>	KUSHNIR, S. (unveröffentlicht)
pDEST22/SCR35	pDEST22-Derivat, enthält die Kodierregion der At3g13840-cDNA fusioniert an das 3'-Ende der <i>GAL4-AD</i> unter Kontrolle des <i>ADH</i> -Promotors, <i>TRP1</i> , <i>amp^r</i>	KUSHNIR, S. (unveröffentlicht)
pDEST32	Gateway [™] Vektor für die Expression von <i>GAL4-BD</i> -Fusionsproteinen unter Kontrolle des <i>ADH</i> -Promotors in Hefe, <i>LEU2</i> , <i>gm^r</i>	Invitrogen [™]
pDEST32/TGA2	pDEST32-Derivat, enthält die Kodierregion der TGA2-cDNA fusioniert an das 3'-Ende der <i>GAL4-BD</i> unter Kontrolle des <i>ADH</i> -Promotors, <i>LEU2</i> , <i>gm^r</i>	WEIGEL, unveröffentlicht
pDEST32/TGA5	pDEST32-Derivat, enthält die Kodierregion der TGA5-cDNA fusioniert an das 3'-Ende der <i>GAL4-BD</i> unter Kontrolle des <i>ADH</i> -Promotors, <i>LEU2</i> , <i>gm^r</i>	WEIGEL, unveröffentlicht
pDEST32/TGA6	pDEST32-Derivat, enthält die Kodierregion der TGA6-cDNA fusioniert an das 3'-Ende der <i>GAL4-BD</i> unter Kontrolle des <i>ADH</i> -Promotors, <i>LEU2</i> , <i>gm^r</i>	WEIGEL, unveröffentlicht
pDONR207	Gateway [™] Entry Vektor, <i>gm^r</i>	Invitrogen [™]

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pENTR207/SCL14	pDONR207-Derivat, enthält den Kodierbereich der SCL14-cDNA, <i>gm^r</i>	diese Arbeit
pFGCA7	Pflanzentransformationsvektor, enthält den CaMV 35S-Promotor sowie den <i>ocs</i> -Terminator, <i>BAR</i> , <i>km^r</i>	THUROW, C. (unveröffentlicht)
pFGCA7/SCL14-GR	pFGCA7-Derivat, enthält die Kodierregion der SCL14-cDNA fusioniert an das 5'-Ende des TAP-tags unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors, <i>BAR</i> , <i>km^r</i>	diese Arbeit
pGAD424	Vektor für die Expression von GAD-Fusionsproteinen unter Kontrolle des <i>ADHI</i> -Promotors in Hefe, <i>GAL4</i> ₍₇₆₈₋₈₈₁₎ -Aktivierungsdomäne, <i>LEU2</i> , <i>amp^r</i>	Clontech
pGAD424/NPR1	pGAD424-Derivat, enthält die Kodierregion der <i>NPR1</i> -cDNA fusioniert an das 3'-Ende der <i>GAL4-AD</i> , <i>LEU2</i> , <i>amp^r</i>	THUROW, 2001
pGAD424/SCL14	pGAD424-Derivat, enthält die Kodierregion der <i>SCL14</i> -cDNA fusioniert an das 3'-Ende der <i>GAL4-AD</i> , <i>LEU2</i> , <i>amp^r</i>	diese Arbeit
pGBT9	Vektor für die Expression von GBD-Fusionsproteinen unter Kontrolle des <i>ADHI</i> -Promotors in Hefe, <i>GAL4</i> ₍₁₋₁₄₇₎ -DNA-Bindedomäne, <i>TRP1</i> , <i>amp^r</i>	Clontech

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pGBT9/TGA2	pGBT9-Derivat, enthält die Kodierregion der TGA2-cDNA fusioniert an das 5'-Ende der GAL4-DNA-BD unter Kontrolle des <i>ADHI</i> -Promotors, <i>TRP1</i> , <i>amp^r</i>	WEIGEL et al., 2001
pGBT9/TGA5	pGBT9-Derivat, enthält die Kodierregion der TGA5-cDNA fusioniert an das 5'-Ende der GAL4-DNA-BD unter Kontrolle des <i>ADHI</i> -Promotors, <i>TRP1</i> , <i>amp^r</i>	WEIGEL, unveröffentlicht
pGBT9/TGA6	pGBT9-Derivat, enthält die Kodierregion der TGA6-cDNA fusioniert an das 5'-Ende der GAL4-DNA-BD unter Kontrolle des <i>ADHI</i> -Promotors, <i>TRP1</i> , <i>amp^r</i>	WEIGEL, unveröffentlicht
pHBT	Vektor für die transiente Expression in Pflanzen, pHBTL-sGFP-Derivat, Entfernung des sGFP-Gens durch <i>NcoI</i> / <i>NotI</i> -Verdau, Klenow fill in und Religation, <i>amp^r</i>	HEINEKAMP (2002)
pHBTL-sGFP	pHBT-sGFP-Derivat (SHEEN, 1993), enthält das sGFP-S65T-Gen zwischen dem <i>HBT</i> -Promotor und dem <i>nos</i> -Terminator, zusätzlich <i>KpnI</i> und <i>EcoRI</i> Schnittstellen vor der <i>BamHI</i> Schnittstelle, <i>amp^r</i>	NICKOLOV, 2003
pHBTL/SCL14 GFP	ohne pHBTL-Derivat, enthält die Kodierregion der SCL14-cDNA unter Kontrolle des <i>HBT</i> -Promotors, <i>amp^r</i>	diese Arbeit

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pHBTL/SCL14-sGFP	pHBTL-Derivat, enthält die Kodierregion der SCL14-cDNA fusioniert an das 5'-Ende von sGFP unter Kontrolle des <i>HBT</i> -Promotors, <i>amp^r</i>	diese Arbeit
pHBT1a-GFP	pHBTL-Derivat, enthält die Kodierregion der TGA1a-cDNA fusioniert an das 5'-Ende von sGFP unter Kontrolle des <i>HBT</i> -Promotors, <i>amp^r</i>	THUROW, C. (2001)
pHBT-2.2sGFP	pHBTL-Derivat, enthält die Kodierregion der TGA2.2-cDNA fusioniert an das 5'-Ende von sGFP unter Kontrolle des <i>HBT</i> -Promotors, <i>amp^r</i>	THUROW, C. (2001)
pLEU/TGA2	pGAD424-Derivat, die GAL4-AD wurde entfernt, enthält die Kodierregion der TGA2-cDNA unter Kontrolle des <i>ADH1</i> -Promotors, <i>LEU2</i> , <i>amp^r</i>	WEIGEL (unveröffentlicht)
pLEU/TGA6	pGAD424-Derivat, die GAL4-AD wurde entfernt, enthält die Kodierregion der TGA6-cDNA unter Kontrolle des <i>ADH1</i> -Promotors, <i>LEU2</i> , <i>amp^r</i>	WEIGEL (unveröffentlicht)
pRS020	pBluescript KS(-)-Derivat, enthält die Kodierregion der GR-Domäne, <i>amp^r</i>	SABLOWSKI, unveröffentlicht
pRS020/SCL14-GR	pRS020-Derivat, enthält die Kodierregion der SCL14-cDNA fusioniert an die GR-Domäne, <i>amp^r</i>	diese Arbeit
pSK-T	Klonier- und Sequenziervektor, <i>lacZα</i> , <i>amp^r</i>	KRIETE, unveröffentlicht

3.6.3 Hybridisierungssonden

Sonde	Eigenschaften	Referenz
SCL14	2303 bp Vollängenfragment mit 19.11 Sal fwd / 19.11 Sal bck NEU amplifiziert	diese Arbeit
GST6	600 bp Fragment aus dem Plasmid pSK-AtGST6	PAWLOWSKI, unveröffentlicht
GUS	1874 bp NcoI/PstI-Fragment aus dem Plasmid HBT-Gus-Nco	SCHOLZ, unveröffentlicht
ICS1	1578 bp Fragment mit den Primern ICS1-2 fwd / ICS1 rev aus dem Plasmid pSK-ICS1 amplifiziert	WEIGEL, unveröffentlicht
PR-1	500 bp <i>EcoRI</i> -Fragment aus pSK-AtPR1	BRENNER, 2002

3.6.4 DNA-Fragmentlängenstandard

Als Fragmentlängenstandard wurde der MassRuler™ DNA Ladder Mix der Firma MBI Fermentas verwendet.

Fragmentgrößen in bp:

10000 / 8000 / 6000 / 5000 / 4000 / 3500 / 3000 / 2500 / 2000 / 1500 / 1200 / 1031 / 900 / 800 / 700 / 600 / 500 / 400 / 300 / 200 / 100

3.7 Organismen

3.7.1 Bakterien

Bakterienstamm	Eigenschaften	Referenz
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101	PMP90RK <i>rif^r, gm^r</i>	KONCZ, C., SCHELL, J., 1986
<i>Escherichia coli</i> BL21	F ⁻ , <i>dcm, ompT, lac⁻, Met⁺, r_B⁻, m_B⁻, gal, kan^r</i>	STUDIER & MOFFAT, 1986
<i>Escherichia coli</i> DB3.1	F ⁻ , <i>gyrA462, endA1 D(sr1-recA) mcrB, mrr, hsdS20(r_B⁻, m_B⁻) supE44, ara-14, galK2, lacY1, proA2, rpsL20(Sm^r) xyl-5, λ⁻ leu, mtl-1</i>	BERNARD, P., 1993
<i>Escherichia coli</i> DB3.1	F ⁻ , <i>gyrA 462, endA1, D(sr1-recA), mcrB, mrr, hsdS20 (r_B⁻ m_B⁻), supE44, ara-14, galK2, lacY1, proA2, rpsL20(Sm^r), xyl-S, λ-leu, mtl-1</i>	BERNARD, 1993
<i>Escherichia coli</i> DH5α	F ⁻ , <i>gyrA96 (Nal^r), recA1, endA1, thi-1, hsdR17 (rk-mk⁺), glnV44, deoR, D (lacZYA-argF) U169 [p80dD(lacZ)M15]</i>	HANAHAN (1983)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato DC3000 (pLARR3)	pLAFR3	INNES et al., 1993
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato DC3000 (pABL18) avr Rpt2	pABL18	INNES et al., 1993
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. maculicola ES4326	pLAFR3	WHALEN et al., 1991
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. maculicola ES4326 avrRpt2	pLH12	WHALEN et al., 1991

3.7.2 Hefestämme

Hefestamm	Eigenschaften	Referenz
PJ69-4a	MAT α , trp1-901, leu2-3,112, ura3-52, his3-200, gal4 Δ , gal80 Δ , GAL2-ADE2, LYS2 ::GAL1-HIS3, met2::GAL7-lacZ	JAMES et al., 1996
YTSZ1	YM4271-Derivat mit lacZ unter Kontrolle von 3x <i>as-1</i> ; MAT α , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>ade2-101</i> , <i>lys2-801</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>trp1-901</i> , <i>tyr1-501</i> , <i>gal4-Δ512</i> , <i>gal80-Δ538</i> , <i>ade5::hisG</i>	SIEMSEN, 2002

3.7.3 *Arabidopsis thaliana* Pflanzen

Pflanze	Beschreibung	Referenz
Columbia, Col-0	Wildtyp	NASC Stock Nr. N1092, NASC 2002
Col-0 <i>as-1::GUS</i>	enthält das <i>GUS</i> - Reporter-gen unter der Kontrolle des CaMV 35S (-90)-Promotors,	REDMAN, J. et al. (2002)
SCL14 OE	Überexpressionslinie, exprimiert das <i>SCL14</i> -Gen fusioniert an das HA-tag (N-terminal) unter Kontrolle des CaMV 35S- Promotors, GFP-Marker	diese Arbeit

Pflanze	Beschreibung	Referenz
SCL14 knock out (SALK_126931)	Knock out Linie, exprimiert eine T-DNA-Insertion 55bp stromaufwärts des Startcodons des <i>SCL14</i> -Gens, <i>km^r</i>	SALK Stock Center, Nottingham

3.8 Nährmedien und Zusätze

3.8.1 Nährmedien für Bakterien

dYT-Medium 20 g/l Trypton; 10 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl

King's B-Medium 10 g/l Proteose-Pepton Nr.3; 1,5 g/l di-Kaliumhydrogenphosphat; 15 g/l Glycerin; pH 7 mit HCl; nach dem Autoklavieren zugeben: 5 ml/l 1M MgSO₄; Antibiotika nach Bedarf

LB-Medium 10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl

SOC-Medium 20 g/l Trypton; 5 g/l Hefextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; nach dem Autoklavieren sterilfiltriert zugeben: 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 20 mM Glucose

YEB-Medium 5 g/l Rinderextrakt; 2 g/l Hefeextrakt; 5 g/l Pepton; 5 g/l Saccharose; 2 mM MgSO₄

Für die Herstellung von Festmedien wurden jeweils 15 g/l bakteriologischer Agar zugesetzt.

3.8.2 Nährmedien für Hefen

- SD-Medium** 6,7 g/l Yeast nitrogen base without amino acids, pH 5,8; 100 ml/l DROP OUT-Stock (10x); 50 ml/l Glucose (40%); Aminosäuren
[bei Festmedium: 14 g/l Selectagar]
- YPAD-Medium** 20 g/l Trypton / Pepton aus Casein; 10 g/l Select Hefeextrakt; 50 ml/l Glucose (40%); 20 ml/l Adenin (Hemisulfat) (0,2 %); pH5,8
[bei Festmedium: 14 g/l Selectagar]

3.8.3 Nährmedien für Pflanzen

- 2 MS-Medium** 4,4 g/l MS-Medium; 20 g/l Saccharose; pH 5,8 mit KOH

3.8.4 Medium für BY-2-Suspensionskulturen

- Flüssigmedium** 4,59 g/l Murashige und Skoog Medium; 30 g/l Saccharose; 0,9 g/l Myo-Inositol; 0,9 g/l Thiamin; pH mit KOH auf 5,7; nach dem Autoklavieren zugeben: 0,22 mg/l 2,4-D

3.8.5 Zusätze

Zusatz	Endkonzentration [mg/l]	Stammlösung [mg/ml]
Ampicillin	100 mg/l	100 mg/ml in H ₂ O
Cefotaxim	500 mg/l	250 mg/ml in H ₂ O
Gentamycin	25 mg/l	25 mg/ml in H ₂ O
IPTG	60 µl pro Platte	26 mg/ml in DMF
Kanamycin	50 mg/l	50 mg/ml in H ₂ O
LMB	2 µM	2 mM in EtOH

Zusatz	Endkonzentration [mg/l]	Stammlösung [mg/ml]
MUG	4 mM	40 mM in DMF
Rifampicin	50 mg/l	10 mg/ml in H ₂ O mit HCl
Spektomycin	10 mg/l	10 mg/ml in H ₂ O
Tetracyclin	10 mg/l	50 mg/ml in H ₂ O
X-Gal	60 µl pro Platte	20 mg/ml in DMF
X-Gluc	2 mM	100 mM in DMF

3.9 Standardlösungen und Puffer

PBS (10 x) 1,4 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na₂HPO₄, 18 mM KH₂PO₄, pH 7,3

PBS-T (1 x) 1 x PBS mit 0,1 % (v / v) Tween-20

SSC (20 x) 2 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0 mit HCl

TAE (20 x) 0,8 M Tris, 2,3 % (v / v) Essigsäure, 20 mM EDTA

TE 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5

4 Methoden

4.1 Anzucht und Kultivierung von Mikroorganismen und Pflanzen

Die Medien für die Anzucht von *Escherichia coli*, *Pseudomonas syringae* und *Agrobacterium tumefaciens* enthielten entsprechende Antibiotika, um das Wachstum von Resistenz-tragenden Bakterien unter Selektionsdruck zu gewährleisten. Die Inkubation von Flüssigkulturen wurde im Schüttler bei 250 rpm durchgeführt.

4.1.1 Anzucht von *Escherichia coli*

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

4.1.2 Anzucht von *Pseudomonas syringae*

Die Anzucht der Bakterien erfolgte in King's B-Medium (KING et al., 1954) bei 28°C für 2 Tage.

4.1.3 Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens wurde auf YEB-Festmedium oder in YEB-Flüssigmedium bei 28°C über zwei bis drei Tage kultiviert.

4.1.4 Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Anzucht von *S. cerevisiae* erfolgte auf Vollmedium (YPAD) oder auf geeignetem Selektionsmedium (SD) über Nacht bei 30°C. Die Flüssigkultur wurde im Schüttler bei 250 rpm inkubiert.

4.1.5 Kultivierung von Tabak BY-2-Suspensionskulturen

Bright Yellow-2 (BY-2) Tabak (*Nicotiana tabacum*)-Suspensionskulturen wurden in einem modifizierten Murashige und Skoog-Medium mit 3 % Saccharose, 0,9 g/l Myo-Inositol, 0,9 mg/l Thiamin und 0,22 mg/l 2,4-D in 100 ml Erlenmeyerkolben kultiviert. Die Anzucht erfolgte im Dunkeln bei 26°C auf einem Schüttler mit 120 rpm. Für die Subkultivierung wurden jede Woche 3 ml Kultur in 27 ml frisches Medium transferiert.

4.1.6 Anzucht von *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen

4.1.6.1 Anzucht von *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen auf Erde

Vor der Aussaat wurde die Erde einmal für 30 min bei 90°C gedämpft. Die Samen wurden 2 Tage im Dunkeln bei 4 °C stratifiziert, um eine gleichmässige Keimung zu erreichen. Die Kultivierung der Pflanzen erfolgte in einer Klimakammer entweder unter Langtags- (16 h Licht, 8 h Dunkel) oder unter Kurztags- (8 h Licht, 16 h Dunkel) Bedingungen.

4.1.6.2 Anzucht von *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen in Sterilkultur

Die Samen wurden vor der Aussaat oberflächensterilisiert (Kapitel 4.1.7) und auf Petrischalen mit MS-Medium ausgelegt. Die Stratifizierung erfolgte für 2 Tage im Dunkeln bei 4°C. Anschließend wurden die Petrischalen in einer Klimakammer unter Langtagsbedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkel) inkubiert.

Für die Paraquat-Behandlung wurde MS-Medium mit 0,15 % Saccharose und 0,5 M Paraquat verwendet.

4.1.7 Oberflächensterilisation von Samen

Die Oberflächensterilisation erfolgte in Anlehnung an CLOUGH und BENT (1998 und 2000).

Arabidopsis-Samen wurden in geeigneten Gefäßen (Kunststoff, 0,5 – 50 ml) mit geöffnetem Deckel in einem Exsikkator plaziert. Ein Becherglas mit etwa 100 ml konzentrierter Hypochloritlösung wurde dazugestellt und mit 5 ml konzentrierter Salzsäure versehen. Der Exsikkator wurde rasch geschlossen und ein geringes Vakuum angelegt, um den Exsikkator luftdicht zu verschließen, und eine Verdünnung des Chlorgases zu vermeiden. Nach 4 h war eine ausreichende Sterilisation erreicht.

4.1.8 Kreuzung von *Arabidopsis thaliana*

Die Blüten von *Arabidopsis thaliana* sind so aufgebaut, dass sie sich bereits während des Öffnens selbst bestäuben. Daher können Kreuzungen nur an unreifen Blüten im Knospenstadium vorgenommen werden, die zuvor emaskuliert wurden. Für eine Kreuzung wurden daher junge, kräftige Blütenstände ausgewählt, an denen bereits zwei bis drei Blüten geöffnet waren. Von diesen Blütenständen wurden die unteren zwei bis drei Knospen für die Kreuzung verwandt. Alle Manipulationen wurden mit Hilfe eines Binokulars beobachtet.

Die zu kreuzende Blüte wurde mit einer feinen, weichen Federstahlpinzette so dicht wie möglich unterhalb der Kelchblätter ergriffen und festgehalten. Mit einer scharfen, spitzen Präparationspinzette wurden die vier Kelchblätter nach schräg unten abgezogen. Auf die gleiche Weise wurde mit den vier Blütenblättern und den zwei langen und vier kurzen Antheren verfahren, wobei die Fruchtanlage nicht beschädigt werden durfte. Der Donorpflanze wurde dann ein frisches Staubblatt entnommen und der Pollen auf dem Pistill der emaskulierten Blüte abgestreift. Anschließend wurde mit dem Binokular überprüft, ob Pollen auf dem Pistill hängengeblieben war und wenn nötig die Bestäubung mit einem neuen Staubblatt wiederholt. Die gekreuzten Blüten wurden durch Entfernen der unterhalb liegenden Blüten und der oberhalb befindlichen ein bis zwei Knospen isoliert und der gekreuzte Blütenstand mit einem kleinen Umhängeschild markiert.

4.1.9 Infektion von *Arabidopsis*-Pflanzen mit Pseudomonaden

Zur Bestimmung der Verbreitung von Pathogenen innerhalb einer Pflanze werden die Mikroorganismen isoliert und ihre Kolonienzahl durch Titern ermittelt, indem die Bakterien auf einem semi-selektiven Medium ausgezählt werden (modifiziert nach KNOCHÉ *et al.*, 1987). Zur Quantifizierung des Bakterienwachstums wurden von den Pseudomonaden ü.N. Vorkulturen angezogen und abzentrifugiert (5000 rpm, 5 min,

RT). Die Pseudomonaden wurden auf eine Dichte von 5×10^5 cfu / ml mit 10 mM $MgCl_2$ verdünnt. Eine Blatthälfte wurde mit einer 1 ml-Spritze ohne Nadel von der Blattunterseite inokuliert. Das Volumen einer Inokulation betrug ca. 10 μ l.

4.1.9.1 Bestimmung des Pseudomonadenwachstums in der Pflanze

Von 9 infizierten Pflanzen wurden die Infektionsflächen (\varnothing 0,5 cm) inokulierter Blatthälften ausgestochen, zusammengefasst und in 240 μ l 10 mM $MgCl_2$ homogenisiert. Das Bakterienwachstum wurde zu den Zeitpunkten 0h und 3 Tage nach Infektion aufgenommen. Die homogenisierten Proben wurden jeweils kurz gemischt und in einer Verdünnungsreihe (Tag 0: 1:10, 1:50, 1:250, 1:500; Tag 3: 1:100, 1:500, 1:5000, 1:50000) auf King's B-Medium mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Die Platten wurden 2 Tage bei 28 °C inkubiert und die Anzahl der Kolonien ausgezählt. Es wurden die Bakterienzahlen der gleichen Linien gemittelt und die Standardabweichung ermittelt.

4.1.9.2 Infektion von *Arabidopsis thaliana* mit Pseudomonaden für eine RNA-Isolation

Die Infektion von *A. thaliana* mit Pseudomonaden erfolgte durch Dippen der Blätter in eine Suspension mit Pseudomonaden von einer $OD_{600} = 0,2$ in 10 mM $MgCl_2$ mit etwas Silwet. Die Pflanzen wurden anschließend bei hoher Luftfeuchtigkeit unter einer Haube kultiviert.

4.1.10 Induktion der Genexpression in *Arabidopsis*-Pflanzen

Arabidopsis thaliana in Erdkultur wurden durch Besprühen mit wässrigen Lösungen mittels handelsüblicher Sprühflaschen, die in der Lage waren, einen feinen Sprühnebel zu erzeugen, besprüht, bis die Pflanzen gut benetzt waren. Die Induktionslösungen wurden für jede Sprühbehandlung frisch hergestellt.

Folgende Hormon-Konzentrationen wurden verwendet:

1 mM Salizylsäure; 100 μ M 2,4-D; 20 μ M JA

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Methoden zur Isolierung von Plasmid-DNA

4.2.1.1 Analytische Mengen

4.2.1.1.1 Alkalische Lyse

Zur schnellen Präparation von Plasmid-DNA zu analytischen Zwecken wurde eine modifizierte alkalische Lyse der Bakterien (BIRNBOIM & DOLY, 1979; ISH-HOROWICZ & BURKE, 1981) vorgenommen. 1,5 ml einer stationären *E. coli*-Kultur wurden pelletiert (1 min, 13000 rpm) und die Zellen nach Dekantieren des Überstandes in 100 µl Lösung I resuspendiert. Die Lyse der Bakterien erfolgte im alkalischen Milieu durch Zugabe von 200 µl Lösung II. Nach Invertieren wurde zur Neutralisation 150 µl Lösung III zugegeben, der Ansatz gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Präzipitate wurden durch Zentrifugation (5 min, 15000 rpm, 4°C) sedimentiert. Die obere, wässrige Phase wurde zur Präzipitation der DNA mit 2,5 Volumen Ethanol (-20°C) gemischt und 1 h bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 10 min, 15000 rpm, 4°C zentrifugiert. Die pelletierte DNA wurde mit 70% Ethanol gewaschen und für 10 min im gekühlten SpeedVac Concentrator getrocknet. Die gewonnene DNA wurde in 100 µl TE gelöst und kann zur Restriktionsanalyse eingesetzt werden.

4.2.1.1.2 Plasmidisolierung mit dem QIAprep Spin Miniprep-Kit

Für Sequenzierreaktionen wurde hochreine Plasmid-DNA mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep-Kits der Firma Qiagen isoliert. Die Präparation erfolgte nach Herstellerangaben. Abweichend vom Protokoll wurden stets 3 ml stationäre *E. coli*-Kultur eingesetzt und die DNA mit 50 µl EB-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) eluiert.

4.2.1.1.3 Schnelllyse von *E. coli* Zellen für eine anschließende PCR

Die einzelnen Kolonien wurden in 10 µl H₂O resuspendiert und mit folgendem Programm im Thermocycler aufgekocht:

94°C	1 min
60 °C	1 min
94°C	1 min
50°C	1 min
94°C	1 min
40°C	1 min
7°C	∞

Anschliessend wurde der gesamte Ansatz für einen 20 µl PCR-Ansatz als Template eingesetzt.

4.2.1.2 Präparative Mengen

Größere Mengen Plasmid-DNA mit hohem Reinheitsgrad wurden mit Hilfe der Midi- und Maxi-Kits der Firma Qiagen isoliert. Die Durchführung erfolgte gemäß den Herstellerangaben.

4.2.1.2.1 DNA-Elution aus Agarosegelen

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (Kapitel 4.2.3.2) wurde der QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen verwendet. Die Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

4.2.2 Methode zur Isolierung von genomischer DNA aus *Arabidopsis*

100 mg Pflanzenmaterial wurden in 200 µl Microprep Puffer aufgenommen und mit der Bohrmaschine zerkleinert. Anschließend wurden 550 µl Microprep Puffer dazugegeben. Die Suspension wurde gut durchmischt und 30-120 min bei 65°C inkubiert. Danach wurden 700 µl Chloroform / Isoamylalkohol (24:1) dazugegeben und die Lösung gut durchmischt. Nach der Zentrifugation bei 13000 rpm für 5 min wurde die wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt, und 2 / 3 bis 1 Volumen kaltes Isopropanol wurden dazugegeben und der Ansatz gut durchmischt. Es folgte eine Zentrifugation von 5 min bei 13000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70 % Ethanol

gewaschen. Die Zentrifugation wurde wiederholt, der Überstand abgenommen und das Pellet getrocknet. Die trockene DNA wurde in 50 µl TE aufgenommen.

4.2.3 Methoden zur Charakterisierung von Nukleinsäuren

4.2.3.1 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung wurde der GeneQuant II der Firma Pharmacia verwendet. Da die Absorption von Nukleinsäuren in einer wässrigen Lösung im UV-Bereich bei 260 nm gemessen werden kann, ließ sich hierdurch die Konzentration der DNA bestimmen. Das Absorptionsmaximum bei dieser Wellenlänge wurde durch die Anregung des π -Elektronensystems in den Heterozyklen der Basen hervorgerufen. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht somit eine OD_{260} von 1,0 einer Nukleinsäure-Konzentration von 50 µg / ml bei dsDNA und 40 µg / ml bei RNA. Im Vergleich zur Absorption bei der Wellenlänge 280 nm, bei der die aromatischen Seitenketten von Proteinen angeregt werden, lässt sich nun der Quotient aus der Absorption der Wellenlängen 260 / 280 nm als ein Maß für den Reinheitsgrad der DNA- oder RNA-Präparation darstellen. Der Reinheitsgrad sollte idealerweise zwischen 1,7 und 2,0 liegen. Gemessen werden 1:100 Verdünnungen der Präparationen um den linearen Messbereich des Photometers einzuhalten.

4.2.3.2 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

4.2.3.2.1 Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA für analytische und präparative Zwecke wurde in horizontalen Agarosegelen (10 cm x 7 cm x 0,3 cm, 16 Taschen) mit 1 x TAE (40 mM Tris-HCl pH 8,0; 1,15 % (v/v) Essigsäure; 1 mM EDTA) als Laufpuffer durchgeführt. Für DNA-Moleküle im Größenbereich von 500 bp bis 14 kb wurden Gele mit einer Konzentration von 1 % (w/v) Agarose in 1 x TAE benutzt. Für die Auftrennung kleinerer Moleküle wurden sogenannte HEC-Gele (1 % (w/v) Agarose und 0,7 % (w/v) Hydroxyethylcellulose (HEC) in 1 x TAE) eingesetzt (PERLMAN und HALVORSON, 1987). Die DNA-Proben wurden zunächst mit 1/5 Volumen Probenpuffer (5 x Probenpuffer: 20 x TAE; 66,6 % Glycerin; jeweils eine Spatelspitze Bromphenolblau, Xylencyanol FF und Orange G) versetzt und bei 90-120 V über einem Zeitraum von 0,5-1,5 Stunden elektrophoretisch aufgetrennt. Der Verlauf der Elektrophoresefront konnte anhand der Farbmarker verfolgt werden. Um die DNA im Anschluss an die Auftrennung sichtbar zu machen, wurde das Gel 10 min in einer Ethidiumbromidlösung (1 mg/l EtBr in H₂O) inkubiert, anschließend der Gelhintergrund kurz in H₂O entfärbt und der Bandenverlauf auf dem UV-Transilluminator (302 nm) mit Hilfe der Geldokumentationsanlage dokumentiert.

4.2.3.2.2 Auftrennung von RNA in denaturierenden Agarosegelen

Die elektrophoretische Auftrennung von RNA erfolgte unter denaturierenden Bedingungen, um das Ausbilden von Sekundärstrukturen zu verhindern. Die Elektrophorese fand in horizontalen, formaldehydhaltigen Agarosegelen (1 % (w/v) Agarose, 5,5 % (v/v) Formaldehyd) statt mit 1 x MEN (20 mM MOPS; 5 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA, pH 7,0 mit NaOH) als Puffersystem. Die Gele hatten eine Größe von 15 cm x 10 cm x 1 cm und besaßen 15 „große“ (90 µl Probenvolumen) oder 20 „kleine“ (60 µl Probenvolumen) Taschen. Vor dem Auftragen wurden jeweils 10 µg der RNA mit RNase-freiem H₂O auf gleiche Volumina gebracht und mit 3 x RNA-Probenpuffer (3 x MEN; 3,7 % (v/v) Formaldehyd; 43 % (v/v) Formamid; 10 % (v/v) Glycerin; 4 mM EDTA; 0,1 % (v/v) gesättigte Bromphenolblaulösung) versetzt, welcher 1 µg Ethidiumbromid pro Ansatz enthielt. Die RNA-Proben wurden anschließend durch Inkubation bei 65°C für 5 min denaturiert und bis zum Auftragen auf Eis gelagert. Die Elektrophorese erfolgte nach Beladen des Gels und dem vollständigen Auffüllen (mit 1 x MEN) der Taschen bei 12 Watt für 0,2 kWh. Als Laufpuffer wurde 1 x MEN verwendet, lediglich an das Gel angeschichtet, ohne es zu bedecken. Die Auftrennung der RNA wurde auf dem UV-Transilluminator mit Hilfe der Geldokumentationsanlage sichtbar gemacht.

4.2.3.2.3 Sequenzierung von DNA

DNA-Sequenzierungen erfolgten mit Hilfe des BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits von Perkin-Elmer. Das Prinzip beruht auf der Kettenabbruchmethode (SANGER et al., 1977).

Sequenzierung von Plasmid-DNA

Für die PCR-Reaktion mit einem Gesamtvolumen von 10 µl wurden 600 ng Plasmid-DNA, 5 pmol Primer und 2 µl RR- (ready reaction) Mix eingesetzt. Im Thermocycler wurden folgende Schritte 25 mal durchlaufen: 20 sek 95°C, 15 sek 50°C und 2 min 60°C. Anschließend fand eine Ethanol-Fällung statt, um nicht eingebaute Nukleotide zu entfernen. Hierzu wurde der Ansatz mit 9,5 µl H₂O und 30,5 µl EtOH abs. versetzt und 1 h bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation bei 13000 rpm für 15 min (Biofuge) wurde der Überstand vollständig abgenommen, das DNA-Pellet mit 150 µl 70 % (v/v) EtOH gewaschen, 1 min bei 95°C getrocknet und in 20 µl TSR (Template Suppression Reagent von Perkin-Elmer) resuspendiert. Nach dem Denaturieren bei 95°C für 2 min wurde die Probe sofort 5 min auf Eis gestellt und für die Sequenzanalyse im ABI Prism 310 in spezielle Sequenziergefäße überführt.

4.2.3.2.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (MULLIS & FALOONA, 1987) werden Nukleinsäure-Bereiche definierter Länge und Sequenz ausgehend von geringsten Mengen an DNA-Molekülen (Template-DNA) *in vitro* amplifiziert. Zunächst werden die beiden Stränge der Template-DNA thermisch aufgeschmolzen (Denaturierung). Anschließend binden zwei chemisch synthetisierte Oligonukleotide (Primer) antiparallel an die 5'-Randbereiche der zu amplifizierenden Zielsequenz (Annealing). Die hitzestabile *Taq*-Polymerase katalysiert im nächsten Schritt die komplementäre Polymerisation von Nukleotiden an die freie 3'-OH-Gruppe der Primer (Elongation). Bei mehrfacher Wiederholung der Reaktionsfolge aus DNA-Denaturierung, Annealing und Elongation kommt es exponentiell zu einer selektiven Anreicherung der DNA-Sequenz, die durch die Oligonukleotide flankiert wird. Da die eingesetzten Oligonukleotide später Bestandteile des Amplifikationsproduktes sind, kann man durch modifizierte Primer z.B. Restriktionsschnittstellen in die Randbereiche der amplifizierten DNA einfügen. Ein Standard-PCR-Ansatz (20µl) enthielt Matrizen-DNA (10 ng Plasmid-DNA), jeweils 20 pmol der beiden Primer, dNTPs (0,2 mM je Nukleotid) und 2,5 U *Taq*-Polymerase in 1 x *Taq*-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 8,55; 1,5 mM MgCl₂; 16 mM (NH₄)₂SO₄). Die Amplifikation wurde in einem Thermocycler mit folgenden Programmen durchgeführt:

Programm 1

		Erste Denaturierung:	1 min	94°C	
10 Zyklen	[Denaturierung:	30 sek	94°C	
		Annealing:	30 sek	60°C	
		Elongation:	1 min	72°C	
		Denaturierung:	30 sek	94°C	
20 Zyklen	[Annealing:	30 sek	60°C	
		Elongation:	1 min	72°C	+ 10 sek / Zyklus
		Finale Elongation:	7 min	72°C	

Programm 1 wurde als Standardprogramm verwendet.

Programm 2

34 Zyklen	[Denaturierung:	1 min	94°C
		Annealing:	1 min	62°C
		Elongation:	1,5 min	72°C
		Finale Elongation:	6 min	72°C

Programm 2 wurde für die Primer GUS sense und GUS antisense verwendet.

4.2.3.3 Methoden zur Modifikation von Nukleinsäuren**4.2.3.3.1 Restriktionsspaltung von DNA**

Doppelsträngige DNA kann mit Hilfe von Restriktionsenzymen des Typs II sequenzspezifisch gespalten werden. Je nach Enzym entstehen dabei 3'- oder 5'-überhängende („sticky“) oder glatte („blunt“) DNA-Enden. Die für die verschiedenen Restriktionsenzyme optimalen Reaktionsbedingungen wurden mit zehnfach konzentrierten Restriktionspuffern der Firma MBI Fermentas eingestellt. Die Aktivität von Restriktionsendonukleasen wird in „Units“ (U) angegeben, wobei mit 1 U die Enzymmenge definiert ist, die 1 µg λ-DNA (48500 bp) innerhalb von 60 Minuten unter optimalen Bedingungen vollständig spaltet. Die minimale Enzymmenge (U_{\min}), die 1 µg einer Proben-DNA in einer Stunde komplett schneidet, errechnet sich nach folgender Formel:

$$U_{\min} = \frac{\text{bp } [\lambda\text{-DNA}] \times \text{Schnittstellen [DNA]}}{\text{Schnittstellen } [\lambda\text{-DNA}] \times \text{bp [DNA]}} \quad (\text{bp } [\lambda] = 48500)$$

Da Art und Reinheitsgrad der DNA die Enzymaktivität beeinflussen, wurde für einen vollständigen Verdau meist ein Überschuss an Restriktionsenzym eingesetzt oder die Reaktionszeit verlängert. Um unspezifische Reaktionen durch zu hohe Glycerinkonzentrationen in den Spaltungsansätzen zu vermeiden, wurden die Volumina so gewählt, dass der Anteil der Enzymlösung am Gesamtvolumen unter 10 % lag. Die Inkubation der Restriktionsansätze erfolgte in der Regel bei 37°C, dem Temperaturoptimum der meisten Enzyme.

4.2.3.3.2 Ligation

Die T4-DNA-Ligase katalysiert eine Phosphordiesterbindung zwischen benachbarten 5'-Phosphat- und 3'-OH-Gruppen. Als Kosubstrat muss ATP in geeigneter Konzentration im Puffermedium vorliegen. Das zu inserierende DNA-Fragment wurde in 10-fachem molarem Überschuss zu der gespaltenen Vektor-DNA (50 fmol) zugegeben. Die Ligation erfolgte im Ligationspuffer (40 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 0,5 mM ATP, pH 7,5) mit 3 Units T4-DNA-Ligase. Die Ligationenansätze mit einem Endvolumen von 15 µl wurden mindestens 1 h bei RT inkubiert.

4.2.3.3.3 Alkalische Phosphatase Behandlung der DNA

Das Enzym alkalische Phosphatase (CIAP = Calf Intestine Alkaline Phosphatase) ist in der Lage 5'-Phosphatgruppen von DNA-Molekülen abzuspalten. Da die T4 DNA-Ligase nur in der Lage ist, DNA-Moleküle zu verknüpfen, wenn eine 5'-Phosphatgruppe an einem Fragmentende vorhanden ist, lässt sich durch Zugabe von 1 µl CIAP zum Ansatz z.B. eine Rezyklisierung des Vektors unterdrücken. Nach CIAP-Zugabe wurde der Ansatz weitere 20 min bei 37°C inkubiert.

4.2.3.3.4 Klonierung mit dem GATEWAY™-System

Bei Gateway™-Klonierungen werden DNA-Segmente über ortsspezifische Rekombination zwischen verschiedenen Plasmiden transferiert. Das System basiert auf der ortsspezifischen Integration des Phagen Lambda in das Genom von *E. coli*. Um für die Rekombination verfügbar zu sein, müssen Erkennungssequenzen an das gewünschte DNA-Segment angefügt werden. Dies geschieht, indem man das gewünschte DNA-Stück mit Primern amplifiziert, die an den 5'-Enden die Erkennungssequenzen attB1 und attB2 enthalten.

Die Klonierungen mit dem Gateway™-System verläuft über zwei Reaktionen. Das DNA-Segment kann aus dem PCR-Produkt in der ersten Reaktion (BP-Reaktion) in einen "Eingangs-Vektor" rekombiniert werden. Von dort aus kann es in der zweiten Reaktion (LR-Reaktion) in verschiedene "Ziel-Vektoren" transferiert werden. Ausserdem besteht die Möglichkeit, das DNA-Segment aus dem Ziel-Vektor in einer weiteren BP-Reaktion in einen anderen "Eingangs-Vektor" zu setzen.

4.2.3.4 Transformation von Mikroorganismen und Pflanzen

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

4.2.3.4.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Herstellung kompetenter Zellen nach einer modifizierten Methode von INOUE *et al.* (1990) wurden Bakterien des *E. coli*-Stammes DH5 α verwendet.

Von einer frisch ausgestrichenen Platte wurde zunächst eine Vorkultur in SOC-Medium angeimpft, die nach etwa 8h Inkubation als Inokulum für eine 5 ml (SOC-Medium) Übernachtskultur diente. Die Übernachtskultur wurde am nächsten Tag in 300 ml SOC-Medium verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2 - 0,25 bei 37°C in einem 2 l Erlenmeyerkolben geschüttelt. Das weitere Wachstum der Zellen erfolgte dann bei einer Temperatur von 18°C. Bei einer OD₆₀₀ von 0,4 - 0,5 wurden die Bakterien durch Zentrifugation (4000 rpm, 4°C, Eppendorf-Kühlzentrifuge) pelletiert und in 90 ml eiskaltem, sterilem Transformationspuffer (10 mM PIPES, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, 55 mM MnCl₂, pH 6,7 vor Zugabe von MnCl₂ eingestellt) vorsichtig resuspendiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut pelletiert und in 30 ml Transformationspuffer aufgenommen. Es folgte der zweimalige Zusatz von je 1050 μ l DMSO, wobei die Zellen nach jeder Zugabe 5 min auf Eis inkubiert wurden. Die Zellen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Die Transformationseffizienz betrug 107cfu/ μ g DNA.

4.2.3.4.2 Transformation von *E. coli*

Kompetente *E. coli*-Zellen sind in der Lage nackte DNA aus dem Umgebungsmedium aufzunehmen. Mit Hilfe der nachfolgenden Methode (HANAHAN, 1983) wurden *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA transformiert. 200 μ l kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut, dann erfolgte die Zugabe der Plasmid-DNA und Inkubation für 30 min auf Eis (Anheftung der DNA an die Zellen). Durch einen Hitzeschock der Zellen für 90 sek bei 42°C erfolgte die Aufnahme der DNA. Eine Regeneration der Zellen schloss sich nach Zugabe von 800 μ l LB-Medium für 60 min bei 37°C an. Danach wurde der Transformationsansatz auf LB-Selektionsmedium ausplattiert und bei 37°C ü.N. inkubiert.

resistenten Pflanzen abgestorben. Um auszuschließen, dass nicht resistente Pflanzen überleben, wurden die Pflanzen noch einmal nach 7 Tagen mit Basta[®] besprüht.

4.2.3.5 Northern Blot Analyse

Im Northern-Blot-Verfahren (SAMBROCK et al., 1989) wird die zu analysierende RNA durch eine denaturierende Agarosegelelektrophorese (siehe Kapitel 4.2.3.2.2) aufgetrennt und mittels Kapillar-Blot auf eine Nylonmembran transferiert. Die auf der Membran immobilisierte RNA kann nun durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden (siehe Kapitel 4.2.3.5.5) analysiert werden.

4.2.3.5.1 Isolierung von RNA aus Pflanzen mit dem Invisorb[®] Spin Plant RNA Mini Kit

Zur RNA-Präparation aus *Arabidopsis*-Blättern wurde der Invisorb[®] Spin Plant RNA Mini Kit der Firma Invitex verwendet. Die Aufarbeitung erfolgte mit Hilfe des Herstellerprotokolls. Zur Extraktion wurde der DCT-Puffer verwendet. Eingesetzt wurden 150 mg Material.

4.2.3.5.2 Isolierung von RNA aus Pflanzen mit Trizol

Die Methode kann dazu verwendet werden aus demselben Pflanzenmaterial sowohl RNA, als auch DNA und Proteine zu gewinnen (CHOMCZYNSKI, 1993 sowie CHOMCZYNSKI und SACCHI, 1987). In diesem Fall wurde das Protokoll auf die RNA-Gewinnung in Pflanzen optimiert. Das normalerweise verwendete Trizol (Gibco, BRL) wurde durch den Extraktionspuffer ersetzt (Mengenangaben nach AFGC 2002). Die Methode basiert auf einer Phenol/Chloroform Extraktion, die die Tatsache ausnutzt, dass RNA sich besser in der hydrophilen, wässrigen Phase löst, während Chlorophyll und andere Bestandteile besser in der hydrophoben Chloroform-Phase gelöst werden. Die beiden Thiocyanat-Salze im Extraktionspuffer inhibieren RNasen und verhindern damit eine Degradation der RNA. Die Fällung der RNA mit Isopropanol, sowie den Salzen NaCl und Natriumcitrat dient der Einengung des Volumens.

Nach Aufmörsern der Proben unter flüssigem Stickstoff werden pro 150 mg Material 1,3 ml Trizol (380 ml/l Phenol mit 0,1M Citratpuffer pH 4,3 gesättigt; 0,8 M Guanidiniumthiocyanat; 0,4 M Ammoniumthiocyanat; 33,4 ml Na-Acetat, 3M, pH5,2; 5% Glycerin) zugegeben. Die Proben werden für 20 min bei RT geschüttelt. Nach Zufügen von 260 µl Chloroform und erneutem Schütteln, werden die Proben für 30-60 min bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Zu den 900 µl Überstand werden

4.2.3.4.3 Herstellung kompetenter Hefezellen

Zur Herstellung kompetenter Hefezellen wurde eine 5 ml-Übernachtskultur in YPDA-Medium herangezogen. Die Kultur wurde bei 3000 x g abzentrifugiert und das Zellpellet in 500 µl Überstand resuspendiert. Mit dieser Zellsuspension wurde eine 100 ml-YPDA-Kultur inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert (ca. 3-4 h, 30°C, 250 rpm). Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 3000 x g geerntet und in 20 ml Lösung A (10 mM Bicine; 1 M Sorbitol; 3 % Ethylenglycol (v/v), pH 8,35) gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden sie in 2 ml Lösung A resuspendiert und in 100 µl Aliquots langsam bei -70°C eingefroren und gelagert. Die Zellen können mehrere Monate gelagert werden ohne wesentlichen Verlust ihrer Kompetenz.

4.2.3.4.4 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Zur Transformation der kompetenten Hefezellen wurde 0,1-1 µg Plasmid-DNA zu 50 µg Heringssperma-DNA (10 mg/ml in TE) gegeben und auf ein Aliquot der gefrorenen, kompetenten Hefezellen pipettiert. Nach dem Auftauen der Zellen bei 37°C für 5 min wurde 1 ml Lösung B (200 mM Bicine; 40 % Polyethylenglycol 1000 (w/v), pH 8,35) zugegeben, gemischt und eine Stunde bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden schließlich durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für 20 sek in einer Tischzentrifuge geerntet und in 800 µl Lösung C (10 mM Bicine; 150 mM NaCl, pH 8,35) gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden sie in 100 µl Lösung C resuspendiert und auf Selektionsmedium ausplattiert.

4.2.3.4.5 Herstellung kompetenter Agrobakterien-Zellen

Die Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* mit DNA erfolgte mittels Elektroporation (DOWER et al., 1988). Es wurde eine ü.N. Kultur der Bakterien in YEB-Medium verwendet und in 250 ml Medium verdünnt. Nachdem die Kultur bei 28°C eine OD₆₀₀ von 0,5 erreicht hatte wurde sie durch Zentrifugation (5 min, 5000 rpm) geerntet und die Zellen 3 mal in 4 °C sterilem kaltem H₂O gewaschen. Das Pellet wurde in 1 ml 15 % Glycerin resuspendiert, zu je 50 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die kompetenten Zellen können bis zur Verwendung bei -80°C gelagert werden.

4.2.3.4.6 Gentransfer in *Agrobacterium tumefaciens*

Zur Elektroporation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, mit der gewünschten DNA versetzt und in eine Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 2 mm) überführt. Die Transformation erfolgte im Elektroporator bei einer Spannung von 2,5 kV, Kapazität von 25 µF und Widerstand von 400 W. Die Zellen wurden nach der Elektroporation mit 1 ml SOC-Medium versetzt und 1 h bei 28°C inkubiert. Nach der Regeneration wurden die Zellen auf Selektionsmedium ausplattiert und 2 - 3 Tage bei 28 °C inkubiert.

4.2.3.4.7 Transiente Transfektion von Protoplasten aus *Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow 2- (BY-2-) Suspensionskulturen

Die Transfektion von Protoplasten aus BY2-Zellkulturen wurde in Anlehnung an (GATZ und QUAIL, 1988) durchgeführt. BY-2-Zellkulturen wurden am dritten Tag nach der Subkultivierung durch leichte Zentrifugation (400 x g, 5 min ohne Auslaufbremse, Eppendorf Centrifuge 5403 mit Rotor 16A4-44) geerntet und mit 20 ml Osmotikum (0,5 % BSA; 0,01 % β-Mercaptoethanol; 0,05 M CaCl₂; 0,01 M Na-Acetat; 0,25 M Mannitol, pH 5,8) gewaschen. Die Suspension wurde mit 40 ml isoosmotischer Enzymlösung (1 % Cellulase Onozuka RS; 0,5 % Macerozym Onozuka R 10; 0,1 % Pectinase; 0,5 % BSA; 0,01 % β-Mercaptoethanol; 0,05 M CaCl₂; 0,01 M Na-Acetat; 0,25 M Mannitol, pH 5,8) versetzt und über Nacht im Dunkeln inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Protoplasten durch Zentrifugation bei 100 x g für 5 min bei Raumtemperatur geerntet und mit 20 ml Osmotikum gewaschen. Nach Zugabe von 10ml W5 (154 mM NaCl; 125 mM CaCl₂; 5 mM KCl; 5 mM Glucose, pH 5,8-6,0), Zentrifugation (100 x g, 5 min ohne Auslaufbremse, RT) und erneuter Zugabe von 5 ml W5 wurde die Zelldichte in der Suspension durch Auszählen in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Es folgte eine einstündige Inkubation bei 4°C im Dunkeln. Anschließend wurden die Protoplasten abzentrifugiert (100 x g, 5 min ohne Auslaufbremse, RT) und mit einer Zelldichte von 2 x 10⁶ Zellen pro ml in MMM-Lösung (15 mM MgCl₂; 0,1 % MES; 0,5 M Mannitol, pH 5,8) aufgenommen.

Die Transformation der Protoplasten erfolgte mit Hilfe von PEG-4000: 300 µl Protoplasten wurden jeweils auf die zu transformierende DNA gegeben und für 20 min mit 300 µl PEG-Lösung (40 % PEG-4000; 0,4 M Mannitol; 0,1 M Ca(NO₃)₂, pH 8-9) inkubiert. Nach Zugabe von 10 ml W5 und Zentrifugation (100 x g, 5 min ohne Auslaufbremse, RT) wurde das Pellet in 700 µl MS-Medium mit Saccharose (MS-Medium, 0,4 M Saccharose) aufgenommen und ü.N. bei 25°C im Dunkeln und in schräglage inkubiert.

Die so transformierten Protoplasten wurden entweder mikroskopisch untersucht oder wie folgt für einen MUG-Assay verwendet. Zu diesem Zweck wurden die Zellen vorsichtig mit insgesamt 700 µl Solution 2 gemischt und abzentrifugiert (400 x g, 10 min ohne Auslaufbremse, RT). Nach unvollständigem Abnehmen des Überstandes und erneutem Auffüllen auf 1 ml mit Solution 2 wurden die Zellen für 10 min bei 5000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl GUS-EX-Puffer (50 mM

Natriumphosphatpuffer; 10 mM EDTA; 0,1 % Triton X-100; 0,1 % Sarkosyl; 0,05 % β -Mercaptoethanol, pH 7,5) aufgenommen. Durch gründliches Schütteln auf dem Vortex-Mixer und wiederholtes Einfrieren in flüssigem Stickstoff sowie Auftauen bei 37°C wurden die Zellen schließlich aufgebrochen. Der Überstand nach Zentrifugation (15000 rpm, 20 min, 4°C) wurde zur Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford eingesetzt und konnte direkt für einen MUG-Assay verwendet werden.

4.2.3.4.8 Stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana*

"Floral-dip" Transformation

Für die Agrobakterien-vermittelte Transformation von *Arabidopsis thaliana* wurde eine einfache Methode entwickelt (CLOUGH und BENT, 1998; BENT, 2000). Pflanzen, die gerade begonnen haben zu blühen, werden in Medium mit den entsprechenden Agrobakterien und einem Benetzungsmittel (SilwetL-77) getaucht. Dabei scheinen sich entwickelnde Eizellen das bevorzugte Ziel produktiver Transformationen zu sein (BENT, 2000). Aus diesen Zellen entstehen heterozygote Samen. Für die Transformation wurden pro Topf (\varnothing 6 cm) bis zu 50 Samen ausgesät. Weniger, aber stärkere Pflanzen pro Topf erhöhen die Transformationsrate. Die Pflanzen wurden bis zur Blüte angezogen. Die ersten Blüten wurden abgeschnitten, um die Bildung vieler sekundärer Blütenstände anzuregen.

Die Anzucht der Agrobakterien-Vorkultur erfolgte in 25 ml YEB mit entsprechenden Antibiotika über Nacht. Anschließend wurde eine 400 ml YEB-Hauptkultur mit der ü.N.-Kultur beimpft und bis zu einer OD_{600} von etwa 2.0 wachsen gelassen. Die Bakterien wurden bei 1000 x g für 10 min pelletiert und in 5% Saccharose bis zum Erreichen einer OD_{600} von etwa 0,8 resuspendiert. Die Pflanzen wurden für einige Sekunden bis zur Rosette in die Agrobakterien-Lösung gedippt und dabei leicht bewegt. Anschließend wurden sie zurück in die Klimakammer gestellt, 1-2 Tage mit einer Haube abgedeckt und bis zur Samenreife (2-3 Wochen) weiterkultiviert.

Die Pflanzen trockneten im Anschluss in Papiertüten trocknen. Die trockenen Pflanzen wurden dann vorsichtig mit den Fingern zerrieben, um die Schötchen aufzubrechen. Die Samen wurden durch Sieben grob von den übrigen Pflanzenteilen getrennt und können bei RT trocken gelagert werden.

Selektion auf Basta[®]-Resistenz:

Die Samen wurden zunächst wie gewohnt auf Erde ausgesät und kultiviert. Wenn die Pflanzen 2-4 vegetative Blätter gebildet hatten wurden sie mit 1 mM Basta[®] besprüht (etwa 1 ml / Topf). Basta[®], Phosphinothricin (auch Glufosinat = L-Homoanalin-4-yl-(methyl)-phosphinsäure) wirkt als Strukturanalogon des L-Glutamat und inhibiert dadurch die Glutaminsynthetase. Die Pflanzen können bei Behandlung mit Basta[®] Glutamat nicht mehr in Glutamin umwandeln. Dadurch häuft sich Ammonium in einer letalen Konzentration in der Pflanze an und führt zusammen mit dem Glutaminmangel zum raschen Absterben der behandelten Pflanzen. Nach 3-4 Tagen waren die nicht

325 µl HSPB (1,2 M NaCl; 0,8 M tri-Natrium-Citrat) gegeben und invertiert. Nach Zugabe von 325 µl Isopropanol und 10 minütiger Inkubation bei RT werden die Ansätze erneut zentrifugiert. Das getrocknete Pellet wird in 40 µl DEPC-H₂O aufgenommen.

Die Auftrennung erfolgte in einer denaturierenden RNA-Gelelektrophorese (Kapitel 4.2.3.2.2)

4.2.3.5.3 Kapillar Blot

Mittels Kapillar-Blot wurde die durch eine denaturierende Agarosegelelektrophorese aufgetrennte RNA auf eine Nylonmembran transferiert. Dazu wurden zwei Lagen Fließpapier mit 10 x SSC (1,5 M NaCl, 150 mM Natriumcitrat, pH 7,0 mit HCl) äquilibriert und so auf einer ebenen Glasplatte aufgebracht, dass die Enden in ein 10 x SSC-Pufferreservoir tauchten. Das RNA-Gel wurde luftblasenfrei mit der Oberseite nach unten auf das Fließpapier gelegt. Die Kanten des Gels wurden mit Haushaltsfolie abgedeckt. Die Nylonmembran (Hybond N+ von Amersham) wurde luftblasenfrei auf das Gel gelegt, mit zwei Lagen Fließpapier und Papiertüchern bedeckt und mit einem Gewicht (ca. 500 g) gleichmäßig beschwert. Der Kapillarblot erfolgte für mindestens 14 h. Die RNA wurde durch kurze UV-Bestrahlung auf dem Transilluminator und durch zweistündige Inkubation bei 80°C auf der Membranoberfläche fixiert.

4.2.3.5.4 Herstellung eines radioaktiv markierten DNA-Fragments

Für die Herstellung radioaktiv markierter Hybridisierungssonden wird ein DNA Fragment nach Restriktionsspaltung aus einem Agarosegel eluiert. Die Markierungsreaktion erfolgte nach der Random-Prime-Labeling-Methode nach Feinberg und Vogelstein, 1983, bei der Hexanukleotide zufälliger Sequenz an die Matrizen-DNA binden: Die annealten Hexanukleotide dienen dann als Primer für die Neusynthese eines komplementären Stranges durch die Klenow-Polymerase unter Einbau von radioaktiven Nukleotiden. Die verwendete Klenow-Polymerase ist modifiziert, so dass sie keine Exonucleaseaktivität (exo-) mehr besitzt. Die Markierungsreaktion wird mit Hilfe des Megaprime™ DNA labeling system Kits von Amersham Pharmacia vorgenommen. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

4.2.3.5.5 Hybridisierung des Filters

Die Hybridisierung erfolgte in modifizierter Form nach der Methode von CHURCH und GILBERT (1984). Alle Inkubationen erfolgten bei 65°C im Rotations-Hybridisierungssofen. Die zu hybridisierende Membran wurde in Hybridisierungsröhren überführt und 60 min in 15 ml Church-Lösung (1 mM EDTA, 7 % (w/v) SDS, 0,5 M NaHPO₄, pH 7,2) vorhybridisiert. Die radioaktive Sonde wurde nach 15-minütiger Denaturierung bei 100°C im Wasserbad zugegeben. Die Inkubation erfolgte für mindestens 14 h.

4.2.3.5.6 Waschen der Northern-Blot-Membran

Nach der Hybridisierung wurde die Membran standardmäßig zweimal für 5 min mit Waschlösung I (2 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS) im Rotations-Hybridisierungssofen und zweimal für 10 min mit Waschlösung II (1 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS) im Hybridisierungsschüttler bei 65°C gewaschen. Durch Waschschrte unter Verwendung von Waschlösungen unterschiedlicher Salzkonzentrationen werden unspezifisch bindende Sondenmoleküle entfernt. Bei hohen Salzkonzentrationen ist die Stabilität unspezifischer DNA-RNA-Hybride größer als bei geringen Salzkonzentrationen. Nach dem Waschen wurde der Filter feucht in Haushaltsfolie eingeschweißt und in einer Expositionskassette mit einem Bioimager-Screen für einige Stunden oder Tage exponiert. Die Auswertung des Screens erfolgte am Bioimager (BAS-1000 von Fuji). Für die Quantifizierung wurden die Programme PCBAS[®]2.09 und TINA[®]2.0 der Firma raytest Isotopenmessgeräte benutzt. Eine Normalisierung der Signale wurde über den Vergleich mit der dokumentierten Ethidiumbromidfärbung der RNA (Kapitel 4.2.3.2.2) erzielt.

4.2.3.5.7 Rehybridisierung

Die auf der Membranoberfläche fixierte RNA kann nacheinander mit mehreren verschiedenen Sonden hybridisiert werden. Dazu müssen die auf dem Filter befindlichen radioaktiven Sonden aus der vorhergehenden Hybridisierung durch Denaturierung der RNA-DNA-Hybride in Waschlösung bei hoher Temperatur abgelöst werden. Die Membran wurde durch Inkubation mit kochendheißer 0,1 %iger SDS-Lösung für zweimal 30 min im Hybridisierungsschüttler bei 65°C gewaschen. Danach war der Filter für eine erneute Hybridisierung einsetzbar.

4.2.3.6 Southern Blot Analyse

Im Southern-Blot-Verfahren (SAMBROCK *et al.*, 1989) wurde die zu analysierende genomische DNA zunächst mit Restriktionsendonukleasen in Fragmente definierter Größe gespalten. Nach zusätzlichem Verdau mit RNase und Proteinase K wurde die gespaltene DNA durch Agarosegelelektrophorese (siehe Kapitel 4.2.3.2) aufgetrennt und mittels Kapillar-Blot auf eine Nylonmembran transferiert. Die auf der Membran immobilisierte DNA konnte nun durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden (siehe Kapitel 4.2.3.5.5) analysiert werden.

4.2.3.6.1 Restriktionsspaltung

Die Restriktion erfolgte wie unter Kapitel 4.2.3.3.1 beschrieben. Dazu wurden je Probe 8 µg der zu spaltenden, genomischen DNA mit 2 µl des jeweiligen Restriktionspuffers und 20 Einheiten Restriktionsenzym versetzt. Die Volumina der Restriktionsansätze wurden mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 20 µl angeglichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Inkubationstemperatur von 37°C stellt das Temperaturoptimum der hier verwendeten Restriktionsenzyme dar. Zum Entfernen von RNA und Proteinen wurden die Restriktionsansätze mit 10 µg RNase bzw. Proteinase K für jeweils 1 h bei 37°C im Inkubationsschrank inkubiert. Es folgte die Inkubation auf Eis bis zur gelelektrophoretischen Auftrennung der gespaltenen DNA-Fragmente.

4.2.3.6.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte mittels 0,8 %-iger Agarosegele in horizontalen Gelkammern. Für die Gele wurden 3,2 g Agarose mit 400 ml 1x TAE aufgekocht. Für ein Gel von 15 cm x 10 cm x 1 cm Größe wurden etwa 130 ml Agarose in 1x TAE benötigt. Nach dem Aushärten der Gele wurden die mit RNase und Proteinase K behandelten Restriktionsansätze mit einem Volumen von 20 µl mit 4 µl DNA-Ladepuffer versetzt und auf die Gele aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 80 V und 208 mA für 2,5 h. Anschließend wurden die Gele für 10 min in einer Ethidiumbromidlösung (1 mg/l Ethidiumbromid in H₂O) inkubiert, zum Entfärben des Gelhintergrunds kurz in H₂O geschwenkt und der Bandenverlauf auf dem UV-Transilluminator mittels der Geldokumentationsanlage dokumentiert. Im Anschluss folgte das Denaturieren und anschließende Neutralisieren der Gele sowie der Southern-Blot.

4.2.3.6.3 Denaturieren und Neutralisieren der DNA-Gele

Die mit Restriktionsenzymen gespaltene und mittels Gelelektrophorese aufgetrennte genomische DNA liegt doppelsträngig vor. Um mit einzelsträngigen, radioaktiv markierten Sonden komplementäre Basensequenzen auf der DNA detektieren zu können, muss die genomische DNA ebenfalls in Form von Einzelsträngen vorliegen. Die Umwandlung von doppelsträngiger DNA in einzelsträngige DNA-Moleküle bezeichnet man als Denaturierung. Dabei wird durch Veränderung der Ionenverhältnisse in der Lösung die Stabilität der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren der DNA beeinträchtigt. Im stark basischen Milieu ist die Affinität der DNA-Doppelstränge sehr gering, die DNA wird singularisiert. Der anschließende Neutralisierungsschritt dient dazu, die Agarosegele aus dem stark basischen Milieu mittels einer Pufferlösung in ein neutrales Milieu zu überführen. Denaturierung und Neutralisierung erfolgen, bevor die DNA an die Nylonmembran gebunden wird.

Das Denaturieren und Neutralisieren der DNA-Gele erfolgte gemäß des Protokolls „Hybridization Techniques“ aus „The DIG System User`s Guide for Filter Hybridization“ (Boehringer).

Alle Inkubationen erfolgten bei Raumtemperatur. Zuerst wurden die Gele in Denaturierungslösung geschwenkt. Nach 15 min wurde die Lösung erneuert und für weitere 15 min inkubiert. Die Gele wurden mit H₂O gespült und für 15 min in Neutralisierungslösung gegeben. Die Neutralisierungslösung wurde erneuert, es folgten weitere 15 min Inkubation. Mittels pH-Teststreifen wurde der pH der Neutralisierungslösung überprüft. Lag der pH-Wert bei pH > 9 wurde für weitere 15 min in frischer Neutralisierungslösung inkubiert. Bei pH ≤ 9 wurde die Neutralisierung abgebrochen. Die Gelränder wurden entfernt und der Southern-Blot durchgeführt.

4.2.3.6.4 Southern Blot (Transfer der DNA auf Nylonmembrane)

Der Transfer der DNA-Fragmente auf die Nylonmembran erfolgte mittels Kapillarblot (siehe Kapitel 4.2.3.5.3).

4.2.4 Transkriptomanalyse mit „ARIZONA whole genome arrays“

Die für die Transkriptomanalysen verwendeten Microarrays stammen von der Abteilung Pflanzenwissenschaften der Universität Arizona, und wurden durch das Spotten des für diesen Zweck von der Firma Operon käuflichen Oligonukleotid-Satzes „Arabidopsis Genome Oligo Set Version 3.0“ auf Glasträger erstellt. Die für die

Hybridisierung dieser Microarrays verwendete RNA wurde zunächst mit dem Kit „Amino Allyl MessageAmp™ II aRNA Amplification Kit“ der Firma Ambion zu aRNA amplifiziert und dabei indirekt fluoreszenzmarkiert.

4.2.4.1 Amplifikation der eingesetzten RNA

Die Amplifikation der RNA wurde mit dem Kit der Firma Ambion im wesentlichen nach Herstellerangaben, jedoch mit kleineren Ansätzen durchgeführt.

2,75µl RNA (454,545 ng/µl) wurden mit 0,25µl T7 Oligo(dT) Primer im PCR-tube für 10 min auf 70°C erhitzt, kurz abzentrifugiert, und auf Eis gestellt. Für die reverse Transkription wurde ein Mastermix (0,5µl 10x First strand buffer; 1µl dNTP mix; 0,25µl RNase Inhibitor; 0,25 µl Arrayscrip Polymerase pro Ansatz) angesetzt, davon jeweils 2µl zu den RNA-Proben geben, durch Pipettieren gemischt und 2h bei 42°C inkubiert.

Für die Zweitstrang Synthese wurde ein Mastermix (15,75µl RNase-freies Wasser; 2,5µl 10x Second strand buffer; 1µl dNTP mix; 0,5 µl DNA Polymerase; 0,25µl RNase H pro Ansatz) angesetzt, davon jeweils 20µl zu den Proben gegeben, durch Pipettieren gemischt und 2h bei 16°C inkubiert.

Die Proben wurden mit 75µl RNase freiem Wasser aufgefüllt, die Aufreinigung der cDNA fand mit den dafür vorgesehenen Säulen nach Herstellerprotokoll statt. Die Elution der cDNA fand mit 2 mal 10µl auf 55°C vorgewärmtem Wasser statt, und die eluierte cDNA wurde in der Vakuumzentrifuge auf ein Volumen von 3,75µl eingengt.

Für die *in vitro* Transkription wurde ein Mastermix (0,75µl Aminoallyl-UTP; 1µl ATP Lösung; 1µl CTP Lösung; 1µl GTP Lösung; 0,5µl UTP Lösung; 1µl 10x reaction buffer; 1µl T7 Enzym Mix pro Ansatz) angesetzt, davon wurden jeweils 6,25µl zu den Proben geben, durch Pipettieren gemischt und 16h bei 37°C inkubiert.

Die Proben wurden mit 90µl RNase-freiem Wasser aufgefüllt und die aRNA wurde mit den dafür vorgesehenen Säulen nach Herstellerprotokoll aufgereinigt. Die Elution der aRNA fand mit 2 mal 50µl auf 60°C vorgewärmtem Wasser statt.

Die Konzentration der eluierten aRNA wurde mit dem Nanodrop gemessen, und die Qualität der aRNA wurde im Bioanalyser getestet.

4.2.4.2 Indirekte Markierung der aRNA

Während der folgenden Arbeitsschritte wurden die Proben vor Licht geschützt, um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu verhindern. Für die indirekte Markierung wurden je 7,5µg der Aminoallyl-aRNA auf ein Volumen von 14µl gebracht und mit 2µl 1M Na₂CO₃ (pH9) und 4µl Cy5 bzw. Cy3 für 1 h im Dunkeln bei Raumtemperatur

inkubiert. Die Kupplungsreaktion wurde dann durch Zugabe von 35µl 100mM Natriumacetat (pH5,2) gestoppt.

Die Proben wurden mit 45µl RNase-freiem Wasser aufgefüllt und die fluoreszenzmarkierte aRNA wurde mit den dafür vorgesehenen Säulen nach Herstellerprotokoll aufgereinigt. Die Elution der fluoreszenzmarkierten aRNA fand mit 2 mal 50µl auf 60°C vorgewärmtem Wasser statt. Anschließend wurde am Nanodrop gemessen wie viel pmol Fluorophore pro µl eingebaut wurden.

Je nach Ausbeute wurden für die Hybridisierung Proben mit 150-300 pmol Fluoreszenzfarbstoff eingesetzt, wobei darauf geachtet wurde, dass von beiden auf einen Array hybridisierte Proben beide gleichviel pmol Fluoreszenzfarbstoff enthielten. Die für einen Array verwendeten Volumen Cy3 und Cy5 markierter aRNA wurden vereinigt, 1µl polyA (20µg/µl) und 1µl tRNA (20µg/µl) zugegeben, und das ganze wurde in einer Vakuumzentrifuge zur Trockne eingengt.

4.2.4.3 Hybridisierung der ARIZONA „whole genome arrays“

Vor der Verwendung wurden die ARIZONA „whole genome arrays“ „hydratisiert“, d.h. sie wurden dreimal kurz über ein 60°C Wasserbad gehalten, so dass ihre Oberfläche leicht beschlug. Dabei laufen die aufgrund von Pufferresten hygroskopischen Spots etwas auseinander, werden dadurch größer und lassen sich später besser auswerten. Anschließend wurden die Oligonukleotide durch Bestrahlung mit 120 Millijoule UV-Licht kovalent an die Oberfläche des Glasträgers gebunden.

Danach wurden die Arrays 4 min mit 0,1% SDS, 3 mal 2 min mit H₂O (demin) und dann 30 sek in 100% Ethanol gewaschen und anschließend durch Abzentrifugieren oder Abpusten getrocknet.

Die Vorhybridisierungslösung bestand aus 300µl 20x SSC, 575µl H₂O, 100µl 10% BSA und 25µl 20% SDS.

Zur Vorhybridisierung wurden 80µl Vorhybridisierungslösung auf ein Deckglas geben, der Array umgedreht an das Deckglas gehalten und mit dem nun durch Adhäsion anhaftenden Deckglas angehoben. Anschließend wurde der Array mit Deckglas in die Hybridisierungskassette geschlossen und 1h bei 42°C inkubiert.

In der Zwischenzeit wurde die getrocknete aRNA in 9µl H₂O resuspendiert und 1µl 10x fragmentation buffer zugegeben. Dann wurde 15 min bei 70°C inkubiert und 1µl fragmentation stop zugegeben.

Zu jeder Probe wurden 56,4µl einer Hybridisierungslösung (350µl Formamid; 210µl 20x SSC; 70µl 50X Denhardts; 17,5µl 20% SDS; 52,5µl H₂O) gegeben, das ganze gevortext, 5 min auf 95°C erhitzt und 5 min bei 10.000 x g abzentrifugiert.

Die vorhybridisierten Glasträger wurden mit H₂O gewaschen, und die in der Hybridisierungslösung aufgenommene aRNA wurde dann zwischen Glasträger und einen darauf platzierten Liftslip laufengelassen. Der Glasträger mit Probe wurde in wasserdichte Hybridisierungsgefäße eingeschlossen und anschließend über Nacht bei

37°C in einem Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Glasträger 5 min bei 37°C mit 0,5x SSC + 1% SDS, 2x 5 min bei RT mit 0,5x SSC + 1% SDS, 4x 5 min bei RT mit 0,5x SSC und 5 min bei RT mit 0,1x SSC gewaschen und anschließend durch Abzentrifugieren oder Abpusten getrocknet.

Das Auslesen der Fluoreszenzsignale sowie die Integration der erhaltenen Datensätze wurde von den Mitarbeitern des Transkriptomanalyselabors der Universität Göttingen übernommen.

4.2.5 Konstruktion von verwendeten Plasmiden

4.2.5.1 Eingangsplasmid

4.2.5.1.1 Klonierung von pENTR207/SCL14

Als Eingangsplasmid für alle in dieser Arbeit beschriebenen Gateway™-Reaktionen wurde pENTR207/SCL14 verwendet. Zur Herstellung dieses Konstrukts wurde die SCL14-cDNA zunächst mit den Primern SCL14 GATE fwd und SCL14 GATE bck aus dem Vektor pGEMT/SCL14 Kpn/Sal (NEU) #14 mit dem PCR-Programm 1 amplifiziert. Anschließend erfolgte eine Gateway™-BP-Reaktion mit dem Vektor pDONR207.

4.2.5.2 Plasmide für die Transformation von *Arabidopsis thaliana*

4.2.5.2.1 Klonierung von pAlligator2/SCL14

Um transgene *Arabidopsis*-Pflanzen zu erzeugen, die SCL14 überexprimieren, wurde ein Konstrukt eingebracht, das die SCL14-cDNA fusioniert an das 3'-Ende des 3x HA-tags unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors enthielt. Zu diesem Zweck wurde SCL14 über eine Gateway™-LR-Reaktion aus dem Vektor pENTR207/SCL14 in den Zielvektor pAlligator2 kloniert, der zuvor mit dem Restriktionsenzym *Mlu*I linearisiert worden war.

4.2.5.2.2 Klonierung von pB2GW7/SCL14

Für die Komplementation der SCL14-knock out (ko)-Pflanzen wurde ein Plasmid verwendet, das die SCL14-cDNA unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors enthielt. Das entsprechende Konstrukt, pB2GW7/SCL14, wurde mit Hilfe einer Gateway™-LR-Reaktion erzeugt. Die SCL14-cDNA entstammte dabei dem Eingangsvektor

pENTR207/SCL14, der für diese Reaktion mit dem Restriktionsenzym *PvuI* linearisiert worden war.

4.2.5.2.3 Klonierung von pFGCA7/SCL14-GR

Um transgene *Arabidopsis*-Pflanzen zu erzeugen, die SCL14 mit einer Glucocorticoidrezeptordomänen (GR)-Fusion überexprimieren, wurde ein Konstrukt eingebracht, das die SCL14-cDNA fusioniert an das 5'-Ende der GR-Domäne unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors enthielt. Zu diesem Zweck wurde zunächst der Vektor pRS020/GR mit den Restriktionsenzymen *Acc65I* und *BamHI* geöffnet. Parallel wurde der SCL14-C-terminus mit den Primern SCL14-C *Acc/Bsp fwd* und SCL-C *BamHI 2 bck* aus dem Plasmid pENTR207/SCL14 amplifiziert. Bei der Amplifikation wurden die Schnittstellen *Acc65I/BspTI* sowie *BamHI* angehängt. Das resultierende Produkt wurde mit den Enzymen *Acc65I* und *BamHI* nachgeschnitten und mit dem geöffneten Vektor pRS020/GR ligiert. Das entstandene Konstrukt pRS020/SCL14-C-terminus-GR wurde mit *Acc65I* und *BspTI* geöffnet und mit dem SCL14-N-terminus, der aus dem Vektor pENTR207/SCL14 mit *Acc65I* und *BspTI* ausgeschnitten wurde, ligiert. Aus dem so hergestellten Vektor pRS020/SCL14-GR wurde anschließend mit *Acc65I* und *XbaI* zunächst der N-Terminus von SCL14 ausgeschnitten und in den Vektor pFGCA7 kloniert. Im Anschluss wurde pRS020/SCL14-GR erneut mit *XbaI* geschnitten, um den C-Terminus von SCL14 mit der GR-Domäne in den Vektor pFGCA7/SCL14-N-Terminus setzen zu können.

4.2.5.3 Plasmide für die transiente Expression von Proteinen in BY-2-Suspensionskulturen

4.2.5.3.1 Klonierung von pHBT/SCL14-sGFP

Das Plasmid pHBT1a-GFP wurde mit den Enzymen *Acc65I* und *BamHI* geschnitten und im Anschluß mit dem SCL14-C-terminus, der mit den Primern SCL-C *Acc/Bsp fwd* und SCL-C *BamHI bck* aus dem Plasmid pENTR207/SCL14 amplifiziert wurde, ligiert. Das resultierende Konstrukt pHBT/SCL14-C-terminus-sGFP wurde mit *Acc65I* und *MunI* geschnitten und mit dem SCL14-N-terminus, der aus dem Plasmid pENTR207/SCL14 durch Restriktion mit *Acc65I* und *MunI* ausgeschnitten wurde, ligiert. Der Übergang zwischen SCL14 und sGFP wurde durch Ansequenzieren mit den Primern sGFPII und SCL~2000bck überprüft.

4.2.5.3.2 Klonierung von pHBT/L/SCL14 ohne GFP

Aus dem Plasmid pHBT-L ohne GFP wurde das *Acc65I/PstI*-Fragment ausgeschnitten und durch den mit *Acc65I/PstI* aus pENTR207/SCL14 ausgeschnittenen SCL14-N-terminus ersetzt. Anschließend wurde das resultierende Konstrukt mit *PstI* geöffnet und der mit *PstI* aus pENTR207/SCL14 ausgeschnittene SCL14-C-terminus eingefügt.

4.2.5.4 Plasmide für die Expression von Proteinen in *E. coli*

4.2.5.4.1 Klonierung von pDEST17/SCL14

Um Extrakte aus *E. coli* zu erhalten, die SCL14-Protein enthalten, wurde ein Konstrukt eingebracht, das die SCL14-cDNA fusioniert an das 3'-Ende eines 6fachen His-tags unter Kontrolle des T7-Promotors enthielt. Zu diesem Zweck erfolgte eine Gateway[™]-LR-Reaktion mit dem mit *NotI* linearisierten Zielplasmid pDEST17 und dem mit *PvuI* linearisierten Eingangsplasmid pENTR207/SCL14. Rekombinante Extrakte aus *E. coli*-Zellen die das resultierende Konstrukt enthielten, dienten als Kontrollen für die Qualität der anti-SCL14-Seren in Western Blot Analysen.

4.3 Biochemische Methoden

4.3.1 Präparation von Proteinextrakten

4.3.1.1 Expression und Aufreinigung von Proteinen aus *E. coli*

Zur Expression der rekombinanten Proteine in *E. coli* wurden die Vektoren pDEST17 und pEGST im Stamm BL21 verwendet. Das zu exprimierende Gen stand in beiden Vektoren unter der Kontrolle des T7 RNA-Polymerase Promotors, dessen Expression durch die Bindung der T7 RNA-Polymerase initiiert wird. Das Gen für die T7 RNA-Polymerase liegt auf der DNA des lysogenen Phagen DE3 in dem Wirtstamm BL21 und steht unter der Kontrolle des IPTG-induzierbaren *lacUV5*-Promotors. Die Expression des rekombinanten Proteins war somit durch IPTG induzierbar.

Das zu exprimierende *SCL14*-Gen wurde so in den multiplen-klonier-Bereich (mcs) des Vektors eingebracht, dass eine Translationsfusion mit dem His-tag[®] in pDEST17 bzw. dem GST-tag in pEGST entstand. Nach der Transformation der Plasmide in den *E. coli* BL21-Stamm wurden die optimalen Expressionsbedingungen für die einzelnen Proteine getestet. Es zeigte sich, dass bei einer Induktion der Expression mit 0,2 mM IPTG und einer Inkubation bei 37°C nach 3 h für pDEST17/SCL14 bzw. einer Induktion der

Expression mit 0,1 mM IPTG und einer Inkubation bei 18°C ü.N. für pEGST/SCL14 die optimale Ausbeute an rekombinatem Protein zu erhalten war.

Die Zellen wurden nach der Expression und Abzentrifugation in 1x PBS (1,4 M NaCl; 27 mM KCl; 100 mM Na₂HPO₄; 18 mM KH₂PO₄) resuspendiert und durch Zugabe von Lysozym und Inkubation bei 30°C lysiert.

200 ml LB-Flüssigmedium mit Ampicillin wurden mit 0,4 ml ü.N.-Kultur des transgenen BL21 DE3-Stammes angeimpft, und die Kultur bei 37°C unter Schütteln (250 rpm) bis zu einer OD₆₀₀ = 0,6 angezogen. Im Anschluss wurde die Kultur in zwei parallele Ansätze aufgeteilt und in einem Ansatz die Expression des Transkriptionsfaktors durch die Zugabe von IPTG induziert. Die Kulturen wurden 3 h bei 37°C unter Schütteln weiter inkubiert und anschließend die OD₆₀₀ bestimmt. Zum Aufschluss der *E. coli* - Zellen wurden 50 ml der Kulturen in der Biofuge bei 5000 rpm für 5 min sedimentiert und das Pellet in 5 ml Lysepuffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0; 300 µl NaCl; 10 mM Imidazol) resuspendiert. Der Aufbruch der Zellen erfolgte durch dreimaliges Einfrieren und Wiederauftauen des Extraktes. Gegebenenfalls lassen sich die Zellen zusätzlich durch eine Ultraschallbehandlung für 30 sek lysieren. Der Proteingehalt wurde mittels der Bradford-Proteinbestimmung ermittelt und auf einem Coomassie gefärbten SDS-Gel überprüft. Für kleine Volumina lässt sich diese Methode auch im Batch-Verfahren durchführen.

4.3.1.2 Elektroelution von Proteinen

Zur Herstellung des polyklonalen Antikörpers wurden 2 mg rekombinantes SCL14-Protein hergestellt und über ein SDS-Gel aufgereinigt. Die durch eine 250 mM KCl-Färbung sichtbar gemachte Bande mit dem rekombinanten Protein wurde aus dem SDS-PAA-Gel (Kapitel 4.3.1.7) ausgeschnitten und mittels Elektroelution (modifiziert nach HARRINGTON, 1990) in einer Elektroelutionsapparatur des Typs Elutrap (Nachbau Schleicher und Schuell) mit Elutionspuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,025 % SDS) bei 100 V 20 h eluiert. Die Menge des eluierten Proteins konnte im Vergleich zum BSA-Standard abgeglichen werden. Das Eluat wurde nach Einengen mit Centricon-30-Röhrchen direkt für die Immunisierung der Kaninchen verwendet.

4.3.1.3 Denaturierte Gesamtzellextrakte aus Hefe

Um Proteine aus Hefezellen zu gewinnen, wurden nach PRINTEN und SPRAGUE (1994) vorgegangen. Mit den Zellen einer 5 ml Übernachtskultur in Selektionsmedium wurde eine 50 ml YPDA-Kultur angeimpft. Diese wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 unter Schütteln inkubiert. Die Kultur wurde zur Hälfte in einen mit Eis gefüllten Zentrifugenbecher gegossen und 5 min bei 1000 g zentrifugiert. Nachdem das Zellpellet mit 50 ml H₂O gewaschen und mit flüssigem Stickstoff übergossen wurde konnte es

nun eingefroren und bei -70°C gelagert oder sofort weiterverarbeitet werden. Zum Aufschluss der Zellen wurden sie in $400\ \mu\text{l}$, auf 60°C vorgewärmtem, Aufschlusspuffer (8 M Harnstoff; 5 % (w/v) SDS; 40 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1 mM EDTA; 0,4 mg/ml Bromphenolblau; 1 % (v/v) β -Mercaptoethanol; 875 $\mu\text{g/ml}$ PMSF; 100 μl Proteinase-Inhibitor Cocktailmix) suspendiert und nach Zugabe von 300 mg Glasperlen erfolgte eine Inkubation bei 70°C für 10 min. Anschließend erfolgte das Aufbrechen der Zellen durch Schütteln auf dem Vortex-Mischer für 1 min. Nach Zentrifugation (5 min, 14000 rpm, 4°C) wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Das Pellet wurde bei 100°C im Wasserbad für 5 min aufgekocht. Nach Schütteln auf dem Vortex-Mischer für 1 min und Zentrifugation (5 min, 14000 rpm, 4°C) wurde der zweite Überstand mit dem ersten Überstand vereinigt. Der flüssige Überstand konnte nach Erwärmen auf 65°C für 10 min zur gelelektrophoretischen Analyse verwendet werden.

4.3.1.4 Denaturierte Gesamtzellextrakte aus *Arabidopsis thaliana*

Um denaturierte Gesamtzellextrakte für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zu erhalten, wurden die zu analysierenden Blätter unter flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver gemörsert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Das Material wurde mit der dreifachen Menge ($\text{mg} = \mu\text{l}$) Extraktionspuffer (4 M Harnstoff; 16,6 % (v/v) Glycerin; 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol; 5 % (w/v) SDS; 0,5 % (w/v) Bromphenolblau) gründlich gemischt und für 10 min bei 65°C unter Schütteln inkubiert. Die Abtrennung unlöslicher Zellbestandteile erfolgte durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für 20 min bei RT in einer Tischzentrifuge. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C gelagert. Eine Proteinbestimmung konnte aufgrund der Zusammensetzung des Extraktionspuffers nicht vorgenommen werden. Die Abschätzung relativer Proteinmengen in verschiedenen Ansätzen erfolgte über die densitometrische Auswertung eines mit Coomassie Brilliant Blue G-250 gefärbten SDS-Polyacrylamidgels (siehe Kapitel 4.3.1.7). Für dieses Abgleichgel wurden jeweils 10-25 μl der Proteinpräparation elektrophoretisch aufgetrennt.

4.3.1.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach BRADFORD (1976) beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie Brilliant Blue G-250 (von 465 nm zu 595 nm) nach Bindung an ein Protein. Eine adäquate Menge des Proteinextraktes wurde in die Vertiefung („well“) einer 96-„well“- Mikrotiterplatte vorgelegt und mit 200 μl verdünntem (1:5 mit H_2O) Bradford-Reagenz (Roth) vermischt. Nach 5-minütiger Inkubation konnte die optische Dichte bei 595 nm im Spektralphotometer (MRX Dynex Plate Reader) bestimmt werden. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer mit BSA-Standards (1 μg , 3 μg , 6 μg) erstellten Eichgerade ermittelt.

4.3.1.6 Reporterassays

4.3.1.6.1 GUS-Färbung

Promotoren werden durch transkriptionale Fusionen mit Reportergenen untersucht. Eines der Reportergene ist das *uidA*-Gen aus *E.coli*, welches das β -Glucuronidase (GUS)-Enzym kodiert (JEFFERSON, 1987). Die GUS-Aktivität kann durch Färbung mit dem chromogenen X-Gluc nachgewiesen werden. Dieses Substrat kann in das Pflanzengewebe hineindiffundieren, das aktive Enzym spaltet den Glucuronsäure-Rest ab, und nach Oxidation durch das im Färbepuffer enthaltene $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ entsteht ein blauer Indolfarbstoff, der ausfällt. Höhere $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ – Konzentrationen führen zu einem schnelleren Ausfällen des Indolfarbstoffes und damit zu präziser abgegrenzten Färbungen, hemmen aber die Enzymaktivität, sodass die Intensität der Färbung abnimmt.

Das frische Pflanzenmaterial wurde in 1,5 ml eiskaltes 90 %iges Aceton gegeben. Die Lagerung erfolgte bis zum Ende des Probensammelns auf Eis. Nach 20 min Inkubation bei RT wurde das Aceton entfernt und dreimal mit GUS-Färbepuffer (50 mM Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4 (pH7,2); 0,2 % Triton X-100; 0,5 mM $K_3Fe(CN)_6$; 0,5 mM $K_4Fe(CN)_6$) gewaschen. Anschließend wurde die Färbelösung (2 mM X-Gluc; 50 mM Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4 (pH7,2); 0,2 % Triton X-100; 0,5 mM $K_3Fe(CN)_6$; 0,5 mM $K_4Fe(CN)_6$) zugegeben, 15-20 min im Vakuum infiltriert und ü.N. bei 37°C inkubiert. Das Entfernen der Färbelösung erfolgte durch Zugabe von 20 %, 35 % und 50 % Ethanol bei RT. Die Aufbewahrung erfolgte in 70 % Ethanol bei 4°C.

4.3.1.6.2 Bestimmung der β -Glucuronidase (GUS)-Aktivität in Extrakten aus BY-2-Suspensionskulturen oder *Arabidopsis thaliana*

Für eine quantitative Bestimmung der β -Glucuronidase (GUS)-Aktivität wurden fluorometrische GUS-Assays durchgeführt. Als Substrat diente Methylumbelliferyl- β D-Glucuronid (MUG), welches durch das Enzym zu fluoreszierendem Methylumbelliferon (MU) umgesetzt wird.

50 μ g einer geeigneten Verdünnung des Gesamtzellextrakts (siehe Kapitel 4.3.1.4) in GUS-Ex-Puffer (50 mM Na-Phosphat- Puffer (pH 7,5); 10 mM EDTA; 0,1 % (v/v) Triton X-100; 0,1 % (v/v) Sarkosyl; frisch dazu: 0,05 % (v/v) β -Mercaptoethanol) wurden mit 100 μ l 4 mM MUG (40 mM MUG-Stocklösung in DMF, 1:10 verdünnt in GUS-Ex-Puffer) in einer „96-well“-Mikrotiterplatte versetzt und bei 37°C inkubiert. Nach 15 min („Anlaufzeit“ der Reaktion) wurde die Hälfte des Ansatzes (T1) in ein anderes „well“ umpipettiert und mit 100 μ l GUS-Stoppuffer (0,2 M Na_2CO_3) versetzt. Nach weiterer Inkubation der Mikrotiterplatte bei 37°C für einen exakt definierten Zeitraum (in der Regel 60 min) wurde die Reaktion in der anderen Hälfte des Ansatzes (T2) durch Zugabe von 100 μ l GUS-Stoppuffer beendet. Die Quantifizierung der Fluoreszenz erfolgte im CytoFluorII Plate Reader von PerSeptive (Excitation durch 360 ± 40 nm Wellenlänge; Emissionsmessung bei 460 ± 40 nm). Als Standard wurden

50 pmol MU (200 μ l von 250 nM MU in GUS-Stoppuffer) in ein „well“ der gleichen Titerplatte pipettiert.

Die GUS-Aktivität wurde nach folgender Formel berechnet:

$$A_{\text{GUS}} = \frac{\Delta F \times 50 \text{ pmol MU}}{\text{min} \times \text{mg Protein} \times F_{50 \text{ pmol MU}}}$$

A_{GUS} = GUS-Aktivität (pmol MU min⁻¹ mg⁻¹ Protein)

ΔF = Differenz der Fluoreszenz von T2 und T1

min = zeitliche Differenz zwischen den Reaktionsstopps von T2 und T1

4.3.1.6.3 Bestimmung der β -Galactosidase (β -Gal)-Aktivität in Hefeextrakten (oNPG-Assay)

Die Quantifizierung der β -Galactosidase (β -Gal)-Aktivität in Hefe-Flüssigkulturen erfolgte über spektrometrische oNPG-Assays. Das farblose Substrat oNPG (o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid) wird durch die β -Galactosidase zum gelben o-Nitrophenol umgesetzt. 2 ml einer Hefe-Übernachtskultur wurden für 1 min bei 13000 rpm abzentrifugiert (Biofuge pico). Das sedimentierte Zellpellet wurde nach Abnahme des Überstandes in 665 μ l H-Puffer (100 mM HEPES/KOH, pH 7,0; 150 mM NaCl; 2 mM MgCl₂; 1 % (w/v) BSA) resuspendiert und im Anschluß an die Zugabe von 55 μ l Chloroform und 55 μ l 0,1 % (w/v) SDS eine Minute lang stark gemischt (Aufbrechen der Zellen). Nach dem Zufügen von 125 μ l oNPG-Lösung (4 mg/ml in H-Puffer) erfolgte die Enzymreaktion während der Inkubation des Ansatzes bei 37°C. Die Reaktion wurde nach angemessener Zeit (meist 0,5-2 h, je nach Stärke der β -Gal-Aktivität) durch 400 μ l 1 M Na₂CO₃ abgestoppt und bei 13000 rpm für 5 min zentrifugiert (Biofuge pico). Die Quantifizierung der Gelbfärbung im Überstand erfolgte mit dem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 420 nm. Die OD₄₂₀ diente als Grundlage zur Berechnung der β -Gal-Einheiten im Ansatz. In diese Berechnung ging auch die Anzahl der im Test eingesetzten Hefezellen ein. Als Maß dafür wurde vor der Aufarbeitung der Zellen die OD₆₀₀ der Übernachtskultur bestimmt.

Die β -Gal-Einheiten wurden nach folgender Formel berechnet:

$$\beta\text{-Gal-Einheiten} = \frac{1000 \times \text{OD}_{420}}{V \times T \times \text{OD}_{600}}$$

V = eingesetztes Kulturvolumen in ml (hier 2 ml)

T = Reaktionszeit in min

4.3.1.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch die diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat (SDS)–Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) werden Proteine in ihrer denaturierten Form der Größe nach durch die Polyacrylamidgel-Matrix nach Anlegen eines elektrischen Feldes aufgetrennt (modifiziert nach LAEMMLI, 1970). Für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird das AGS-Gelsystem eingesetzt. Die Porengröße der Polyacrylamid-Matrix kann durch das Verhältnis der Acrylamid-Konzentration zur Konzentration des Quervernetzlers N,N-methylenbisacrylsäureamid bestimmt werden. Die radikalische Polymerisation erfolgte nach Zugabe von Ammoniumperoxosulfat (APS) und wurde durch N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) katalysiert. Für die optimale Auftrennung der nachzuweisenden Proteine mit einer Größe von ca. 80 - 100 kDa wurde ein 8%iges Trenngel (8 % (w / v) N,N'-Methylenbisacrylamid (19:1); 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,1 % (w / v) SDS; 0,1 % (v / v) TEMED; 0,06 % (w / v) APS) verwendet. Nach dem Gießen des Trenngels wurde zur Oberflächenglättung mit Isopropanol überschichtet. Zur gleichmäßigen Auftrennung der Proteine wurde, nach Abgießen des Überstandes auf dem Trenngel, ein Sammelgel (5 % (w / v) N,N'-Methylenbisacrylamid (19:1); 125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 0,1 % (w/v) SDS; 0,2 % (v / v) TEMED; 0,1 % (w / v) APS) mit den Probeauftragstaschen gegossen. Vor der Elektrophorese wurden die Proteinextrakte mit SDS-Probenpuffer (4 x : 80 mM Tris pH 6,8; 10 % (v / v) Glycerin; 2 % (w / v) SDS; 20 % (v / v) β -Mercaptoethanol; 0,005 % (w/v) BPB) versetzt, 10 min bei 65°C denaturiert und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in Laufpuffer (125 mM Tris; 1,25 M Glycin; 0,5 % (w / v) SDS) bei 120 V bis die BPB-Bande das untere Ende des Gels erreicht hat. Zur Bestimmung der Molekulargewichte wurde auf jedes Gel ein Proteingrößenstandard (Prestained Protein Ladder, MBI Fermentas) mitaufgetrennt.

4.3.1.8 Coomassie-Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen

Um Proteinbanden in SDS-PAGE-Gelen sichtbar zu machen, wurden diese mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 angefärbt. Hierfür wurde das Gel in der Färbelösung (0,006 % (w / v) Coomassie Brilliant Blue G-250; 10 % (v / v) Essigsäure) für mehrere Stunden inkubiert. Die Entfärbung des Gels erfolgte in dem Entfärbegrad (10 % (v / v) Essigsäure) unter wiederholtem Wechsel der Lösung für mehrere Stunden. Optional kann der Vorgang durch kurzes Erwärmen in der Mikrowelle beschleunigt werden.

4.3.1.9 Immuno-Blotting (Western-Blot-Analyse)

Als Immunoblotting bezeichnet man generell immunologische Techniken, bei denen man auf Membranen transferierte, immobilisierte Proteine mit geeigneten Antikörpern reagieren lässt. Beim Western-Blot werden die Proteine zuvor in einer SDS-DISKPAGE aufgetrennt und aus dem Trenngel auf einem geeigneten Trägerfilter, z. B. PVDF oder Nitrocellulose, übertragen. Für die Western-Blot-Analyse wurden 10-25 µl Hefeproteinextrakte (siehe Kapitel 4.3.1.3) oder 10-25 µl denaturierte Gesamtzellextrakte aus Pflanzen (siehe Kapitel 4.3.1.4) verwendet.

4.3.1.9.1 Semi-Dry Proteinblot

Proteine wurden aus SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAA-Gel) mit der „Semi-Dry-Blotting“-Methode (modifiziert nach KYSE und ANDERSON, 1984) im elektrischen Feld zwischen zwei Graphitplatten auf PVDF-Membranen übertragen. Die Auswahl der Transferbedingungen orientierte sich an den Angaben von DUNBAR (1994).

Das SDS-Gel wurde nach Abschluss der Elektrophorese kurz in Kathodenpuffer (25 mM Tris; 40 mM 6-aminohexansäure; 20 % (v/v) Methanol, pH 9,4) und die zugeschnittene PVDF-Membran nach Aktivierung in Methanol in Anodenpuffer II (25 mM Tris; 20 % Methanol, pH 10,4) äquilibriert. In der Elektroblobtapparatur folgte auf zwei Lagen mit Anodenpuffer I (0,3 M Tris; 20 % Methanol, pH 10,4) getränktem Filterpapier eine Lage mit Anodenpuffer II getränktem Filterpapier. Auf diese Lagen wurde die äquilibrierte PVDF-Membran gelegt, gefolgt vom Gel und drei Lagen mit in Kathodenpuffer getränktem Filterpapier. Bei Gelen der Dicke 0,8 mm-1 mm erfolgte der Transfer bei einer Stromstärke von 1 mA/cm² über einen Zeitraum von einer Stunde. Die Membran wurde entsprechend der Empfehlung des Herstellers in Methanol gewaschen und anschließend für die Lagerung getrocknet.

4.3.1.9.2 Immunologische Detektion geblotteter Proteine

Bei dieser indirekten Nachweismethode wurden die Membranen nach Absättigung unspezifischer Bindestellen („Blocken“ durch Magermilchpulver) zunächst mit dem spezifischen Primärantikörper aus Kaninchen inkubiert. Gebundene Primärantikörper wurden nachfolgend von einem an Peroxidase gekoppelten anti-Kaninchen-Sekundärantikörper aus Esel (anti rabbit Ig von Amersham) erkannt. Die Detektion erfolgte über Chemilumineszenz nach Umsetzung eines entsprechenden Substrates durch gekoppelte Peroxidase. Für diesen Nachweis wurde der ECL+-Kit der Firma Amersham den Herstellerangaben entsprechend verwendet. Die Exposition der Röntgenfilme (Cronex 10T) betrug 30 sek bis 10 min, abhängig von den jeweiligen Signalstärken. Alle Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur unter Schütteln durchgeführt. Die Membran wurde zuvor in Methanol aktiviert und in 1 x PBS-T (1,4 M NaCl; 27 mM KCl; 100 mM Na₂HPO₄; 18 mM KH₂PO₄, pH 7,3 mit 0,1 % (v/v) Tween-20) äquilibriert.

Blocken:	1 h in 1 x PBS-T mit 5 % (w/v) Magermilchpulver
Waschen:	2 x 5 min in 1 x PBS-T mit 1 % (w/v) Magermilchpulver
Primärantikörper:	2 h in 1 x PBS-T mit 1 % (w/v) Magermilchpulver, αSCL14-Serum (1:2000)
Waschen:	2 x 5 min in 1 x PBS-T mit 1 % (w/v) Magermilchpulver, 2 x 5 min in 1 x PBS-T
Sekundärantikörper:	1 h in 1 x PBS-T, anti rabbit Ig (1:10000)
Waschen:	5 x 5 min in 1 x PBS-T

4.3.1.9.3 Rehybridisierung

Um eine Membran, mit der bereits eine Western-Blot-Analyse durchgeführt worden ist, mit einem weiteren Primärantikörper zu inkubieren, müssen die gebundenen Antikörper zunächst entfernt werden („Strippen“). Dazu wurde die Membran mit Methanol aktiviert und in 1 x PBS-T (1,4 M NaCl; 27 mM KCl; 100 mM Na₂HPO₄; 18 mM KH₂PO₄, pH 7,3 mit 0,1 % (v/v) Tween-20) äquilibriert. Anschließend wurde die Membran zweimal für jeweils 30 min schüttelnd in Strippingpuffer (62,5 mM Tris/HCl pH 6,8; 2 % SDS; 0,7 % β-Mercaptoethanol) bei 50 °C inkubiert und anschließend in 1 x PBS-T geschwenkt. Die gestrippte Membran konnte nun erneut hybridisiert werden.

4.4 Verwendete Computerprogramme

- Die Analyse der Mikroarray-Ergebnisse wurde mit dem Programm „Genevestigator“ der ETH Zürich durchgeführt. (<http://www.genevestigator.ethz.ch/>)
- Die Vektorkarten und Alignments wurden mit dem Programm „Vector NTI 6“ der Firma InforMax,Inc. erstellt.

5 Ergebnisse

5.1 Analyse der Interaktion von SCL14 und TGA2 im Hefe- Ein- und Zweihybridsystem

Bereits in meiner Diplomarbeit wurde Scarecrow-like 14 (SCL14) als Interaktionspartner des Transkriptionsfaktors TGA2 in einem modifizierten Hefe-Einhybridsystem isoliert (SIEMSEN, 2002). TGA2 kann in diesem System an ein dreifach wiederholtes *as-1*-Element binden. Die Interaktion mit dem unfusionierten SCL14-Protein führt dann zu einer Aktivierung des verwendeten Reportergens unter der Kontrolle dieser *as-1*-Elemente. In der vorliegenden Arbeit wurde das Aktivierungspotential von SCL14 quantitativ mit *lacZ* als Reportergen überprüft. Dieses kodiert für die β -Galaktosidase, deren Enzymaktivität im oNPG-Test gemessen werden kann. Die zu testenden Proteine wurden über die entsprechenden Konstrukte in dem Hefestamm YTSZ1 koexprimiert (SIEMSEN, 2002). Jeweils vier Transformanden wurden subkultiviert, um die Aktivität der β -Galaktosidase zu testen. Die in ihnen gemessenen Aktivitäten wurden schließlich gemittelt.

Dabei zeigte sich, dass die Interaktion von TGA2 bzw. TGA6 und SCL14 eine erhöhte *lacZ*-Expression vermittelt (Abbildung 5.1). Die Fusion von SCL14 mit der GAL4-Aktivierungsdomäne (AD-SCL14) führt bei gleichzeitiger Expression mit TGA2 zu einer weiteren Steigerung der β -Galaktosidase-Aktivität. NPR1, ein bekannter Interaktionspartner von TGA2 (THUROW, 2001), bewirkt als GAL4-AD-Fusionsprotein gemeinsam mit TGA2 eine etwas geringere Aktivierung der Genexpression. Zusätzlich konnte mit einer GAL4-AD-SCL14-Fusion gezeigt werden, dass SCL14 nicht an das *as-1*-Element binden kann.

Als Nachweis, dass die fehlende Transkriptionsaktivierung durch TGA2 nicht auf einer schwachen Expression des Proteins oder mangelhafter DNA-Bindung beruht, sondern wahrscheinlich am Fehlen einer Aktivierungsdomäne liegt, wurde ein Plasmid in den Stamm YTSZ1 transformiert, das für ein Fusionsprotein aus der GAL4-AD und TGA2 kodiert (Abbildung 5.1).

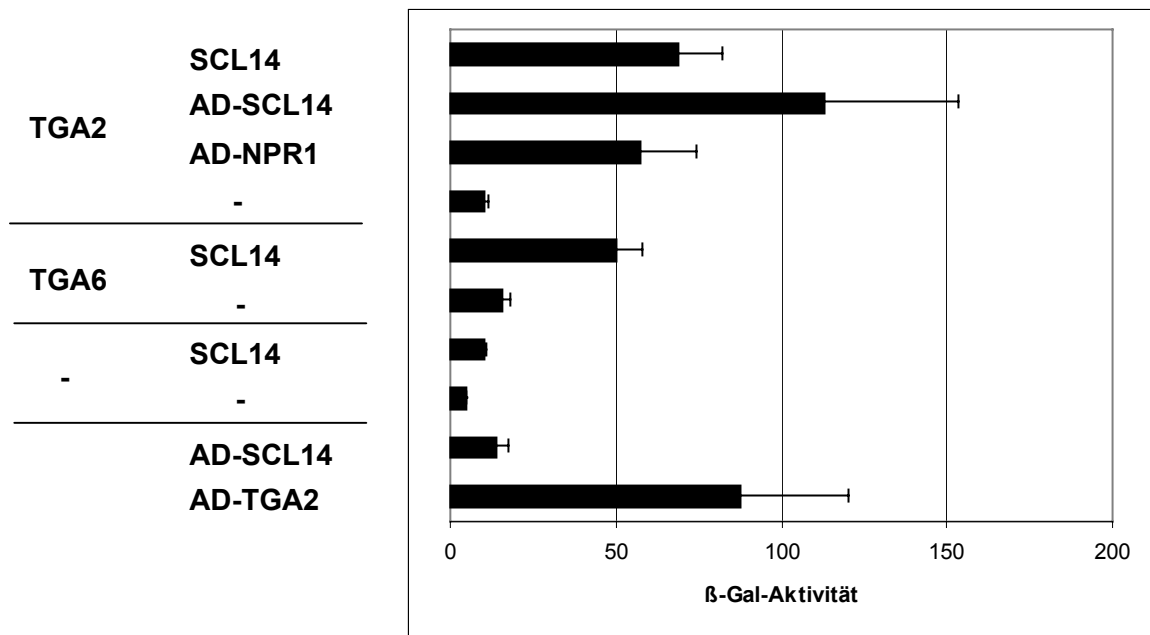


Abbildung 5.1: Hefe-Einhybridsystem in dem Stamm YTSZ1. Dargestellt ist die *lacZ*-Reporteraktivität in relativen β -Galaktosidase-Einheiten. Der Stamm YTSZ1 exprimierte die auf der linken Seite genannten Proteine. TGA2: unfusioniertes TGA2-Protein, TGA6: unfusioniertes TGA6-Protein, SCL14: unfusioniertes SCL14-Protein, AD-SCL14: Fusionsprotein aus der GAL4-AD und SCL14, AD-NPR1: Fusionsprotein aus der GAL4-AD und NPR1, AD-TGA2: Fusionsprotein aus der GAL4-AD und TGA2, -: Vektor ohne Insert

Im Anschluss wurde die Interaktion zwischen den TGA-Faktoren und SCL14 im Hefe-Zweihybridsystem überprüft. Das Hefe-Zweihybridsystem (FIELDS & SONG, 1989) basiert auf der modularen Struktur des Transkriptionsfaktors GAL4, der in zwei funktionelle Einheiten unterteilt werden kann: die DNA-Bindedomäne (BD) und die Transkriptions-Aktivierungsdomäne (AD). Im Falle einer Interaktion zwischen einem an die AD-fusionierten Protein und einem an die BD-fusionierten Protein, kommen AD und BD in räumliche Nähe zueinander und der Transkriptionsfaktor wird rekonstruiert. Über einen GAL4-abhängigen Promotor kann der so rekonstruierte Transkriptionsfaktor ein Reporter gen aktivieren, das im Hefegenom integriert ist. Die zu testenden Fusionsproteine wurden über die entsprechenden Konstrukte in dem Stamm PJ69-4a koexprimiert. Jeweils vier Transformanten wurden subkultiviert, um die Aktivität des Reportergens zu testen. Die in ihnen gemessenen Aktivitäten wurden schließlich gemittelt.

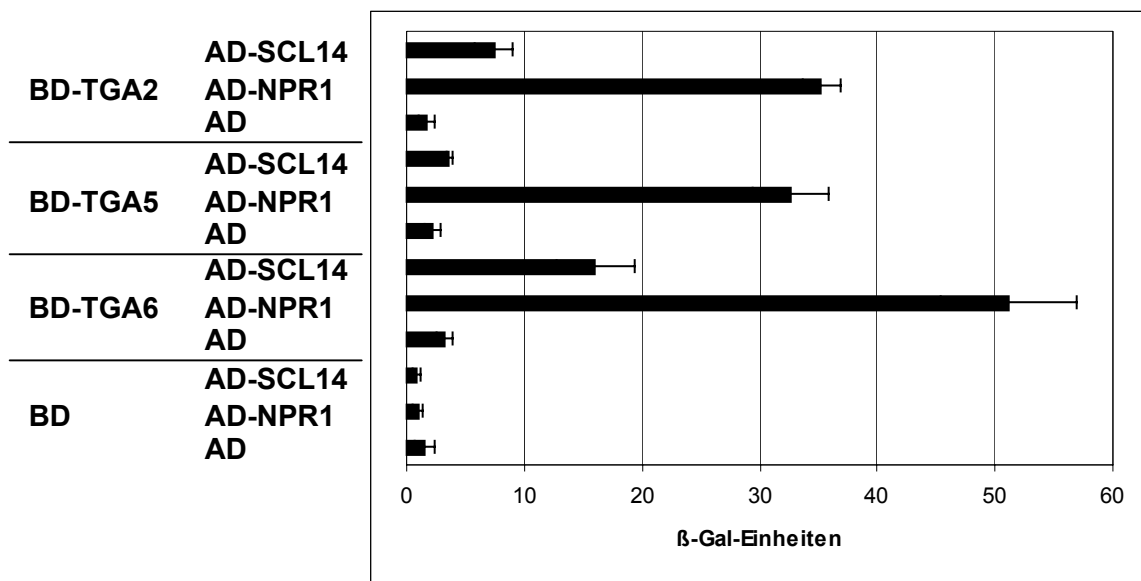


Abbildung 5.2: Hefe Zweihybridsystem in dem Stamm PJ69-4a. Dargestellt ist die *lacZ*-Reportergenaktivität in relativen β -Galaktosidase-Einheiten. Der Stamm PJ69-4a exprimierte die auf der linken Seite genannten Proteine. BD-TGA2: Fusionsprotein aus der GAL4-BD und TGA2, BD-TGA5: Fusionsprotein aus der GAL4-BD und TGA5, BD-TGA6: Fusionsprotein aus der GAL4-BD und TGA6, AD-SCL14: Fusionsprotein aus der GAL4-AD und SCL14, AD-NPR1: Fusionsprotein aus der GAL4-AD und NPR1, BD: GAL4-BD, AD: GAL4-AD.

Das Fusionsprotein BD-TGA2 bewirkte erwartungsgemäß nur eine schwache Transkriptionsaktivierung, sodass die ermittelte β -Galaktosidase-Aktivität in den entsprechenden Transformanten wenig über der Hintergrundaktivität von Hefezellen lag, die die GAL4-BD alleine mit den verschiedenen AD-Fusionsproteinen exprimierten. Die Interaktion der Fusionsproteine BD-TGA2 und AD-SCL14 vermittelte eine erhöhte *lacZ*-Expression (Abbildung 5.2). Im Vergleich zur Reportergenaktivität in Anwesenheit von BD-TGA2 und AD-NPR1 lag die Stärke der *lacZ*-Expression aber deutlich niedriger. NPR1 scheint daher im Hefe-Zweihybridsystem ein stärkerer Interaktionspartner von TGA2 zu sein. Die Transkriptionsfaktoren TGA5 und TGA6, die sehr nah mit TGA2 verwandt sind, verhielten sich als Fusionsproteine in Anwesenheit von AD-SCL14 bzw. AD-NPR1 ähnlich wie TGA2. Dabei ist zu berücksichtigen, dass BD-TGA6 alleine bereits ein leichtes Aktivierungspotential aufwies, welches zu einer gesteigerten Aktivität des Reportergens führte. Alle in Anwesenheit von BD-TGA6 gemessenen Aktivitäten lagen über den Werten, die mit BD-TGA2 bzw. BD-TGA5 gemessen wurden. Dies könnte daran liegen, dass *TGA6* möglicherweise stärker exprimiert wurde. Die Interaktion

zwischen SCL14 und TGA5 ist nur schwach, und könnte auf eine geringere Affinität zurückzuführen sein.

5.2 Interaktionsstudien zwischen TGA2 und verwandten Scarecrow-like Proteinen

Um zu klären, ob die Interaktion zwischen SCL14 und TGA2 spezifisch ist, oder ob auch andere verwandte Proteine der *GRAS*-Genfamilie mit TGA2 interagieren können, wurde eine Auswahl dieser Proteine, die von S. Kushnir in dem Plasmid pDEST22 zur Verfügung gestellt wurden, mit TGA2 im Zweihybrid-System getestet. Für diesen Test wurde TGA2 als GAL4-Bindedomänenfusion in dem Plasmid pDEST32 in den Hefestamm PJ69-4a gemeinsam mit den in Tabelle 5.1 aufgeführten GAL4-Aktivierungsdomänenfusionsgenen transformiert. Die Selektion erfolgte auf SD-Medium ohne Leucin, ohne Tryptophan und ohne Histidin. In dieser Plasmidkombination wurde die SCL14-TGA2-Interaktion als spezifisch eingestuft (Tabelle 5.1).

Tabelle 5.1: Analyse einer möglichen Interaktion zwischen TGA2, TGA5 bzw. TGA6 und Proteinen der *GRAS*-Genfamilie. In der linken Spalte ist jeweils die Accession-Nummer der getesteten Gene angegeben. In der mittleren Spalte ist der Name des jeweiligen Gens bzw. des nächst-verwandten Gens aufgeführt und in den rechten Spalten sind die Ergebnisse des Hefe-Zweihybridsystem-Plattentests auf SD-Medium ohne Leucin, ohne Tryptophan und ohne Histidin angegeben. - : kein Wachstum, + : Wachstum

Accession Nr.	Name	Interaktion mit TGA2	Interaktion mit TGA6	Interaktion mit TGA5
At4g08250	Scarecrow transcription factor family protein	---	---	---
At5g48150	PAT1 (BOLLE, 2000)	---	---	---
At4g17230	SCL13	---	---	---
At1g55580	Scarecrow transcription factor family protein contains Pfam profile, SCL13-ähnlich	---	---	---
At2g04890	SCL21	---	---	---
At3g49950	Scarecrow transcription factor family lateral suppressor protein, SHR-ähnlich	---	---	---
At4g00150	SCL6	---	---	---
At5g59450	SCL11	---	---	---
At4g23440	Hypothetical protein	---	---	---
At3g03450	RGA1 like protein	---	---	---
At1g66350	RGL1	---	---	---
At2g37650	SCL9	---	---	---
At3g50650	SCL7	---	---	---
At1g07530	SCL14	++	++	++
At1g21450	SCL1	---	---	---
At2g45160	Scarecrow transcription factor family protein, SCL6-ähnlich	---	---	---
At2g29060	Scarecrow transcription factor family protein	---	---	---
At5g66770	Scarecrow transcription factor family protein	---	---	---
At5g17490	RGA-like protein	---	---	---
At5g41920	Scarecrow transcription factor family protein	---	---	---
At3g13840	Scarecrow transcription factor family protein	---	---	---

Um diese Spezifität auch gegenüber den SCL14-nächstverwandten Proteinen, SCL26 und SCL27, zu überprüfen, wurden SCL14, SCL26, SCL27 sowie SCL9 und WRKY54 als negative Kontrollen in das Plasmid pDEST-GAD umkloniert, welches ebenfalls eine Aktivierungsdomäne enthält (Abbildung 5.3). Zusätzlich sind die Proteine mit einem HA-tag versehen, um die Expression in einer Western Blot Analyse überprüfen zu können. TGA2 wurde in diesem Fall von dem Plasmid pGBT9/TGA2 als GAL4-Bindedomänenfusion kodiert. Der Zweihybrid-System-Test erfolgte erneut in dem Hefestamm PJ69-4a.

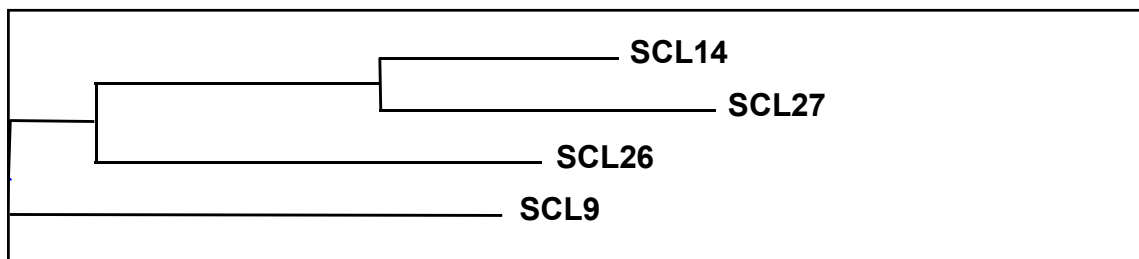


Abbildung 5.3: Darstellung der Verwandtschaft der Gene *SCL14*, *SCL26* und *SCL27* sowie *SCL9*.

Jeweils vier unabhängige Klone wurden in einem oNPG-Assay untersucht, und die gemessenen Mittelwerte in einem Diagramm aufgetragen (Abbildung 5.4). TGA2 führte alleine bereits zu einer zweifachen Steigerung der β -Galaktosidase-Aktivität. In Anwesenheit von SCL14 konnte die Aktivität noch um einen Faktor 3,4 gesteigert werden. Die beiden nah-verwandten Proteine SCL26 und SCL27 führten im Vergleich zur Aktivität in alleiniger Anwesenheit von TGA2 nur zu einer geringfügigen 1,6-fachen Steigerung. SCL9 sowie WRKY54, die entfernter bzw. nicht mit SCL14 verwandt sind, zeigten in Anwesenheit von TGA2 gegenüber Hefezellen, die nur mit TGA2 transformiert worden waren, eine 1,2- bzw. 1,4-fach höhere Aktivität. Insgesamt liegen die Aktivitäten, die in Anwesenheit von TGA2 und SCL9, SCL26, SCL27 bzw. WRKY54 gemessen wurden, in einem ähnlichen Bereich. Nur die Interaktion zwischen SCL14 und TGA2 führte zu einer deutlichen Erhöhung der β -Galaktosidase-Aktivität. Somit konnte die Spezifität der Interaktion von SCL14 und TGA2 bestätigt werden.

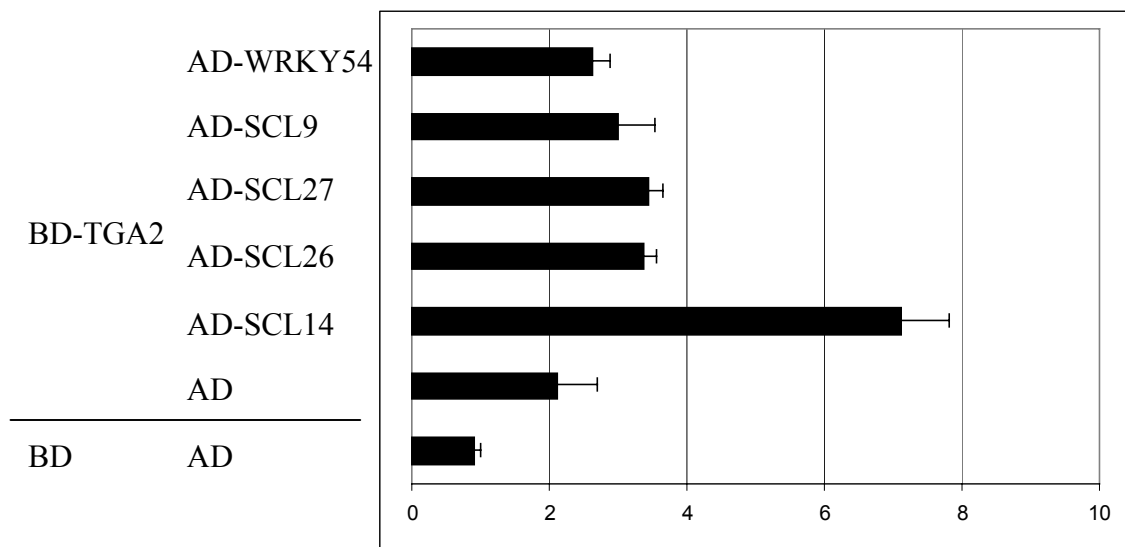


Abbildung 5.4: Hefe Zweihybridsystem in dem Stamm PJ69-4a. Dargestellt ist die *lacZ*-Reporteraktivität in β -Galaktosidase-Einheiten. Der Stamm PJ69-4a wurde mit den verschiedenen auf der linken Seite genannten Konstrukten transformiert. BD-TGA2: Fusionsprotein aus der GAL4-BD und TGA2, AD-SCL14: Fusionsprotein aus der GAL4-AD und SCL14, AD-SCL26: Fusionsprotein aus der GAL4-AD und SCL26, AD-SCL27: Fusionsprotein aus der GAL4-AD und SCL27, AD-SCL9: Fusionsprotein aus der GAL4-AD und SCL9, AD-WRKY54: Fusionsprotein aus der GAL4-AD und WRKY54, BD: GAL4-BD, AD: GAL4-AD.

Zum Beweis der tatsächlichen Expression von SCL26 und SCL27 wurde eine Western Blot Analyse mit einem polyklonalen anti-HA-Antikörper durchgeführt (Abbildung 5.5). Die Ausgangslinie wurde als negative Kontrolle aufgetragen und zeigte, da kein HA-tag vorhanden war, kein Signal. SCL14 liegt in der Überexpressionslinie #5 als HA-Fusionskonstrukt vor und nimmt daher eine Größe von ca. 91 kDa ein. Alle Proteine, die aus der Hefe extrahiert wurden, waren mit einer GAL4-AD und einem HA-tag fusioniert. GAL4-AD-HA-SCL14 konnte mit einer Größe von ca. 105 kDa detektiert werden. Das Fusionsprotein von SCL26 war erwartungsgemäß ca. 100 kDa groß. Allerdings konnte SCL27 ebenfalls nur in einer Größe von ca. 100 kDa detektiert werden, obwohl eine Größe von ca. 170 kDa erwartet worden wäre. Eine Ansequenzierung des verwendeten Plasmids mit den Primern pGADL1 und pGADL2 ergab, dass nur der N-terminale Teil des Gens von 1-2090 bp transformiert worden waren. Das erhaltene Ergebnis sollte daher unbedingt noch einmal mit einem Vollängen-Konstrukt überprüft werden.

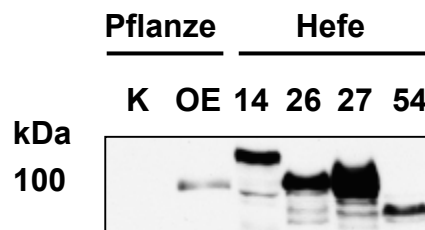


Abbildung 5.5: Western Blot Analyse. Aufgetragen wurden denaturierte Harnstoff-Gesamtproteinextrakte aus *Arabidopsis thaliana* Blättern der Ausgangslinie *as-1::GUS* (K) und der Überexpressionslinie SCL14-OE #5 (OE) sowie denaturierte Harnstoff-Gesamtproteinextrakte aus Hefezellen des Stammes PJ69-4a, die SCL14 (14), SCL26 (26), SCL27 (27) oder WRKY54 (54) exprimierten. Von den Pflanzenextrakten wurden jeweils 10 μ l und von den Hefeextrakten wurden jeweils 25 μ l in einem 8%igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt. Zur Detektion wurde ein polyklonaler HA-Antikörper verwendet.

Vergleicht man die Aminosäuresequenzen der drei nah-verwandten Proteine SCL14, SCL26 und SCL27 miteinander, fällt auf, dass der C-terminale Teil erwartungsgemäß hoch konserviert ist. Im N-terminalen Teil gibt es mehrere Bereiche, die nur SCL14 enthält (Abbildung 5.6A und B). Ein Ansatz für weitere Untersuchungen ist nun, diese Bereiche durch Deletionsanalysen als mögliche Interaktionsdomänen zu identifizieren. Benjamin Fode hat bereits zeigen können, dass sich der für eine Interaktion zwischen SCL14 und TGA2 benötigte Bereich zwischen den Aminosäuren 160 und 380 befindet. Weitere Interaktionsstudien sind in Planung.

A

```

SCL14 (1) MGSYPDGFPGSMDELD FNKDFDLP P SSNQTLGLANG FYLDDLD FSSLD P
SCL26 (1) ---MESNYS GVVNGY D V S F L P T S I P D L G F G V P S S S D F D L R - M D Q Y Y H Q P S
Consensus (1) F G M D P L A F L L D P

SCL14 (51) EAY P S Q N N N N N I N N K A V A G D L L S S S D D A D F S D S V L K Y I S Q V L M E E D M E
SCL26 (47) I W V P D Q D H H - - - - - - - - - - - - - - - F S P P A D E I D S E N T L L K Y V N Q L L M E E S L A
Consensus (51) P Q S A D D D S L L K Y I Q L L M E E L

SCL14 (101) E K P C M F H D A L A L Q A A E K S L Y E A L G E K Y P S S S S A S S V D H P E R L A S D S P D G S
SCL26 (84) E K Q S I F Y D S L A L R Q T E M L Q Q V I S D S Q T Q S S I P N - - - N S I T T S S S S N S G D
Consensus (101) E K I F H D A L A L E L I D S S A S S G

SCL14 (151) C S G G A F S D Y A S T T T T T S S D S H W S V D G L E N R P S W L H T P M P S N F V F Q S T S R S S
SCL26 (131) Y S N S S N S S V R I E N E V L F D N K H L G D S G V V S F P - - - - - - - - - - - - - - - G S
Consensus (151) S A S H G L P S

SCL14 (201) N S V T G G G G G N S A V Y G S G F G D D L V S N M F K D D E L A M Q F K K G V E E A S K F L P K
SCL26 (164) N M L R G G - - - - - E Q F G Q P A N E I I L V R S M F S D A E S V L Q F K R G L E E A S K F L E N
Consensus (201) N L G G F G D L V M F D E L Q F K K G L E E A S K F L P

SCL14 (251) S S Q L F I D V D S Y I P M N S G S K E N G S E V F V K T E K K D E T E H H H H S Y A P P P N R L
SCL26 (208) T D Q W I F N L E P E M E R V V P V K V E E G - - - - - W S A I S K T R K N H H E - - - - -
Consensus (251) S Q L D I K T H H

SCL14 (301) T G K K S H W R D E D E D F V E E R S - - N K Q S A V Y V E E S E L S E M F D K I L V C G P G K P V
SCL26 (244) - - - - - R E E E D D L E E A R R R S K Q F A V N E E D G K L T E M F D K V L L L D G E C D P
Consensus (301) R D E D E D L E E K Q A V E D L S E M F D K I L L

SCL14 (349) C I L N Q N F P T E S A K V V T A Q S N G A K I R G K K S T S T S H S N D S K K E T
SCL26 (287) Q I I E D G E N G S S K A L V K K G - - - - - R A K K K S R A - - - - -
Consensus (351) I I S L V R A K K S

```

B

```

SCL14 (1) MGSYPDGFPGSMDELDFNKDFDLPPSSNQTGLANGFYLD---LDFSSL
SCL27 (1) MGSYSAGFPGSLDWFDFP-----GLGNGSYLNDQPLLDIGSV
Consensus (1) MGSY GFPGSLD DF GLANG YL D LD SL

SCL14 (48) DPEEAYPSQNNNNININNKAVAGDLLSSSDADDFSDSVLKYSISQVLMEE
SCL27 (38) PPLDPYPQ---QN-----LASADDFSDSVLKYSISQVLMEE
Consensus (51) PP Q NN AS DADDFSDSVLKYSISQVLMEE

SCL14 (98) DMEKPCMFHDALALQAAEKSLYEALGEKYPSSSSASSVDHPERLASDSP
SCL27 (72) DMEDKPCMFHDALSLQAAEKSLYEALGEKYPVDDSDQPLTTTTSLAQLVS
Consensus (101) DMEDKPCMFHDALALQAAEKSLYEALGEKYP S L LA

SCL14 (148) DGSCSGGAFSDYASTTTTTSSDSHWSVDGLEN-RPS-WLHTPMPSNFVFO
SCL27 (122) SPGGS-----YASTTTTTSSDSQWSFDCLENNRPSWLQTPIPSNFIFQ
Consensus (151) S YASTTTTTSSDS WS D LEN RPS WL TPIPSNFIFQ

SCL14 (196) STSRNSVTGGGGGNSAVYGSFGDGLVSNMFKDDELAMQFKKGVEEAS
SCL27 (167) STSTR--ASSG-----NAVFGSSFGDLVSNMFDLALQFKKGMEEAS
Consensus (201) STS S G AVFGS F DLVSNMF D DLALQFKKGMEEAS

SCL14 (246) KFLPKSSQLFIDVDSYIPMNSGSKENGSEVFKTEKKDETEHHHHHSYAP
SCL27 (210) KFLPKSSQLVID-----NS-----VFP
Consensus (251) KFLPKSSQL ID NS P

SCL14 (296) PPNRLTGKKSHWRDEDFVEERSNKQSAVYVEES-ELSEMFDKILVCGP
SCL27 (226) --NRLTGKKSHWR-EEHLTEERSKQSAIYVDETDLTDMPDNILIFGE
Consensus (301) NRLTGKKSHWR EDE EERS KQSAIYVDES ELSDMFD ILI G

SCL14 (345) GK--PVCILNQNFPTESAKVVTAQSNGAKIRGKSTSTSHSNDKSKET
SCL27 (273) AKEQPVCILNESFPKPAKASTFSKS---PKGEK--PEASGNSYTKET
Consensus (351) AK PVCILN FP E AK T KG K A N KET

```

Abbildung 5.6: A: Alignment der N-terminalen Bereiche von SCL14 und SCL26. B: Alignment der N-terminalen Bereiche von SCL14 und SCL27. Rote Buchstaben kennzeichnen eine Aminosäuresequenzübereinstimmung zwischen den verglichenen Proteinen. Ähnliche Aminosäuren sind durch schwarze Buchstaben dargestellt, die mit grauer Farbe unterlegt sind.

5.3 Pull-down-Analyse von SCL14 und TGA2

Die Interaktion zwischen SCL14 und TGA2 konnte im Rahmen eines Praktikums von Ulrike Sühthoff auch in Pull-down-Analysen gezeigt werden. Dazu wurde SCL14 mit einem GST-tag und TGA2 mit einem HIS-tag fusioniert getrennt voneinander in *E.coli* exprimiert. Danach wurde das GST-SCL14-Protein an Glutathion-Sepharose 4B gebunden. Im Anschluss erfolgte die Zugabe des rekombinanten HIS-TGA2-Extrakts. Als Kontrolle wurde unabhängig ein rekombinanter GST *E.coli*-Extrakt auf einen anderen Glutathion-Sepharose 4B-Ansatz gegeben, der ebenfalls GST-SCL14 gebunden hatte. Nach Waschen der Sepharose-Ansätze wurden die resultierenden Eluate in einem

SDS-PAA-Gel aufgetrennt. Die Detektion der aufgereinigten Proteine sowie der Rohextrakte erfolgte in einer Western Blot Analyse mit einem anti-His-Antikörper (Abbildung 5.7). Parallel erfolgte eine Anfärbung der Proteine im SDS-PAA-Gel mit Coomassie.

In dem Eluat der Sepharose, die mit SCL14 und TGA2 inkubiert wurde (+), ließ sich ein deutliches HIS-TGA2-Signal detektieren. Das Eluat der Kontrolle (-) zeigte hingegen kein Signal. Die Interaktion von SCL14 und TGA2 konnte somit *in vitro* nachgewiesen werden.

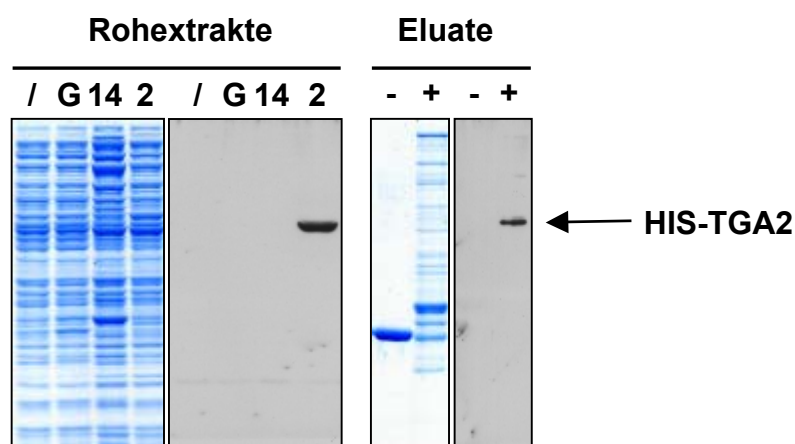


Abbildung 5.7: Pull down Analyse von SCL14 und TGA2. GST-SCL14 und 6xHis-TGA2 sowie ein unfusioniertes GST-tag wurden getrennt in *E.coli* exprimiert. Zunächst wurden die rekombinanten Extrakte mit GST-SCL14 bzw. GST auf zwei verschiedene Glutathion-Sepharose 4B-Ansätze gegeben. Dann erfolgte die Zugabe des rekombinanten Extrakts, der 6xHis-TGA2 enthielt. Die Eluate wurden in einem SDS-PAA-Gel aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt oder mit einem anti-His-Antikörper in einer Western Blot Analyse detektiert. Als Kontrolle wurde ein rekombinanter *E.coli*-Extrakt, der nur das GST-tag exprimiert, auf die Glutathion-Sepharose 4B gegeben. Auf der linken Seite ist die Auftrennung der Rohextrakte nach Coomassie-Färbung sowie in einer Western Blot Analyse mit einem anti-His-Antikörper dargestellt. Auf der rechten Seite wurden die Eluate entsprechend aufgetrennt. /: nicht induzierter *E.coli*-Rohextrakt; G: rekombinanter GST-Rohextrakt; 14: rekombinanter SCL14-Rohextrakt; 2: rekombinanter TGA2-Rohextrakt; -: Eluate der Glutathion-Sepharose 4B nach Zugabe von GST und 6xHis-TGA2; +: Eluate der Glutathion-Sepharose 4B nach Zugabe von GST-SCL14 und 6x His-TGA2

5.4 Transiente Analysen der *as-1*-Aktivität in BY-2-Protoplasten

Im Hefesystem konnte gezeigt werden, dass SCL14 und TGA2 miteinander interagieren können und dass diese Interaktion zur Aktivierung einer Reporterexpression unter der Kontrolle des *as-1*-Elements führt. Nun sollte die Aktivierungseigenschaft von

SCL14 *in planta* untersucht werden. Als Reporterplasmid wurde pTTL-GUS/*as-1* verwendet, das für ein *GUS*-Reporter gen unter der Kontrolle eines *as-1*-Elements in Kombination mit einem Minimalpromotor kodiert. Die Effektorplasmide exprimierten die jeweiligen Proteine unter der Kontrolle des *HBT*-Promotors, der ein Derivat des CaMV 35S-Promotors darstellt und eine starke Expression des Transgens in Pflanzenzellen vermittelt. Als Kontrolle für die Hintergrundaktivität des *as-1*-Elements diente die Transfektion mit pHBT-GBD, der neben der GAL4-BD kein weiteres Insert trägt. Es wurden jeweils zwei parallele Transfektionsansätze in einem MUG-Assay untersucht. Die erhaltenen Werte wurden auf die Aktivität in der Kontrolle bezogen, welche gleich 1 gesetzt wurde. Es ergab sich daraus für jeden Ansatz eine x-fache Steigerung der *GUS*-Aktivität gegenüber der Kontrolle.

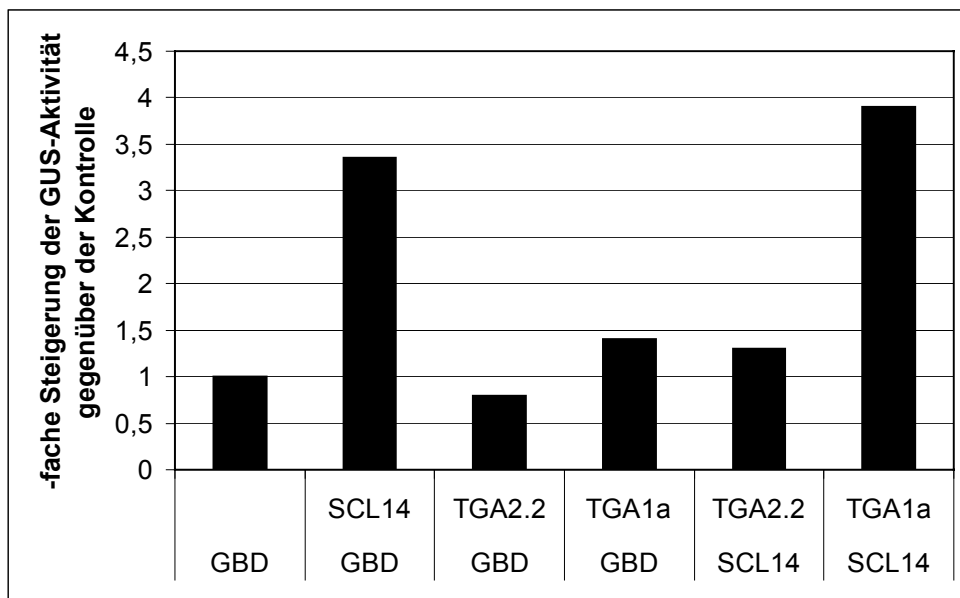


Abbildung 5.8: Einfluss von transient exprimierten SCL14- bzw. TGA-Proteinen auf die basale *as-1* abhängige Reporterexpression in BY-2-Protoplasten. Die Protoplasten wurden jeweils mit 5 µg des Reporterplasmids TTL-GUS/*as-1* und insgesamt 30 µg pro Ansatz der Effektorplasmide pHBT-GBD, pHBT/SCL14, pHBT/TGA2.2 bzw. pHBT/TGA1a, die für die angegebenen Proteine kodieren, cotransfiziert. Für die gleichzeitige Expression von zwei Effektorplasmiden wurden jeweils 15 µg der entsprechenden Plasmide eingesetzt. Nach 20-stündiger Inkubation der Protoplasten erfolgte die Analyse der Reporterexpression über die Bestimmung der *GUS*-Aktivitäten im MUG-Assay. Die Balken geben das Verhältnis der *GUS*-Aktivität bei Expression der jeweiligen Proteine gegenüber der *GUS*-Aktivität in Gegenwart des Kontrollplasmids pHBT-GBD an. Dazu wurde die *GUS*-Aktivität in dem Kontrolltransfektionsansatz mit dem Vektor pHBT-GBD gleich 1 gesetzt. Die Werte der anderen Ansätze wurden dazu ins Verhältnis gesetzt. Das Ergebnis wurde in zwei parallelen Ansätzen erhalten.

Die Transfektion mit SCL14 führte zu einer 3- bis 4-fachen Steigerung der relativen *GUS*-Aktivität (Abbildung 5.8). Der Tabak-Transkriptionsfaktor TGA2.2, der zu

TGA2 aus *Arabidopsis thaliana* ortholog ist, zeigte eine leicht-reduzierte GUS-Aktivität, die auf einer natürlichen Schwankung der Hintergrundaktivität beruhen könnte. Die Transfektion mit TGA1a aus Tabak führte hingegen zu einer leicht-gesteigerten Aktivität und bestätigte somit die Daten von Corinna THUROW (2001). Bei gemeinsamer Expression von SCL14 und TGA2.2, die im Hefesystem ebenfalls interagieren können (Daten nicht gezeigt), konnte nur eine leichte Steigerung der GUS-Aktivität um das 1,3-fache beobachtet werden. Allerdings führte gleichzeitige Expression von SCL14 und TGA1a zu einer deutlichen GUS-Aktivitätssteigerung um das 3,9-fache. Da bisher noch nicht getestet wurde, ob TGA1a und SCL14 interagieren können, könnte diese Steigerung auf einem additiven Effekt beruhen.

Mit dem Versuch konnte gezeigt werden, dass die Expression von SCL14 in Gegenwart des *as-1*-Elements auch *in vivo* zu einer Steigerung der basalen Reportergenaktivität führt.

In einer weiteren Analyse wurde das SCL14-Aktivierungspotential bei direkter DNA-Bindung untersucht (Abbildung 5.9). SCL14 wurde dafür als GAL4-Bindedomänenfusionsprotein transient in Tabak BY-2-Protoplasten exprimiert. Als Reportergen diente *GUS* unter der Kontrolle des *GAL4*-Promotors. HBT-GBD wurde transfiziert, um die Hintergrundaktivität des Konstrukts zu bestimmen. Das Konstrukt HBT-Nco-GUS diente als Kontrolle für eine starke, konstitutive *GUS*-Aktivität.

Bei direkter Bindung an die DNA kann SCL14 die Reportergenaktivität gegenüber der HBT-GBD-Kontrolle nur 1,8-fach erhöhen. Der Unterschied zwischen einer 3- bis 4-fachen Steigerung der *GAL4::GUS*-Aktivität im Vergleich zu einer 1,8-fachen Steigerung der *as-1::GUS*-Aktivität bei direkter DNA-Bindung, deutet darauf hin, dass das Aktivierungspotential vermutlich über die Interaktion mit TGA-Faktoren begünstigt wird.

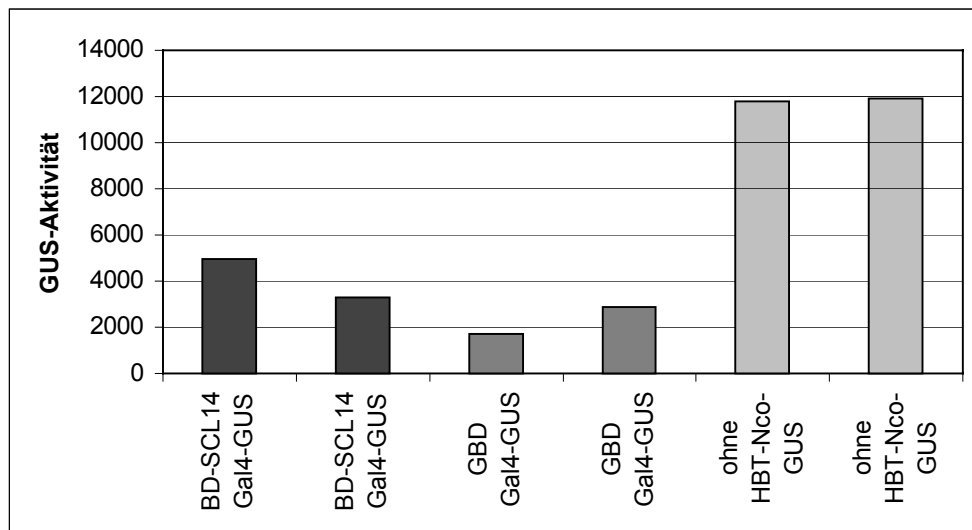


Abbildung 5.9: Analyse des Aktivierungspotentials von SCL14 mit Hilfe einer GAL4-Bindedomänenfusion in BY-2-Protoplasten. Die Protoplasten wurden jeweils mit 5 µg des Reporterplasmids GAL4-GUS und 25 µg der Effektorplasmide pHBT-BDGW/SCL14 bzw. pHBT/GBD, cotransfiziert. Als positive Kontrolle diente das Plamid HBT-Nco-GUS, von dem 10 µg in die Protoplasten transfiziert wurden. Nach 20-stündiger Inkubation der Protoplasten erfolgte die Analyse der Reporterexpression über die Bestimmung der *GUS*-Aktivitäten im MUG-Assay. Die Balken geben die gemessene *GUS*-Aktivität bei Expression der jeweiligen Proteine an. Das Ergebnis wurde in zwei parallelen Ansätzen erhalten.

5.5 Analysen der subzellulären Lokalisation in transient transformierten BY-2-Protoplasten

5.5.1 Subzelluläre Lokalisierung von SCL14 und TGA2

Nach Untersuchung der *in vivo* Interaktion von SCL14 und Transkriptionsfaktoren der TGA-Familie wurde die subzelluläre Lokalisation von SCL14 und TGA2.2 in der Zelle untersucht. Dazu wurden BY-2-Protoplasten mit Plasmiden transfiziert, die für die Vollängen-cDNA von SCL14 bzw. TGA2 fusioniert an das 5'-Ende des „Green Fluorescent Protein“ (sGFP) unter der Kontrolle des HBT-Promotors kodieren. Bestrahlt man die entsprechend transfizierten Protoplasten mit blauem Licht, so wird das Fusionsprotein durch Fluoreszenz sichtbar. Durch Vergleich des Fluoreszenz-Bildes mit dem Lichtbild, können die einzelnen Kompartimente der Zelle unterschieden werden. Als Negativkontrolle wurde das Plamid pHBTL verwendet, welches das unfusionierte GFP enthält (Abbildung 5.10A). In den so transfizierten Zellen konnte

eine Fluoreszenz sowohl im Cytosol als auch im Kern detektiert werden. Das TGA2.2-sGFP-Fusionsprotein ließ sich nur im Kern nachweisen. Zellen, die SCL14-sGFP exprimierten, zeigten hingegen im Zellkern und im Cytosol Fluoreszenz. Diese Beobachtung korreliert zum einen mit den Ergebnissen von THOMAS MERKLE (unveröffentlicht), der SCL14 als Interaktionspartner des Kern-Exportrezeptors XPO1 identifiziert hat und ließ sich zum anderen auch in Zwiebelzellen nach Beschuss mit dem gleichen Konstrukt bestätigen (Daten nicht gezeigt).

Allerdings bleibt die Frage offen, ob ein Induktor nötig ist, um den Transport von SCL14 in den Zellkern oder aus dem Kern heraus, zu stimulieren. Analysen bei denen entweder die bekannten Induktoren des *as-1*-Elements SA (100 μ M) oder 2,4-D (25 μ M), ein synthetisches Auxin, verwendet oder die Protoplasten mit 100 mM NaCl inkubiert wurden, zeigten keine Veränderung in der subzellulären Lokalisation von SCL14 (Daten nicht gezeigt).

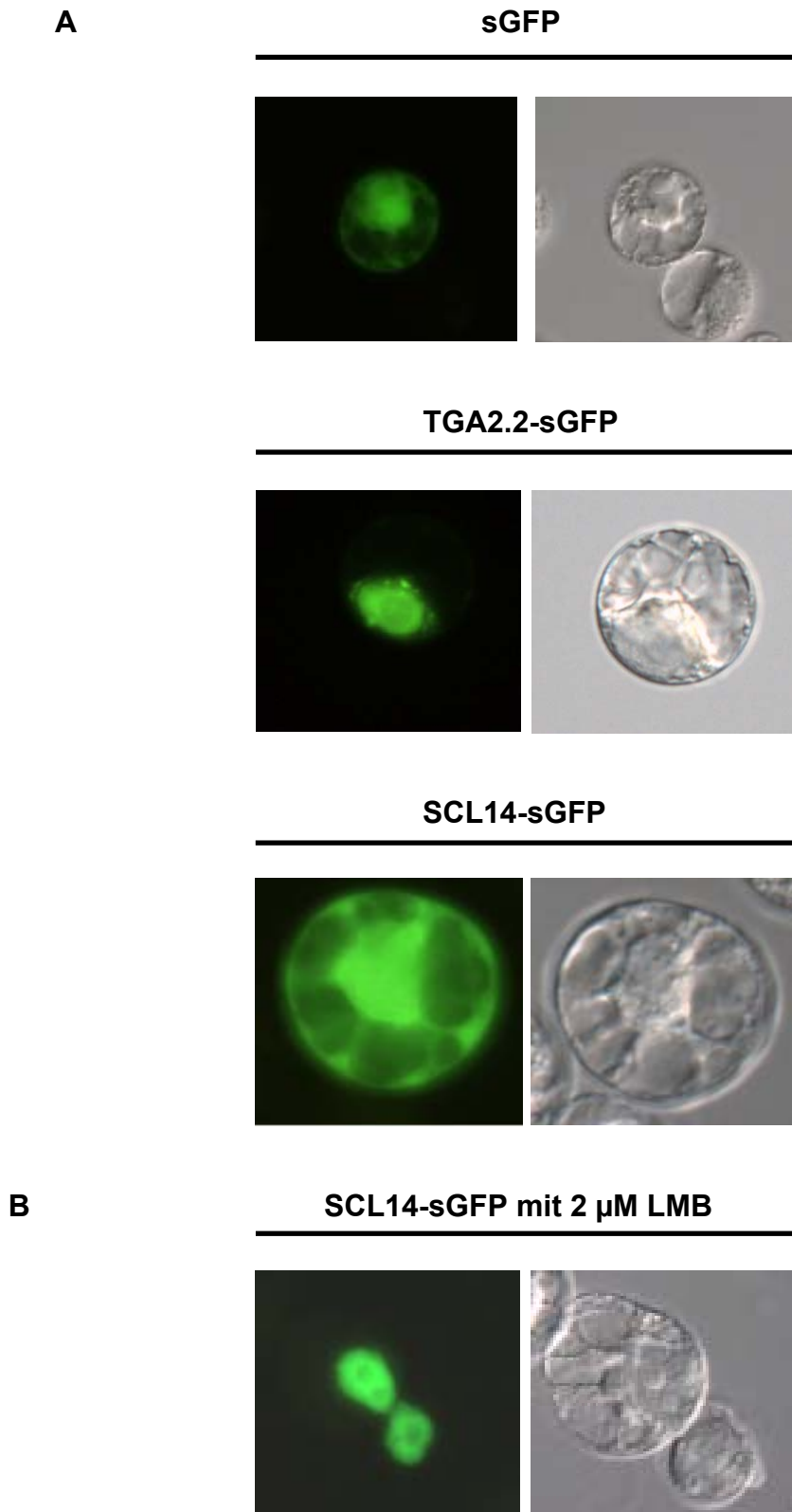


Abbildung 5.10: Subzelluläre Lokalisation von sGFP-Fusionsproteinen. **A:** Darstellung der Protoplasten nach der Transfektion mit pHBTLSCL14-sGFP, pHBTLTGA2.2-sGFP und pHBTL. Es wurden jeweils 30 μ g Plasmid transfiziert. **C:** Mit pHBTLSCL14-sGFP transfizierte Protoplasten nach 4-stündiger Inkubation mit 2 μ M LMB.

5.5.2 Subzelluläre Lokalisierung von SCL14 nach Inhibierung des Kernexports durch LMB

Um eine Beteiligung des Kernexports an der Lokalisierung von SCL14 untersuchen zu können, wurde der Kernexport durch Leptomycin B (LMB) inhibiert. Dabei handelt es sich um eine Chemikalie, die durch kovalente Modifikation eines Cystein-Restes im zentralen konservierten Bereich von Exportrezeptoren, u.a. des Exportrezeptors XPO1, deren Exportaktivität inhibiert (FUKUDA *et al.*, 1997; KUDO *et al.*, 1999; WOLFF *et al.*, 1997; TUNAC *et al.*, 1997). Da LMB nicht spezifisch den mit SCL14-interagierenden Kernexportrezeptor XPO1 inhibiert, sondern eine große Anzahl weiterer Rezeptoren beeinflusst, musste zunächst ausgeschlossen werden, dass die Verwendung von LMB toxisch wirkt.

In Abbildung 5.10B ist eine Protoplastenzelle nach 4-stündiger Inkubation mit LMB dargestellt. Es zeigte sich, dass die Zelle im Lichtbild ihre übliche Form beibehalten hat, und dass der Export von SCL14 auf diesem Weg vollständig unterdrückt werden konnte. Allerdings hatte diese Inhibierung keinen Einfluss auf die Aktivität des *as-1*-Elements im MUG-Assay (Daten nicht gezeigt).

Weitere Untersuchungen mit LMB erfolgten in *Arabidopsis* Keimlingen (siehe Kapitel 5.9.2).

5.6 Herstellung und Charakterisierung eines SCL14-Antiserums

Um das endogene SCL14-Protein untersuchen zu können ist es notwendig, ein gut funktionierendes Antiserum zu Verfügung zu haben. Für die Herstellung wurde SCL14 zunächst als Fusionsprotein mit einem GST-tag in dem Plasmid pEGST/SCL14 in *E.coli* rekombinant exprimiert. Da sich das Fusionsprotein nach der Aufreinigung aus den Zellen im Pellet befand, wurden die Extrakte in einem 0,8%igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt. Nach Färbung der Proteine mit 250 mM KCl-Lösung, anschließendem Entfärben mit H₂O und ausschneiden aus dem Gel wurde das Fusionsprotein durch Elektroelution aus dem SDS-PAA-Gel aufgereinigt. Im Anschluss wurde das Protein mit Hilfe eines Centricon Röhrchens auf 1 mg/ml eingeeengt. Das so erhaltene Antigen wurde von der Firma Eurogentec verwendet, um zwei bereits vorgetestete Kaninchen

(SA2495 bzw. SA2496) zu immunisieren. Nach 8 Wochen konnte das „final bleeding“ als Serum in einer Western Blot Analyse getestet werden. Dazu wurde das Antigen, welches zuvor mit dem anti-GST-Antikörper getestet worden waren, aufgetrennt und mit den erhaltenen Antiseren detektiert (Daten nicht gezeigt). Beide Seren erkennen SCL14 und zeigten auf derselben Höhe nur sehr geringen Hintergrund. Für die folgenden Studien wurde das Serum SA2495 verwendet.

5.7 Überexpression von Scarecrow-like 14 (SCL14) in *Arabidopsis thaliana*

5.7.1 Konstitutive Überexpression von SCL14 in transgenen *Arabidopsis thaliana* Pflanzen

Zur Analyse der Funktion von SCL14 in *Arabidopsis*-Pflanzen ist es interessant zu untersuchen, was bewirkt wird, wenn das Gen konstitutiv und ektopisch überexprimiert wird. Es wurden transgene Pflanzen hergestellt, die das für SCL14-kodierende Gen (ohne die 5'- bzw. 3'-untranslatierten Bereiche) unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors exprimieren. Um transgene Pflanzen zu erzeugen, wurde der Agrobakterienvermittelte Gentransfer benutzt. Dazu wurden Blütenstände von 6 Wochen alten Pflanzen mittels der „Floral-dip“-Methode (siehe Kapitel 4.2.3.4.8) mit Agrobakterien infiziert, die das Plasmid pAlligator2/SCL14 trugen. Die Transformation erfolgte parallel in Wildtyp Columbia (Col-0) sowie in die von REDMAN *et al.* (2002) beschriebene Linie *as-1::GUS*, welches das Reportergen *GUS* unter der Kontrolle des auf -90 bp verkürzten CaMV 35S-Promotors enthält. Die Anwesenheit des Reporters soll helfen, den Einfluss von SCL14 auf die Aktivität des *as-1*-Elements zu untersuchen. Eine schematische Darstellung des für die Transformation der Pflanzen verwendeten DNA-Konstrukts ist in Abbildung 5.11A gezeigt. Der transformierte Vektor trägt als Selektionsmarker das *GFP*-Gen unter der Kontrolle des Samen-spezifischen Promotors *At2S3*. Die Selektion positiver Pflanzenlinien erfolgte durch Vorselektion von F₀-Samen, die nach Bestrahlung mit blauem Licht fluoreszierten. Im Anschluss wurde die Expressionstärke des Transgens im Westernblot mit dem anti-SCL14-Serum getestet. Allerdings konnten zunächst keine SCL14-überexprimierenden

Pflanzenlinien identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Im folgenden wurde daher die Expressionshöhe verschiedener nicht-vorsortierter Linien in Northern Blot Analysen untersucht (Abbildung 5.11B). Es gelang, zwei Linien (SCL14-OE #5 und SCL14-OE #6) im *as-1::GUS*-Hintergrund zu detektieren, die SCL14 etwa zweifach überexprimieren. Beide Linien konnten in der F3-Generation durch Untersuchung von jeweils 18 Nachkommen im Western Blot als wahrscheinlich homozygot eingestuft werden. In diesen Linien konnte sowohl das endogene als auch das transgene Protein mittels Western Blot Analyse detektiert werden (Abbildung 5.11C). Dazu wurde ein im Rahmen dieser Arbeit hergestelltes anti-SCL14-Serum verwendet (siehe Kapitel 5.6). Beide Linien zeigen keine deutlich sichtbare Veränderung des Phänotyps.

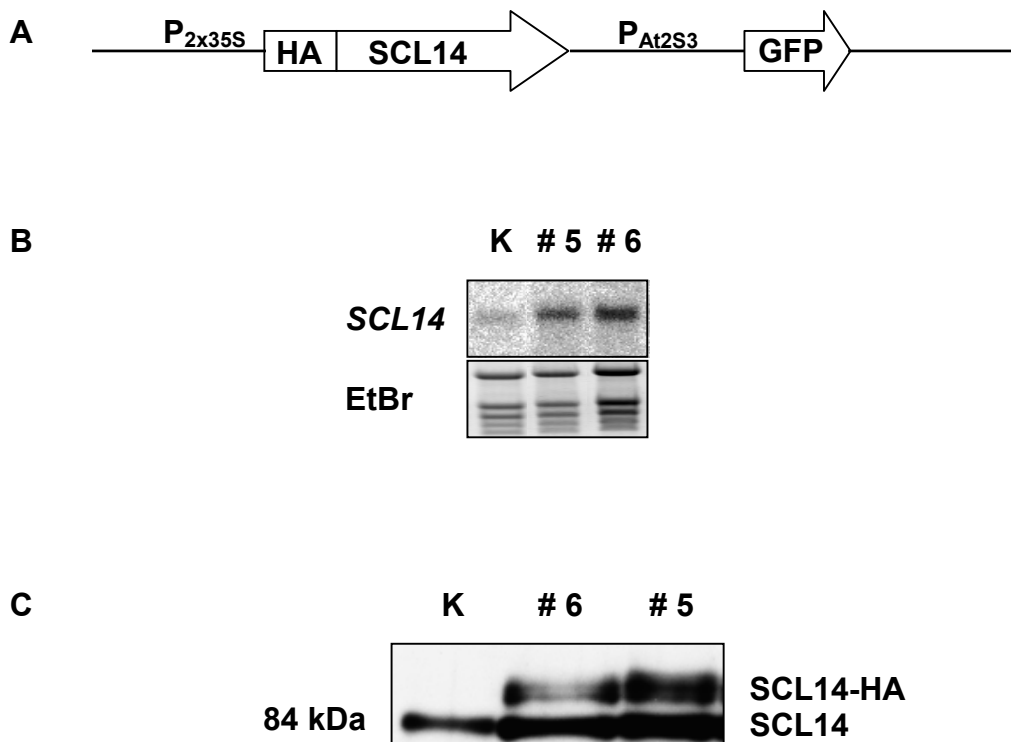


Abbildung 5.11: A: Schematische Darstellung des für die Pflanzentransformation verwendeten Konstrukts. p35S: 2x CaMV 35S-Promotor, HA: HA-tag, pAt2S3: Samen-spezifischer Promotor, GFP: Selektionsmarker. B: Northern Blot Analyse der konstitutiven Expression des SCL14-Transgens in den *as-1::GUS* tragenden Linien SCL14-OE # 5 und # 6. Angegeben ist jeweils die Nummer der Pflanzenlinie. Es wurden jeweils 6 µg Gesamt Blatt-RNA aufgetragen. Als Vergleich wurde RNA der Ausgangslinie Col-0 -90 #6 (K) aufgetragen. Als Hybridisierungssonde wurde ein SCL14-Fragment benutzt. Zur Überprüfung der Beladung ist das Ethidiumbromid-Bild des Gels dokumentiert. C: Western Blot Analyse zum Nachweis der Expression des SCL14-Proteins. Von den Linien wurden jeweils 10 µl denaturierte Gesamtprotein-Harnstoffextrakte aus Blättern in einem 8%igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt. Spur 1: Ausgangslinie, Spur 2: SCL14-OE #6, Spur3: SCL14-OE #5. Zur Detektion wurde das anti-SCL14-Serum verwendet.

5.7.2 Analyse der *as-1::GUS*-Aktivität in SCL14-überexprimierenden Pflanzen

Da SCL14 als Interaktionspartner von TGA2 am *as-1*-Element isoliert wurde, sollte nun der Einfluss von SCL14 auf die Aktivität von *as-1::GUS in planta* in *Arabidopsis* untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden 2,5 Wochen alte Pflanzen der homozygoten SCL14-OE-Linie #5 zunächst auf Erde unter Langtagsbedingungen angezogen und anschließend vorsichtig aus der Erde ausgewaschen. Die so präparierten Keimlinge wurden entweder für einen histologischen Nachweis verwendet oder mit verschiedenen potentiellen Induktoren inkubiert. Zur Durchführung eines MUG-Assays wurden die Proben nach 24 Stunden geerntet, Gesamtproteine extrahiert und im MUG-Assay die *as-1::GUS*-Aktivität bestimmt.

5.7.2.1 Histologischer Nachweis der *GUS*-Reportergenaktivität

Bei diesem Nachweis reagiert das vom *GUS*-Reporter gen exprimierte Protein β -Glucuronidase mit dem Substrat X-Gluc zu einem blau gefärbten Hydrolyseprodukt, das sich histochemisch nachweisen lässt. Pflanzen, die *GUS* exprimieren, sollten daher eine Blaufärbung zeigen.

Für den Nachweis wurden Keimlinge der SCL14-OE-Linie bzw. der Ausgangslinie *as-1::GUS* (K) auf Erde unter Langtagsbedingungen angezogen und nach 2,5 Wochen durch Auswaschen geerntet. Die Färbung mit X-Gluc erfolgte durch Vakuuminfiltration mit der Färbelösung. Dabei konnte der aktivierende Einfluß von SCL14 auf das *as-1*-Element deutlich durch die Blau-Färbung der SCL14-überexprimierenden Keimlinge gezeigt werden (Abbildung 5.12).

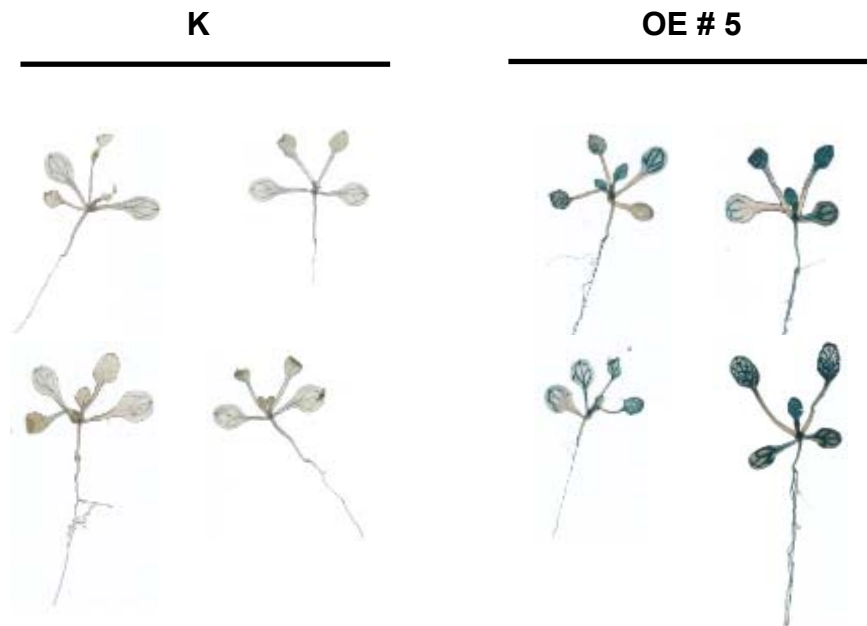


Abbildung 5.12: : Darstellung der *GUS*-Expression in der SCL14-OE-Linie # 5. X-Gluc-Färbung der SCL14-OE-Linie # 5 und der Ausgangslinie *as-1::GUS* (K).

5.7.2.2 Analyse der *as-1::GUS*-Aktivität nach verschiedenen Stimuli

Nachdem der positive Einfluss von SCL14 auf das *as-1::GUS*-Promotorelement qualitativ gezeigt werden konnte, wurde eine quantitative Reporteranalyse durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden ebenfalls Keimlinge der SCL14-OE- sowie der Ausgangslinie *as-1::GUS* auf Erde unter Langtagsbedingungen angezogen und nach 2,5 Wochen durch Auswaschen geerntet. Jeweils 10 Keimlinge wurden dann in Eppendorfgefäße mit MS-Flüssigmedium und 100 μ M 2,4-D, einem Auxin-Analogen, bzw. Ethanol (1:1000) überführt. Nach 24 Stunden Inkubation in einer Klimakammer unter Langtagsbedingungen wurden Gesamtproteinextrakte mit GUS-Extraktionspuffer hergestellt und für einen MUG-Assay verwendet.

Grundsätzlich konnte eine deutlich höhere *as-1::GUS*-Aktivität in den Pflanzen der OE-Linie im Vergleich zur Ausgangslinie, sowie eine leichte Induzierbarkeit durch 2,4-D gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Letztere war jedoch nicht konstant reproduzierbar. Im Folgenden wurde daher der Nachweis auf transkriptioneller Ebene gewählt, um die Induzierbarkeit des *as-1::GUS*-Konstrukts durch SA und JA in der Ausgangs- sowie der SCL14-OE-Linie zu überprüfen. Dafür wurden Pflanzen der beiden Linien unter Langtagsbedingungen angezogen. Nach vier Wochen wurden die

Pflanzen vorsichtig aus der Erde gewaschen und für 24 Stunden in Kaliumphosphatpuffer (pH 5,7) mit 1 mM Salizylsäure (SA), 100 μ M 2,4-D, 20 μ M Methyljasmonat (JA) bzw. dem Lösungsmittel Ethanol (1:1000) unter Langtagsbedingungen im Klimaschrank inkubiert. Im Anschluss erfolgten Northern Blot Analysen mit einer GUS-Sonde (Abbildung 5.13A-C).

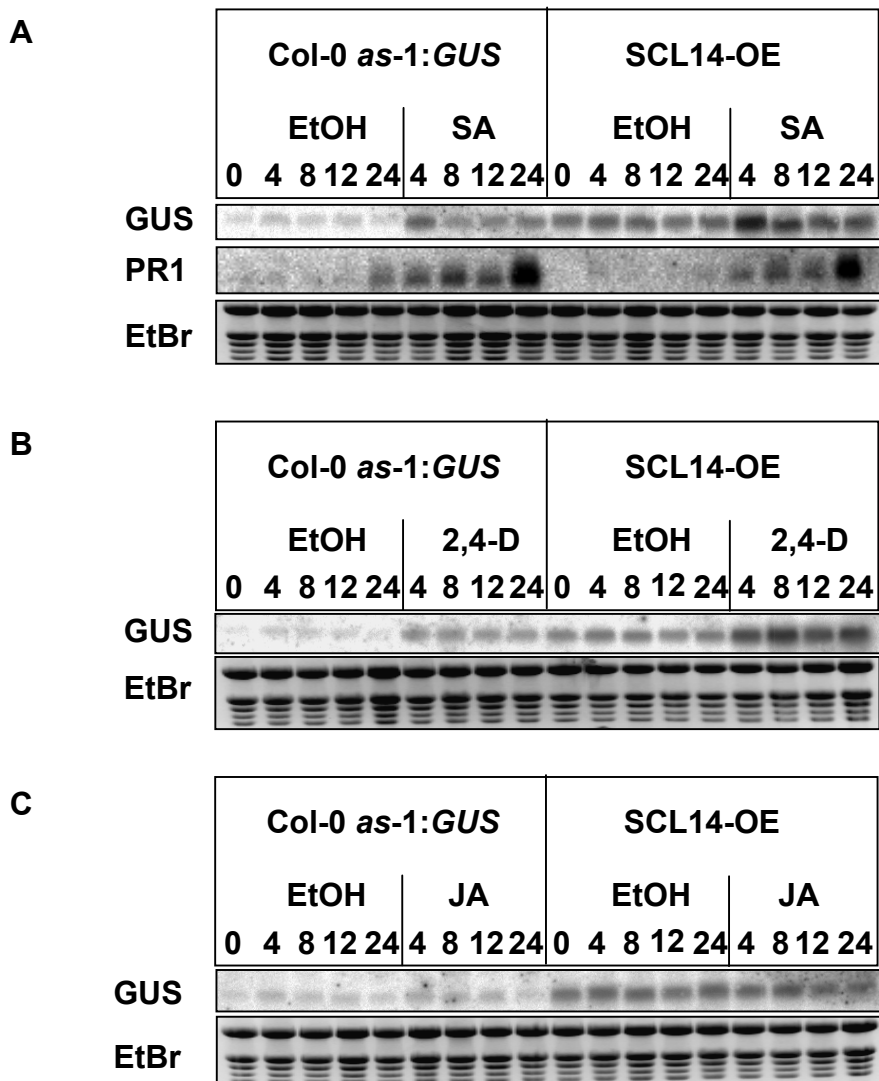


Abbildung 5.13: Darstellung der *GUS*-Expression in der SCL14-OE-Linie # 5. A: Northern Blot Analyse der SCL14-OE-Linie # 5 – sowie der Ausgangslinie nach 24-stündiger Inkubation mit 100 μ M 2,4-D bzw. mit dem Lösungsmittel Ethanol (EtOH, 1:1000). Für die Analyse wurden jeweils 10 Keimlinge pro Linie, Stimulus und Zeitpunkt zusammengefasst. B: Northern Blot Analyse nach 24-stündiger Inkubation mit 1 mM Salizylsäure (SA) bzw. mit dem Lösungsmittel Ethanol (EtOH, 1:1000). C: Northern Blot Analyse nach 24-stündiger Inkubation mit 20 μ M Methyljasmonat (JA) bzw. mit dem Lösungsmittel Ethanol (EtOH, 1:1000). Es wurden jeweils 10 μ g RNA aufgetragen. Die Hybridisierung wurde jeweils mit einer *GUS*-Sonde durchgeführt. Zusätzlich wurde die SA-behandelte RNA mit einer *PR1*-Sonde hybridisiert. Die Zahlen entsprechen den Zeitpunkten der Ernte in Stunden.

Das verwendete *as-1::GUS*-Konstrukt konnte durch SA (Abbildung 5.13A) und 2,4-D (Abbildung 5.13B) induziert werden. Eine Induktion durch JA war nur sehr schwach zu detektieren (Abbildung 5.13C). Der positive Einfluss von SCL14 auf das *as-1*-Element konnte ebenfalls gezeigt werden. Die Behandlung mit SA bzw. 2,4-D führte zu einer zusätzlichen Induktion der *GUS*-Genexpression in der OE-Linie (Abbildung 5.13A und B).

Zusätzlich wurde getestet, ob die Aktivität eines endogenen Promotors, der ein durch SA induzierbares *as-1*-Element enthält (QIN et al., 1994; ULMASOV et al., 1994; XIANG et al., 1996; CHEN und SINGH, 1999), möglicherweise durch eine Überexpression von SCL14 beeinflussbar ist (Abbildung 5.13A). Zu diesem Zweck wurde der Northern Blot-Filter der SA-Induktion mit einer *PR1*-Sonde hybridisiert. Allerdings zeigten beide Linien eine ähnliche Signalverstärkung nach SA-Induktion und *PR1* wurde im Gegensatz zum *as-1::GUS*-Konstrukt der Ausgangslinie durch *SCL14*-Überexpression nicht konstitutiv exprimiert.

5.8 Identifizierung einer T-DNA-Insertionslinie

Die Funktion eines Proteins kann am geeignetsten mit Pflanzen untersucht werden, die das jeweilige Protein nicht exprimieren. Um die Expression zu unterbinden, werden Pflanzen mit T-DNA mutagenisiert. Da diese T-DNA zufällig inseriert, wird ihr Insertionsort durch Ansequenzieren mit T-DNA-spezifischen Primern bestimmt. Das SALK Stock Center in Nottingham hat eine große Datenbank aller bereits vorhandenen T-DNA-Insertionslinien in *Arabidopsis* erstellt und stellt diese ko-Linien auf Anfrage zur Verfügung (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>). Die Insertion der T-DNA in der *SCL14*-ko-Linie SALK_126931 liegt 55 bp stromaufwärts des Startkodons innerhalb des 5' untranslatierten Bereichs (5'UTR) (Abbildung 5.14A). Insgesamt wurden 10 der vom SALK-Institut erhaltenen Samen auf Erde ausgelegt. Nach 4 Wochen wurde genomische DNA aus Blättern dieser Pflanzen extrahiert und mittels PCR-Analyse untersucht (Abbildung 5.14B). Die verwendeten Primer LBb1 fwd, der sich innerhalb der T-DNA-Insertion anlagert, und SCL14~2000bp bck, der sich innerhalb von *SCL14* anlagert, führten nur dann zur Amplifikation eines 2072 bp

großen Produkts, wenn die T-DNA-Insertion tatsächlich an der vorausgesagten Stelle lag. Die Linien SCL14-ko #1 und #6 konnten somit als positiv bestimmt werden. Der Insertionsort wurde anschließend nochmals durch Ansequenzieren mit dem Primer SCL14UTR3 fwd bestätigt.

Um mit einer homozygoten Linie arbeiten zu können, wurde die extrahierte genomische DNA erneut für eine PCR-Analyse mit den Primern SCL14UTR3 fwd und SCL14~1600 bck eingesetzt. Im Falle einer Homozygotie wäre aufgrund der Größe der Insertion kein PCR-Produkt zu erwarten gewesen. Im Extrakt eines Wildtyps oder einer heterozygoten Pflanze hätte sich hingegen ein 1121 bp großes Produkt nachweisen lassen (Abbildung 5.14C). Somit konnte die Linie #1 als homozygot eingestuft werden. Auch auf transkriptioneller Ebene ist deutlich zu erkennen, dass die drei getesteten Individuen der Linie #1 keine SCL14-RNA exprimieren (Abbildung 5.14D). In einer Western Blot Analyse mit dem anti-SCL14-Serum konnte zusätzlich gezeigt werden, dass SCL14 in der ko-Linie nicht gebildet wird (Abbildung 5.14E).

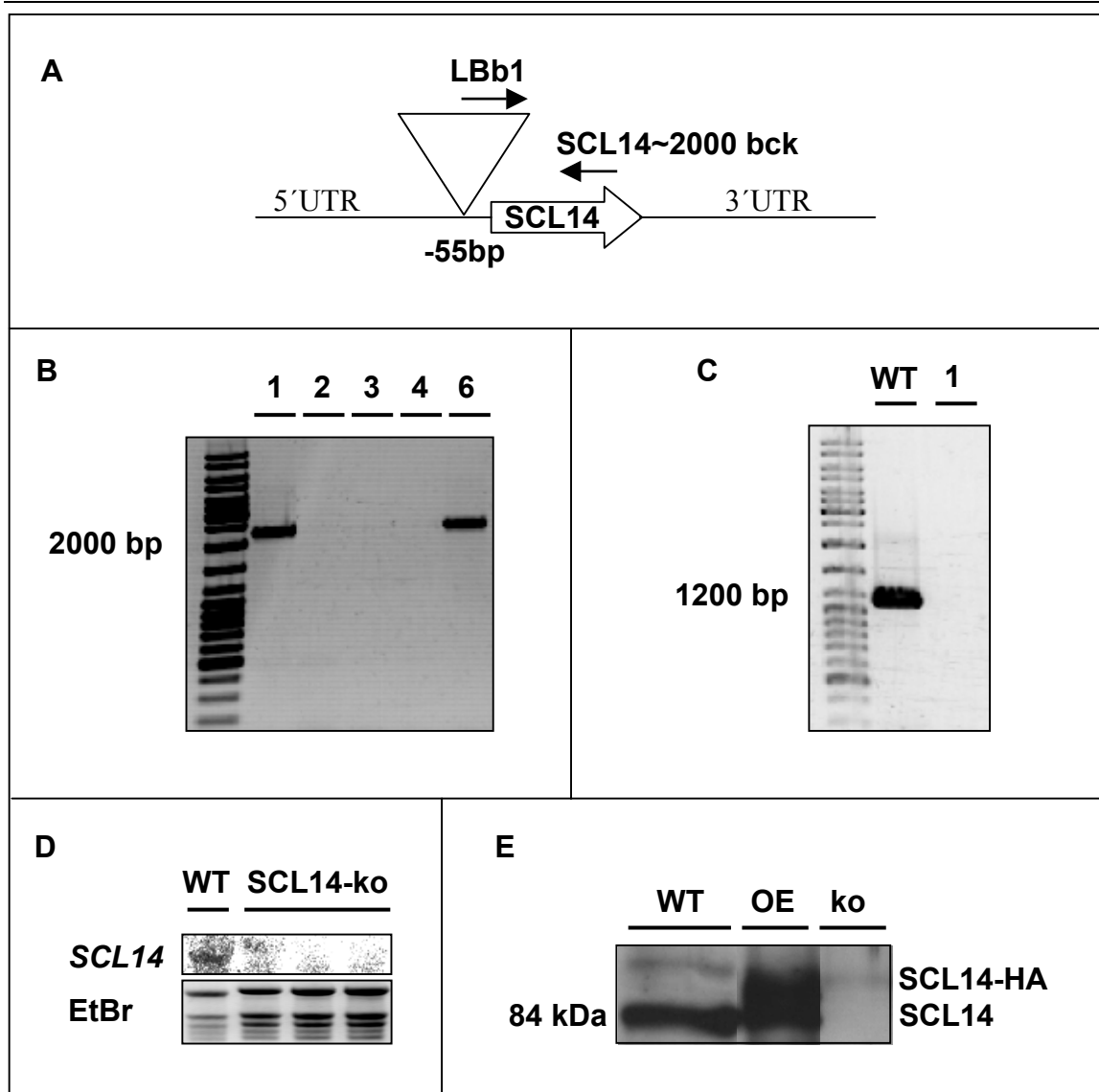


Abbildung 5.14: Charakterisierung der SCL14-ko-Linie. A: Schematische Darstellung der T-DNA-Insertion 55 bp stromaufwärts des SCL14-Startkodons. Eingezeichnet wurden auch die Anlagerungsstellen der Primer LBb1 und SCL14~2000 bck. B: PCR-Analyse verschiedener SCL14-ko-Linien auf Vorhandensein der T-DNA-Insertion. Die Reaktion wurde mit den Primern LBb1 und SCL14~2000 bck durchgeführt. Dabei wurde ein 2072 bp großes PCR-Produkt erwartet. Es wurde jeweils 1 µl genomische DNA aus Blättern für die PCR eingesetzt. Das 1%ige Agarosegel wurde mit jeweils 5 µl PCR-Ansatz beladen. Es sind nur 5 der insgesamt 10 getesteten Linien dargestellt. Die Ziffern kennzeichnen die verschiedenen Linien. C: PCR-Analyse der SCL14-ko-Linie # 1 auf Homozygotie. Die Reaktion wurde mit den Primern SCL14UTR3 fwd und SCL14~1600 bck durchgeführt. Es wurde jeweils 1 µl genomische DNA aus Blättern für die PCR eingesetzt. Das 1%ige Agarosegel wurde mit jeweils 5 µl PCR-Ansatz beladen. WT: Col-0, 1: SCL14-ko #1. D: Northern Blot Analyse verschiedener Individuen der homozygoten SCL14-ko-Linie #1 im Vergleich zum Wildtyp (WT). Es wurden jeweils 6 µg RNA aus Blättern aufgetragen. Für die Hybridisierung des Filters wurde eine SCL14-Volllängensonde verwendet. E: Western Blot Analyse. Dargestellt sind der Wildtyp (WT), SCL14-OE #5 (OE) sowie SCL14-ko #1 (ko). Von den Linien wurden jeweils 10 µl denaturierte Gesamtprotein-Harnstoffextrakte aus Blättern in einem 8%igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt. Zur Detektion wurde das anti-SCL14-Serum verwendet.

5.8.1 Analyse der *as-1::GUS*-Aktivität in der SCL14-ko-Linie

Nachdem gezeigt werden konnte, dass SCL14 durch Überexpression zu einer deutlich gesteigerten Aktivität des *GUS*-Reportergens unter der Kontrolle des *as-1*-Elements führt, sollte nun überprüft werden, ob sich die Aktivität durch einen SCL14-knock out verringern lässt. Zu diesem Zweck wurde die SCL14-ko-Linie # 1 zunächst in den *as-1::GUS*-Hintergrund eingekreuzt. Die Ausgangslinie *as-1::GUS* lieferte dabei den Pollen, der auf den Stempel der ko-Pflanze übertragen wurde. Von 32 Pflanzen der F2-Generation wurden denaturierte Harnstoff-Gesamtproteinextrakte hergestellt und in einer Western Blot Analyse auf das Vorhandensein eines SCL14-Signals untersucht. In 8 der 32 getesteten Pflanzen ließ sich kein SCL14-Signal detektieren (Daten nicht gezeigt). Diese Pflanzen wurden als homozygote SCL14-ko-Pflanzen eingestuft. Parallel wurde genomische DNA aus den Blättern extrahiert, die in einer PCR-Analyse mit den Primern *GUS* sense und *GUS* antisense auf das Vorhandensein des *as-1::GUS*-Konstrukts untersucht wurde (Daten nicht gezeigt). Laut Mendel hätten hier $\frac{1}{4}$ der analysierten Pflanzen als Wildtyppflanzen kein *GUS*-Gen tragen dürfen. Dies entspräche 8 von 32 Pflanzen. Da aber nur eine Pflanze als Wildtyppflanze identifiziert werden konnte, wurde davon ausgegangen, dass die für die Kreuzung verwendete Ausgangslinie das *as-1::GUS*-Konstrukt in mehrfacher Kopienzahl trägt, und die Nachkommen dieser Kreuzung dadurch eine unterschiedliche Kopienzahl erben.

Pflanzen der Ausgangslinie *as-1::GUS* wurden daher mit Col-0 Wildtyppflanzen entsprechend gekreuzt, um Kontrolllinien mit der gleichen Anzahl an *as-1::GUS*-Kopien zu erhalten. Die genaue Anzahl der vorhandenen *as-1::GUS*-Kopien in der Ausgangslinie sowie in den F2-Nachkommen der Kontrolllinien und der mit der Ausgangslinie gekreuzten knock out-Linien wurde durch eine Southern Blot Analyse nach Verdau der genomischen DNA aus Blättern 3 Wochen alter Langtagspflanzen mit *HindIII* bestimmt. Es zeigte sich, dass die Ausgangslinie 5 Kopien des *as-1::GUS*-Konstrukts enthielt (Abbildung 5.15). Jeweils drei Kreuzungslinien, die ebenfalls 5 Kopien enthalten, wurden ausgewählt, um diese bezüglich ihrer *as-1*-Aktivität zu untersuchen. Dabei handelt es sich um die Linien #8, #12 und #13 der Kontrollkreuzung sowie # 8, #13 und #14 der gekreuzten ko-Linie. Die Nachkommen #8 und #13 der ko-Kreuzung zeigten allerdings nur schwache Signale für einzelne Insertionen.

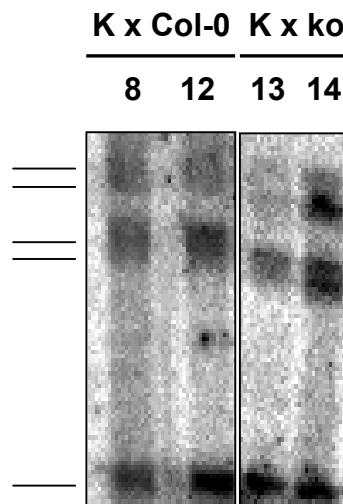


Abbildung 5.15: Southern Blot Analyse der Kreuzungslinien. Die Pflanzen wurden unter Langtagsbedingungen für 4 Wochen angezogen. Anschließend wurde Blattmaterial zur Extraktion genomischer DNA geerntet. Insgesamt wurden jeweils 8 µg genomische DNA mit *Hind*III sowie 1 µl RNase und 1 µl Proteinase K verdaut. Die Auftrennung erfolgte in einem 0,8 %igen Agarosegel. Nach Kapillarblot auf eine Nylon-Membran erfolgte die Hybridisierung mit einer radioaktiv-markierten *GUS*-Sonde. K: Ausgangslinie, *as-1::GUS*; K x Col-0: F2-Pflanzen der Kreuzung zwischen der Ausgangslinie und Col-0; K x ko: F2-Pflanzen der Kreuzung zwischen der Ausgangslinie und der ko-Linie. Die Zahlen entsprechen der Nummer der Linie. Die 5 Striche auf der linken Seite entsprechen den 5 Insertionen.

Es wurden jeweils etwa 30 zwei Wochen alte Pflanzen für 24 Stunden mit 100µM 2,4-D bzw. Ethanol (1:1000) induziert und in einer Northern Blot Analyse mit einer *GUS*-Sonde untersucht. Als Kontrolle dienten uninduzierte Keimlinge.

In den Kontrollkreuzungslinien # 8 und # 12 konnte eine deutliche 2,4-D-Induktion beobachtet werden, wohingegen in den ko-Kreuzungslinien kein Signal detektiert werden konnte (Abbildung 5.16). Dies spricht für einen spezifischen Einfluss von SCL14 auf die Induzierbarkeit des *as-1*-Elements.

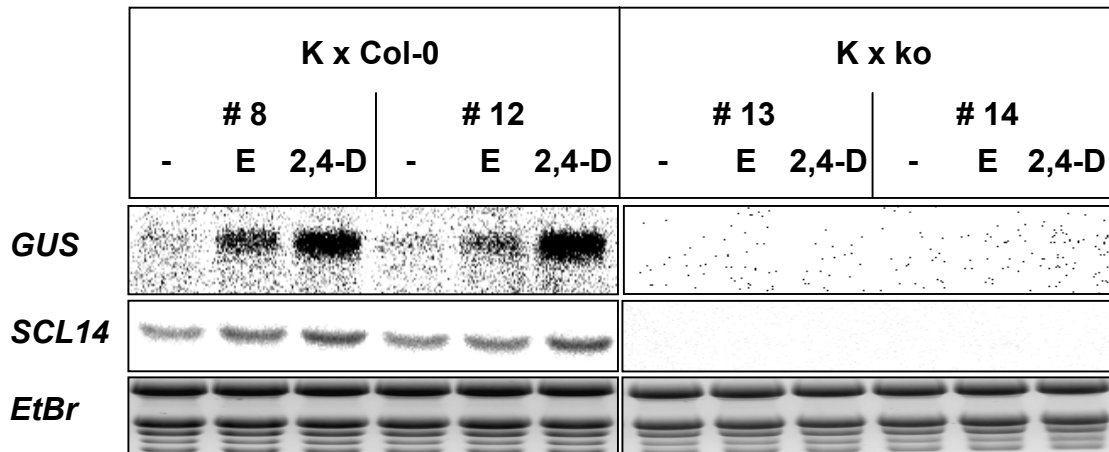


Abbildung 5.16: Northern Blot Analyse der Kreuzungslinien K x Col-0 bzw. K x ko. Die Pflanzen wurden 24 Stunden nach Besprühen mit 100 μ M 2,4-D bzw. mit dem Lösungsmittel Ethanol (E, 1:1000) geerntet. Als Kontrolle wurde RNA unbehandelter Pflanzen aufgetragen. Angegeben ist jeweils die Nummer der Pflanzenlinie. Es wurden jeweils 20 μ g Gesamt Blatt-RNA aufgetragen. Die Hybridisierung erfolgte mit einer *GUS*- und einer *SCL14*-Sonde. Zur Überprüfung der Beladung ist das Ethidiumbromid-Bild des Gels dokumentiert. K x Col-0: F2-Pflanzen der Kreuzung zwischen der Ausgangslinie und Col-0; K x ko: F2-Pflanzen der Kreuzung zwischen der Ausgangslinie und der ko-Linie, -: unbehandelt

5.9 Beeinflusst die Lokalisation von SCL14 das *as-1*-Element ?

Es ist möglich, dass es für die Regulation des *as-1*-Elements erforderlich ist, dass SCL14 aus dem Kern exportiert wird, um außerhalb einen Stimulus zu bekommen, der eventuell zu einer Modifizierung des Proteins führt, welches dann auf verschiedene Weisen zu einer Aktivierung des *as-1*-Elements beitragen könnte. Der positive Einfluss von SCL14 auf die Aktivität des *as-1*-Elements konnte in den vorherigen Versuchen wiederholt gezeigt werden, schien jedoch unabhängig von den bisher bekannten Induktoren zu sein. Im Folgenden sollte überprüft werden, ob die Aktivität des *as-1*-Elements verändert wird, wenn SCL14 durch Fusion mit einer Glucocorticoidrezeptor-Bindedomäne nicht in den Kern transportiert werden kann. In uninduziertem Zustand bindet die GR-Domäne mit zellulären Proteinen, u. a. mit dem Hitzeschock-Protein 90 (HSP90), einen Komplex, wodurch das Fusionsprotein in einer inaktiven Form außerhalb des Kerns gehalten wird (PICARD und YAMAMOTO, 1987). Durch Induktion mit dem Glucocorticoid Dexamethason und der Bindung dieses Hormons an die GR-Domäne dissoziiert das Fusionsprotein von HSP90 und das „freie“ SCL14-Fusionsprotein kann in den Kern transportiert werden (Abbildung 5.18A).

Nachdem wiederholt gezeigt werden konnte, dass SCL14 einen Einfluss auf das *as-I*-Element ausübt, dieser Einfluss aber unabhängig von den bisher bekannten Induktoren des *as-I*-Elements zu sein scheint, sollte die Aktivität von *as-I::GUS* im folgenden mit einer Linie, in der der Kernimport von SCL14 induziert werden kann, überprüft werden.

5.9.1 Expression von SCL14-GR in *Arabidopsis thaliana*

Es wurden Pflanzenlinien hergestellt, die SCL14 als Fusionsprotein mit der Hormon-Bindedomäne des Glucocorticoidrezeptors (GR) exprimieren. Das SCL14-GR-Konstrukt unter der Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors wurde mit dem Plasmid pFGCA7/SCL14-GR parallel in die SCL14-ko-Linie #1 sowie in die Ausgangslinie *as-I::GUS* transformiert (Abbildung 5.17A). Die Selektion positiver Pflanzen erfolgte in der Generation F1 durch Besprühen mit BASTA. Pflanzen der F2-Generation wurden dann in einer Western Blot Analyse mit dem anti-SCL14-Serum auf die Expression des Fusionsproteins getestet (Abbildung 5.17B).

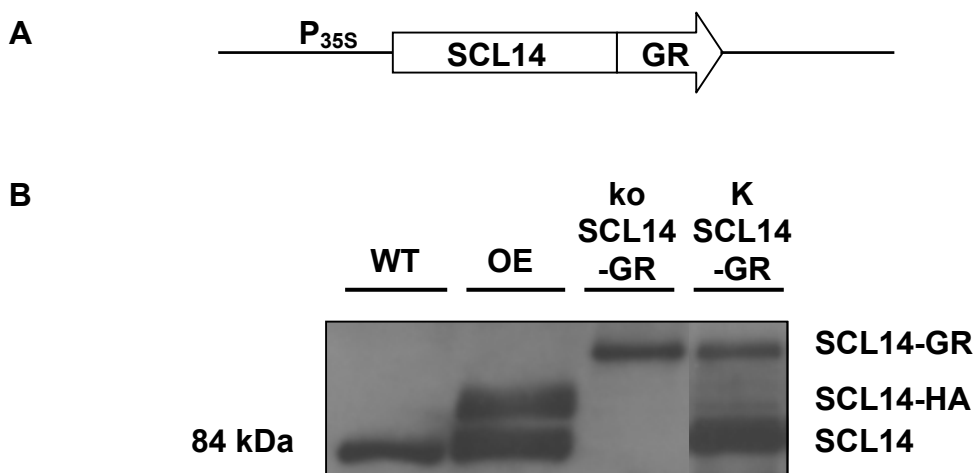


Abbildung 5.17: A: Schematische Darstellung des für die Pflanzentransformation verwendeten Konstrukts. P_{35S}: CaMV 35S-Promotor, SCL14: SCL14-Gen, GR: GR-Domäne. B: Western Blot Analyse zum Nachweis der Expression des SCL14-GR-Fusionsproteins in den transgenen Pflanzenlinien SCL14-ko/SCL14-GR # 15 (ko SCL14-GR) und *as-I::GUS* SCL14-GR # 1 (K SCL14-GR). Zusätzlich wurden der Wildtyp (WT) und die Linie SCL14-OE #5 dargestellt. Von den Linien wurden jeweils 10 µl denaturierte Gesamtprotein-Harnstoffextrakte aus Blättern in einem 8%igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt.

4 der 15 getesteten Linien enthielten das gewünschte Protein. In der F3-Generation wurden schließlich jeweils 18 Nachkommen von diesen 4 Linien auf die Expression des SCL14-GR-Proteins untersucht. Zwei der untersuchten Linien zeigten bei allen getesteten Nachkommen im Western Blot ein Signal auf der erwarteten Höhe. Diese Linien SCL14-ko-SCL14-GR #15 sowie *as-1::GUS* SCL14-GR #1 sind somit wahrscheinlich homozygot.

5.9.1.1 Analyse der *as-1::GUS*-Aktivität nach Dexamethason-Induktion

Da sich die Linie SCL14-ko-SCL14-GR noch nicht im *as-1::GUS*-Hintergrund befindet, konnte der MUG-Assay zunächst nur als Vortest mit 2,5 Wochen alten Langtagspflanzen der Linie *as-1::GUS* SCL14-GR #1 durchgeführt werden, die das endogene SCL14-Protein zusätzlich zu dem transgenen SCL14-GR-Fusionsprotein exprimiert. Diese Linie sollte sich in uninduziertem Zustand wie die Ausgangslinie *as-1::GUS* verhalten, da das zusätzlich vorhandene SCL14 durch die GR-Fusion außerhalb des Zellkerns bleibt und somit nicht das *as-1*-Element stimulieren kann. Unter Verwendung von Dexamethason sollte die *as-1::GUS* Aktivität der Linie eher der Aktivität in den SCL14-OE-Pflanzen entsprechen. Dies wurde mit Hilfe eines MUG-Assays überprüft. Die *as-1::GUS* SCL14-GR #1-Linie (K SCL14-GR) zeigte bereits uninduziert im DMSO-Kontrollansatz eine erhöhte *as-1::GUS*-Aktivität im Vergleich zur Ausgangslinie *as-1::GUS* (K), was entweder auf einer Stimulation durch das Vorhandensein größerer SCL14-Mengen ausserhalb des Zellkerns zurückzuführen ist, oder auf einer unvollständigen Unterbindung des Kernimports beruhen könnte. Durch Induktion mit Dexamethason ließ sich die *as-1::GUS*-Aktivität in der *as-1::GUS* SCL14-GR #1-Linie (K SCL14-GR) steigern, wohingegen das Hormon in den Kontrollansätzen keinen Einfluss auf die Aktivitäten in der Ausgangslinie *as-1::GUS* (K) bzw. der SCL14-OE-Linie ausübte (Abbildung 5.18B). Allerdings betrug die Steigerung nur 1,7. Dies korreliert jedoch mit der in der Western Blot Analyse detektierten schwachen Expressionsstärke des Fusionsproteins (Abbildung 5.17B). Die Induktion des Kerntransports in den oben beschriebenen Linien durch Dexamethason funktioniert also und kann somit genutzt werden, um die Funktion von SCL14 aufzuklären.

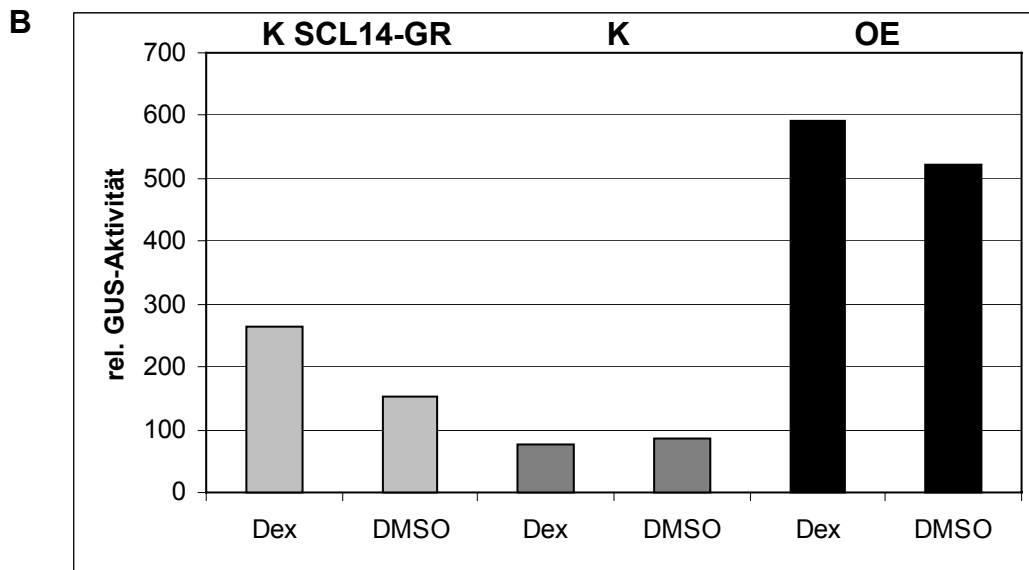
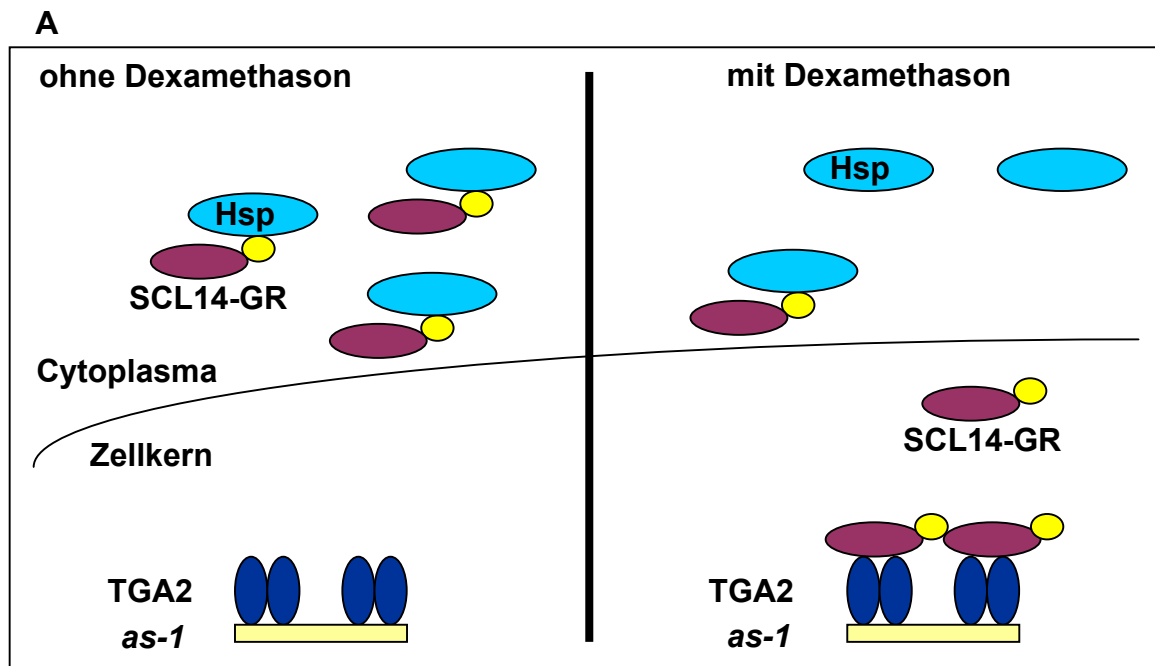


Abbildung 5.18: A: Schematische Darstellung der Dexamethasoninduktion. B: Darstellung der *as-1::GUS*-Aktivität in der Linie *as-1::GUS* SCL14-GR #1 (K SCL14-GR), der Ausgangslinie *as-1::GUS* (K) sowie der Überexpressionslinie (OE) nach 5 μ M Dexamethason-Behandlung (Dex) bzw. nach Behandlung mit dem Lösungsmittel DMSO. K SCL14-GR: *as-1::GUS* SCL14-GR #1, K: *as-1::GUS*, OE: SCL14-OE # 5. Die Darstellung des Experiments beruht auf einer einmaligen Durchführung, konnte aber bereits reproduziert werden.

5.9.2 Inhibierung des Kernexports durch LMB hat keinen Einfluß auf die Aktivität des *as-1*-Elements

Um mit einem unabhängigen experimentellen Ansatz zu klären, ob die Regulation des *as-1*-Elements durch Transport regulatorischer Proteine in den bzw. aus dem Zellkern erfolgt, wurden 2,5 Wochen alte Keimlinge der Linie *as-1::GUS* aus der Anzuchterde ausgewaschen und in flüssigem MS-Medium mit 2 μ M LMB für 24 Stunden inkubiert. Um die Grundaktivität des *as-1*-Elements noch zu erhöhen und somit eventuell deutlichere Unterschiede detektieren zu können, wurde jeweils ein Ansatz für weitere 24 Stunden zusätzlich mit 200 μ M 2,4-D bzw. dem Lösungsmittel Ethanol (1:1000) inkubiert. Anschließend wurde die Aktivität des *as-1::GUS*-Konstrukts in einem MUG-Assay gemessen. Als Kontrolle wurden Keimlinge der Linie *AtbZIP9* verwendet, die freundlicherweise von Fridtjof Weltmeier zur Verfügung gestellt wurden. Es handelt sich dabei um eine *AtbZIP9*-Promotor:*GUS*-Linie des Xylem-spezifischen bZIP-Transkriptionsfaktors. Die Linie enthält kein zusätzliches *as-1*-Element und diente somit als Kontrolle für die Wirkung von LMB.

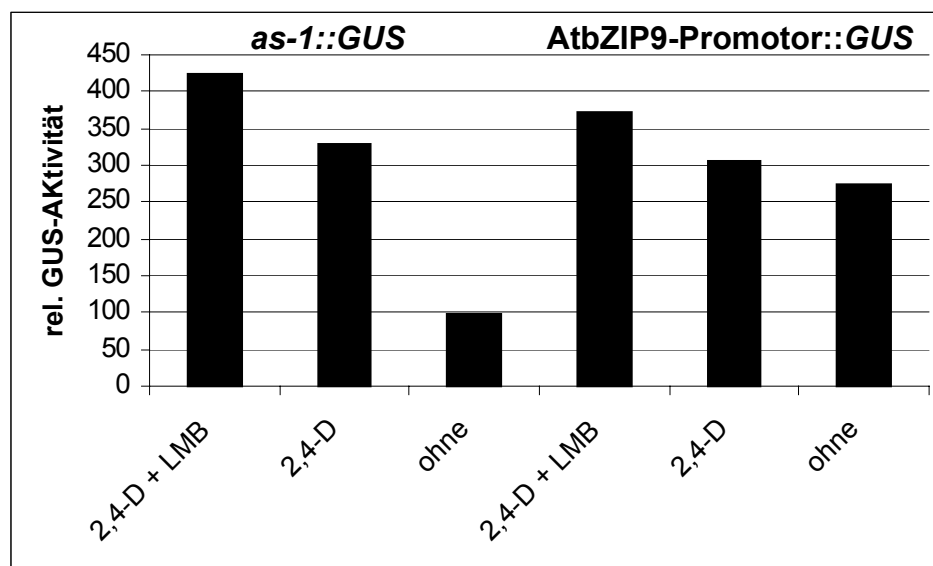


Abbildung 5.19: A: Darstellung der *as-1::GUS*-Aktivität nach Induktion mit 100 μ M 2,4-D bzw. mit 100 μ M 2,4-D und 2 μ M LMB sowie uninduziert in der Linie *as-1::GUS* und der transgenen Linie *AtbZIP9*.

Im Vergleich mit der Linie *as-1::GUS* zeigte die Kontrolllinie bereits eine erhöhte Grundaktivität des *GUS*-Genprodukts, die sich durch 2,4-D noch leicht induzieren ließ (Abbildung 5.19). Die Induzierbarkeit des *as-1::GUS*-Konstrukts durch 2,4-D konnte

hingegen deutlich gezeigt werden. Allerdings zeigten beide Linien eine ähnliche Aktivitätssteigerung nach zusätzlicher Inkubation mit LMB. Die Inhibierung des Proteinexports aus dem Zellkern durch LMB hat daher vermutlich keinen oder zumindest keinen deutlichen Einfluss auf die Aktivität des *as-1::GUS*-Reportergenkonstrukts.

5.10 Einfluß der Überexpression von SCL14 bzw. T-DNA-Insertion auf die pflanzliche Abwehr gegen das bakterielle Pathogen *Pseudomonas syringae*

Da das *as-1*-Element u.a. an der pflanzlichen Antwort auf Pathogenbefall beteiligt ist, sollte untersucht werden, ob diese Antwort in der SCL14-ko-Linie verändert ist. Dazu wurden 4 Wochen alte Langtagspflanzen der Ausgangslinie *as-1::GUS* und der ko-Linie mit virulenten bzw. avirulenten *Pseudomonaden*-Stämmen zum einen infiziert, um den Bakterientiter zu bestimmen, zum anderen wurden Pflanzen beider Linien mit den verschiedenen Stämmen gedippt, um Northern Blot Analysen durchzuführen. Allerdings konnte in mehreren Durchführungen kein reproduzierbares Ergebnis erzielt werden. Die ko-Linie schien zeitweise resistenter gegenüber virulenten *Pseudomonaden* zu sein, während beide Linien eine ähnliche Reaktion auf die Infektion mit avirulenten Bakterien zeigten (Daten nicht gezeigt).

Auf transkriptioneller Ebene konnte in der ko-Linie einmalig eine geringere Expression von *PRI* bzw. *ICSI*, einem Gen, das an der SA-Synthese beteiligt ist, beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Doch auch dieses Ergebnis ließ sich nicht reproduzieren. Aufgrund der starken Schwankungen in den Ergebnissen ist davon auszugehen, dass SCL14 nicht essentiell an der Abwehr gegen *Pseudomonaden* beteiligt ist.

5.11 Einfluß abiotischer Faktoren auf die Expression von SCL14

5.11.1 Induktion der Transkription von SCL14 durch dunkel-induzierte Seneszenz

Seneszenz in Blättern ist eine Form des programmierten Zelltods, an dessen Entstehung die Expression einer Reihe von sogenannten Seneszenz-assoziierten Genen (*SAG*) beteiligt ist (BUCHANAN-WOLLASTON, 1997; BUCHANAN-WOLLASTON, et al., 2003; DANGL, et al., 2000; GAN & AMASINO, 1997; QUIRINO, et al., 2000; SMART, 1994; YOSHIDA, 2003). Der Seneszenz-Prozeß kann dabei sowohl als Teil der Entwicklung aufgrund des Alters eingeleitet werden, wird aber auch vorzeitig durch verschiedene Arten von Stress (z.B. Lichtmangel, Ozon) ausgelöst.

Während der Seneszenz werden Nährstoffe aus dem Blatt transportiert sowie Chlorophyll, Proteine und RNA degradiert. Die Degradation der Makromoleküle führt u.a. über die β -Oxidation zur Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (BUCHANAN-WOLLASTON et al., 2003).

LIN und WU (2004) haben die Expression von *SCL14* bereits als durch dunkel-induzierte Seneszenz induzierbar beschrieben. Dies sollte hier noch einmal unter den gegebenen Bedingungen überprüft werden.

Wildtyppflanzen wurden für vier Wochen unter Kurztagsbedingungen angezogen und anschließend unter einen Karton gestellt, um durch Dunkelheit Seneszenz zu induzieren. Parallel angezogene Pflanzen wurden gleichzeitig in derselben Kammer unter Kurztagsbedingungen inkubiert. Nach verschiedenen Zeitpunkten (0 Stunden, 24 Stunden sowie 5 Tage) wurde Blattmaterial für eine RNA-Extraktion und anschließende Northern Blot Analyse im Dunkeln geerntet. Mit Hilfe einer radioaktiven Sonde ließ sich das SCL14-Transkript nachweisen.

Dunkel-induzierte Seneszenz führte zu einem Anstieg der Transkriptmenge von *SCL14* (Abbildung 5.20). Allerdings führte diese Induktion nicht zu einem deutlich sichtbaren Phänotyp (Daten nicht gezeigt). Auch die Überexpressions- und die knock out-Linie zeigten keinen Phänotyp nach Dunkel-Induktion.

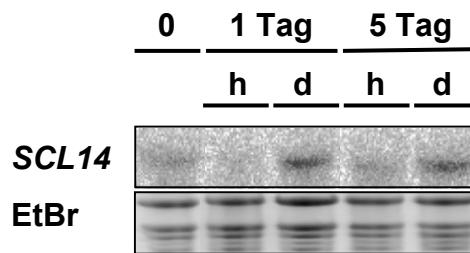


Abbildung 5.20: Northern Blot Analyse der Wildtyp-Pflanzen nach Inkubation im Dunkeln. Die Pflanzen wurden parallel unter Kurztags-Bedingungen angezogen. Nach vier Wochen wurde ein Teil der Pflanzen unter einen Karton gestellt. Die Ernte des Blattmaterials erfolgte zum Zeitpunkt 0 Std., nach 1 Tag und nach 5 Tagen. Es wurden jeweils 10 µg RNA aus Blättern aufgetragen. Für die Hybridisierung des Filters wurde eine *SCL14*-Vollängensonde verwendet. h: Pflanzen wurden im Licht angezogen, d: Pflanzen wurden im Dunkeln angezogen.

5.11.2 Induktion der Transkription von *SCL14* durch Ozon

Troposphärisches Ozon (O_3) verursacht signifikante Schäden an natürlichen und kultivierten Pflanzen (PELL et al., 1997). In der Vergangenheit wurde davon ausgegangen, dass O_3 den pflanzlichen Metabolismus angreift, indem es zelluläre Membranen oxidiert (HEATH und TAYLOR, 1997; MUDD, 1997, RAO et al., 2000a). Andere Studien deuten daraufhin, dass O_3 , ähnlich wie Pathogene oder andere Stressfaktoren, durch Induktion von hypersensitiver Resistenz (HR) wirkt (RAO et al., 2000a; SANDERMANN et al., 1998; SHARMA et al., 1996). Es konnte gezeigt werden, dass O_3 , ähnlich wie Pathogene, einen oxidativen „burst“ aktiviert, der zur Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wie z.B. Superoxid-Radikalen und Hydrogenperoxid (H_2O_2) führt (OVERMYER et al., 2000; PELLINEN et al., 1999; RAO und DAVIS, 1999; RAO et al., 2000b; SCHRAUDNER et al., 1998; JABS, 1999; LAMB und DIXON, 1997). Antioxidative Enzyme können ROS, organische Hydroperoxide und Peroxyl-Radikale entfernen (KANGASJARVI et al., 1994; SHARMA und DAVIS, 1997). Untersuchungen dieser Enzyme haben ergeben, dass Zusammenhänge zwischen höherer Aktivität von antioxidativen Enzymen und O_3 -Toleranz bestehen (SCHRAUDNER et al., 1997; SHARMA und DAVIS, 1997). Es wird davon ausgegangen, dass O_3 -induzierte ROS bestimmte Signaltransduktionswege aktivieren, die von SA, JA bzw. Ethylen abhängig sind und somit eine Vielzahl von Abwehrreaktionen wie z.B. HR induzieren (OVERMYER et al., 2000; Rao et al.,

2000a,b; SANDERMANN *et al.*, 1998; SHARMA *et al.*, 1996). In Pflanzen wurden zwei Hauptauslöser von Zelltod genauer charakterisiert, HR und Seneszenz (QUIRINO *et al.*, 2000). Da HR und Seneszenz beide genetisch definierte Zelltodprogramme auslösen, die verschiedene Ähnlichkeiten aufweisen, wurde spekuliert, dass es gemeinsame Schritte für die Induktion und/oder Exekution dieser beiden Prozesse geben könnte (PONTIER *et al.*, 1999; QUIRINO *et al.*, 2000).

Nachdem nun also die Induktion der SCL14-Genexpression in Folge von dunkel-induzierter Seneszenz gezeigt werden konnte, sollte im Folgenden die Induzierbarkeit durch Ozon-Behandlung untersucht werden.

Die Ausgangslinie, *as-1::GUS*, die Überexpressionslinie sowie die knock out-Linie wurden nach 4-wöchiger Anzucht unter Langtagsbedingungen für zwei Tage mit 200 ppm Ozon behandelt. Parallel wurden gleich angezogene Pflanzen in einer baugleichen Klimakammer ohne Ozon-Behandlung inkubiert. Im Anschluss wurde von allen Linien Blattmaterial für eine RNA-Extraktion geerntet. Im nachfolgenden Northern Blot ließ sich eine Induktion der SCL14-Expression sowohl in der Ausgangslinie als auch in der Überexpressionslinie detektieren (Abbildung 5.21). Die Stärke des GUS-Signals korreliert dabei mit der Stärke des SCL14-Signals. SCL14 könnte somit an der Signaltransduktion in Folge von Ozon-Stress beteiligt sein.

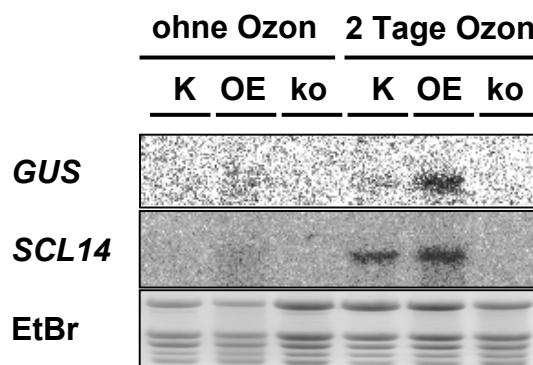


Abbildung 5.21: Northern Blot Analyse der transgenen Linien nach 2-tägiger Behandlung mit Ozon bzw. unbehandelt. Die Ozon-Behandlung erfolgte mit 200 ppm Ozon. Die unbehandelten Pflanzen wurden zeitgleich in einer baugleichen Klimakammer angezogen und zum gleichen Zeitpunkt geerntet. Es wurden jeweils 10 µg RNA aus Blättern aufgetragen. Für die Hybridisierung des Filters wurde eine GUS-Sonde bzw. eine SCL14-Vollängensonde verwendet. K: *as-1::GUS*, OE: SCL14-OE # 5, ko: SCL14-ko #1.

5.11.3 Keimungsanalyse unter oxidativem Stress

Durch die Behandlung mit Paraquat, auch Methylviologen genannt, entsteht in der Pflanze, neben Superoxid-Anionen, auch H_2O_2 . Die Produktion von Superoxid-Radikalen erfolgt präferentiell in den Chloroplasten (BOWLER et al., 1991). GARRETÓN et al. konnten 2002 zeigen, dass Paraquat die Produktion von ROS ebenso effizient anregt wie Salizylsäure (SA). Auch die *as-1*-Bindeaktivität wird von Paraquat und SA gleichermaßen erhöht (GARRETÓN et al., 2002). Allerdings führte die Behandlung mit Paraquat, im Gegensatz zur SA-Induktion, nur zu einer geringeren Transkriptionsaktivierung von Genen, die durch ein *as-1*-Promotorelement kontrolliert werden.

Da durch die Ozon-induzierte Expression von SCL14 bereits ein Hinweis auf die Beteiligung an der oxidativen Stress-Signaltransduktion gegeben war, sollte im Folgenden die Reaktion während der Keimung auf Paraquat-haltigem Medium untersucht werden.

Samen der Ausgangslinie, *as-1::GUS*, der Überexpressionslinie #5, der knock out-Linien #19 und #32 im *as-1::GUS*-Hintergrund, sowie der knock out-Linie #1 im Col-0-Hintergrund wurden oberflächensterilisiert und anschließend auf 2MS-Medium mit und ohne $0,5\mu M$ Paraquat ausgelegt. Dabei war es wichtig, das Medium frisch zu verwenden, da Paraquat bei Lagerung durch Licht an Wirkung verliert. Es wurden jeweils zwei Platten pro Linie und pro Stimulus verwendet. Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen und in einer Langtagsklimakammer aufbewahrt. Nach 7 Tagen wurden Fotos gemacht (Abbildung 5.22).

Betrachtet man zunächst die Ausgangslinie fällt auf, dass die Keimung durch Paraquat negativ beeinflusst wird. Aber sowohl die Samen der Ausgangslinie als auch die Samen der Überexpressionslinie konnten auf Paraquat-haltigem Medium vollständig auskeimen. Alle knock out-Linien keimten auf 2MS-Medium vergleichbar zur Ausgangslinie, konnten auf dem Paraquat-haltigen Medium aber nur bis zu einem Entwicklungsstadium von 0,7 auskeimen (BOYES et al. 2001). Dies änderte sich auch nicht bei verlängerter Dauer des Experiments (Daten nicht gezeigt). Die Expression von SCL14 könnte also den auskeimenden Samen möglicherweise vor oxidativem Stress schützen.

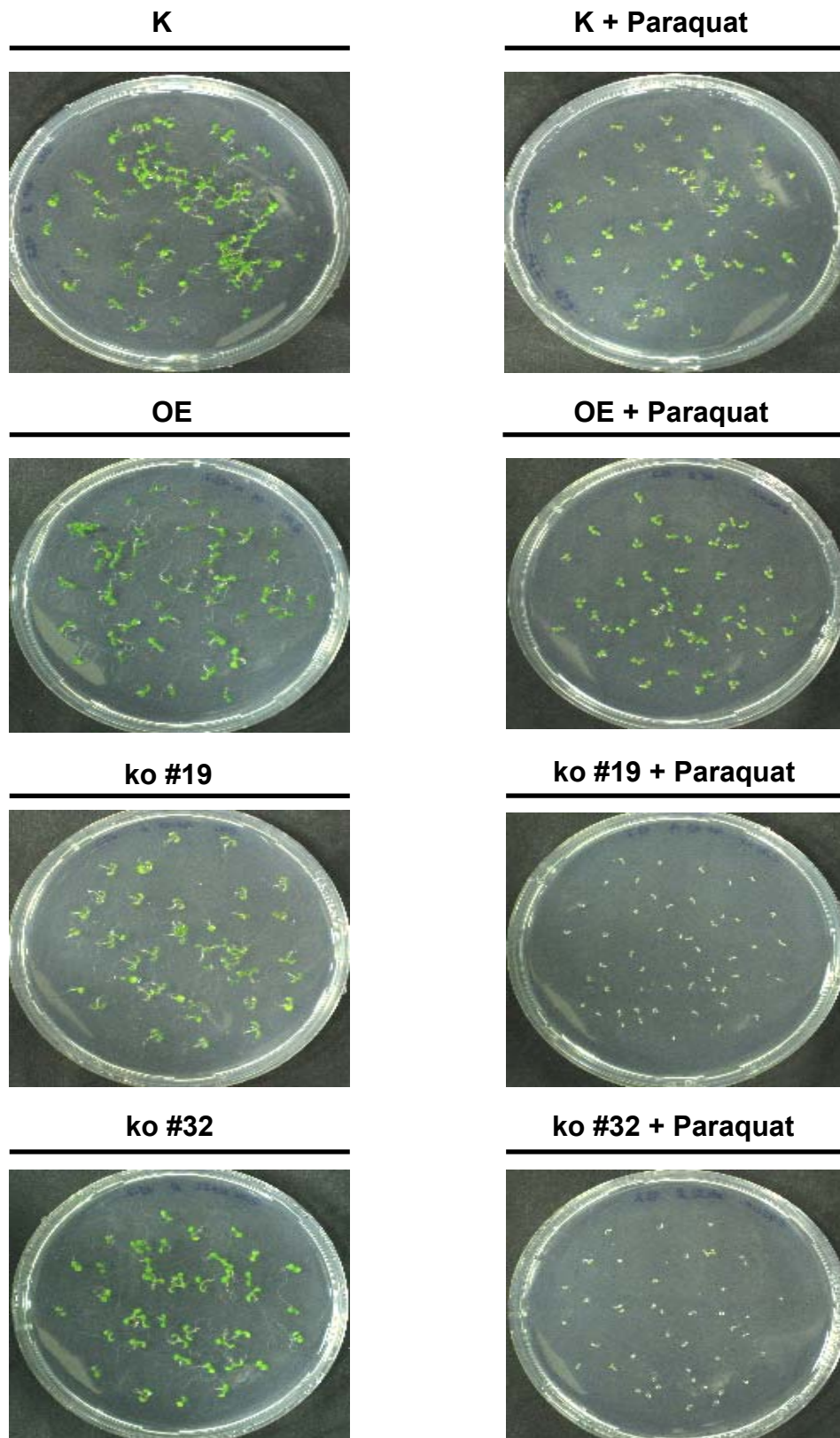


Abbildung 5.22: Fotos der Ausgangslinie (K), der Überexpressionslinie (OE) sowie der ko-Linien im *as-1:GUS*-Hintergrund #19 und #32 (ko #19 bzw. ko #32) nach einwöchiger Keimung auf 2MS-Medium ohne und mit 0,5M Paraquat. Das Experiment wurde dreimal unabhängig reproduziert.

Das Besprühen von 4 Wochen alten Pflanzen der selben Linien mit 10 μ M Paraquat führte hingegen nicht zu einem erkennbaren Phänotyp (Daten nicht gezeigt; BROIN et al., 2000). Daher scheint die Wirkung des hervorgerufenen oxidativen Stresses auf frühe Entwicklungsstadien bzw. das direkte Auskeimen der Samen beschränkt zu sein. Keimlinge, die eine Woche nach Auskeimen auf 2MS-Medium, auf Paraquat-haltiges Medium umgesetzt wurden, zeigten nur noch ein schnelleres Ausbleichen der Blätter der ko-Linie im Gegensatz zur Ausgangs- und zur OE-Linie. Ihr Wachstum war aber nicht eingeschränkt (Daten nicht gezeigt).

5.12 Mikroarray-Analyse

In den bisherigen Analysen konnte der positive Einfluss von SCL14 auf das *as-1::GUS*-Konstrukt mehrfach gezeigt werden. Die Überexpression von SCL14 hatte jedoch nach SA-Induktion keinen Effekt auf die Expression von Genen mit *as-1*-ähnlichen Elementen im Promotor, wie beispielsweise *PRI*. Daher sollte mit Hilfe einer Mikroarray-Analyse nach möglichen Zielgenen von SCL14 gesucht werden.

Dafür wurden Blätter und Wurzeln von jeweils ca. 100, 25 Tage in Sterilkultur gewachsenen Pflanzen der Ausgangslinie, der Überexpressionslinie sowie der knock out-Linie #32, die sich ebenfalls im *as-1::GUS* Hintergrund befindet, für jede Linie getrennt zusammengefasst.

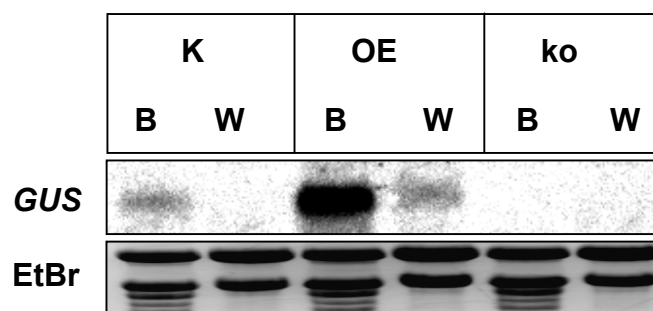


Abbildung 5.23: Northern Blot Analyse der für die Mikroarray-Analyse verwendeten RNA. Die Pflanzen der Ausgangslinie *as-1::GUS* (K), der Überexpressionslinie #5 (OE) sowie der ko-Linie im *as-1::GUS*-Hintergrund #32 (ko) wurden parallel unter Langtags-Bedingungen in Sterilkultur angezogen. Die Ernte des Pflanzenmaterials erfolgte nach 25 Tagen. Es wurden jeweils 10 μ g RNA aufgetragen. Für die Hybridisierung des Filters wurde eine *GUS*-Sonde verwendet. B: RNA aus Blättern, W: RNA aus Wurzeln

Aus dem Material wurde RNA extrahiert und mit einer Northern Blot Analyse auf die Stärke der *GUS*-Expression, als indirekter Nachweis für die Stärke der *SCL14*-Expression, untersucht. Das *GUS*-Signal ließ sich in der RNA aus Blättern der Überexpressionslinie am stärksten detektieren (Abbildung 5.23). Daher wurde für die nachfolgenden Mikroarray-Analysen RNA aus Blättern verwendet.

5.12.1 Analyse der verwendeten RNA

Für die Mikroarray-Analyse wurde die RNA mit Hilfe des „Amino Allyl Message Amp[™] II aRNA Amplification Kit“ der Firma Ambion zunächst in cDNA umgeschrieben. Die cDNA diente in einer *in vitro* Transkriptionsreaktion als Vorlage für die Synthese von aRNA unter Einbau von aminoallyl-UTP. In einem weiteren Reaktionsschritt wurden die aminoallyl-Reste mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 bzw. Cy5 gekoppelt. Alle Zwischenprodukte wurden noch einmal in einer Northern Blot Analyse mit einer *GUS*-Sonde überprüft (Daten nicht gezeigt). Insgesamt wurden sechs *Arabidopsis* Oligonukleotid Mikroarray-slides, auch „whole genome array“ genannt, hybridisiert (Tabelle 5.2), die Oligonukleotide von jeweils 29000 Genen beinhalteten (<http://www.ag.arizona.edu/microarray/>).

Tabelle 5.2: Design der Versuchsanordnung. In der linken Spalte ist jeweils die Nummer des Mikroarray-slides angegeben. In der mittleren und in der rechten Spalte werden die verwendeten RNA-Proben genannt. WT: *as-1::GUS*, OE: Überexpressionslinie #5, ko: knock out-Linie *as-1::GUS* ko #32, Cy3 bzw. Cy5: Farbmarkierungen.

Slide-nummer	Probe 1	Probe 2
ga01	WT-Cy3	ko-Cy5
ga02	OE-Cy3	ko-Cy5
ga03	WT-Cy3	OE-Cy5
ga04	WT-Cy5	OE-Cy3
ga05	OE-Cy5	ko-Cy3
ga06	WT-Cy5	ko-Cy3

5.12.2 Ergebnis der Mikroarray-Analyse

Das Ergebnis der Mikroarray-Analyse wurde von den Mitarbeitern des Transkriptomanalyselabors der Universität Göttingen berechnet. Anhand der von ihnen erstellten Graphen können Aussagen über die Qualität der Analyse getroffen werden. Zunächst wurden für jeden slide die detektierten Cy3- bzw. Cy5-Signalstärken gegeneinander verrechnet und linear aufgetragen (Daten nicht gezeigt). Bei einem „whole genome array“ ist für den experimentellen Ansatz zu erwarten, dass sich die Summe aller Signale zwischen den verglichenen Proben kaum unterscheidet. Daher wurden zur Normalisierung die Cy3 bzw. Cy5-Signale so aufeinander abgeglichen, dass die Summe aller Cy3-Signale der Summe aller Cy5 Signale entsprach (persönliche Mitteilung von Dr. Reiner Hitt, Transkriptomanalyselabor Universität Göttingen).

In Abbildung 5.24 sind für alle auf den Mikroarray-slides vorhandenen Gene die Unterschiede in der Expressionsstärke (=Kontrast) zwischen den beiden Proben gegen den p-Wert (probability-Wert) aufgetragen, der ein Maß für Zuverlässigkeit des Meßergebnisses ist. Für schwache Kontraste wurde zu Gunsten der Übersichtlichkeit der p-Wert gleich 1 gesetzt, so dass sich alle diese Punkte nun in der Linie am oberen Rand der Graphen wiederfinden.

Hat die Mehrheit der differentiell exprimierten Gene einen hohen p-Wert (Abbildung 5.24 links oben), was eine geringe Zuverlässigkeit bedeutet, so lässt das auf Fehler beim Auslesen des Arrays zum Beispiel durch Verschmutzungen schließen (persönliche Mitteilung Dr. Reiner Hitt). Die aus den mit Wildtyp und der Überexpressionslinie hybridisierten Arrays erhaltenen Daten sind daher als weniger zuverlässig zu betrachten. Die Graphen der mit der Ausgangslinie und der ko-Linie bzw. mit der OE-Linie und der knock out-Linie hybridisierten Arrays weisen eine „Tannenbaum“-Struktur auf, die darauf hindeutet, dass viele Gene deutlich differentiell reguliert sind.

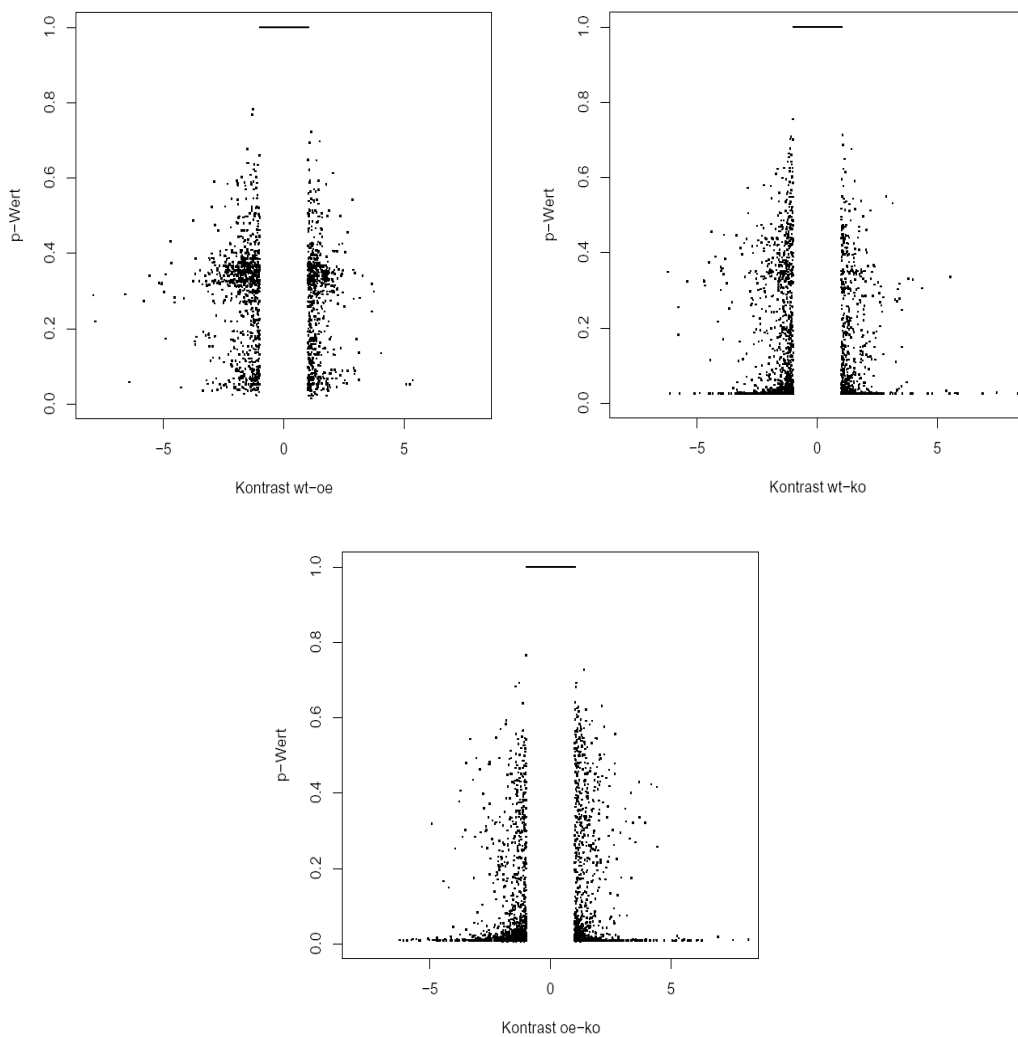


Abbildung 5.24: Auftragung des Kontrastes gegen die p-Werte der auf den Mikroarrays enthaltenen Gene. Die Daten aus dem mit Wildtyp und Überexpressionslinie hybridisierten Microarrays zeigen nicht die erwartete „Tannenbaumstruktur“, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass es sich hier bei den als am stärksten differentiell exprimiert angezeigten Genen um Artefakte handelt, und dass die beiden miteinander verglichenen Transkriptome darüber hinaus kaum Unterschiede zeigen. wt: Ausgangslinie *as-1::GUS*, oe: Überexpressionslinie, ko : SCL14-ko

Ein Gen (*PRI*, At2g14610) wurde exemplarisch ausgewählt, um die Zuverlässigkeit der Array-Ergebnisse in einer Northern Blot Analyse zu überprüfen. Dafür wurde die für den Mikroarray eingesetzte RNA mit einer radioaktiven *PRI*-Sonde hybridisiert (Abbildung 5.25). Das Ergebnis spiegelt die Berechnungen des Mikroarrays wider.

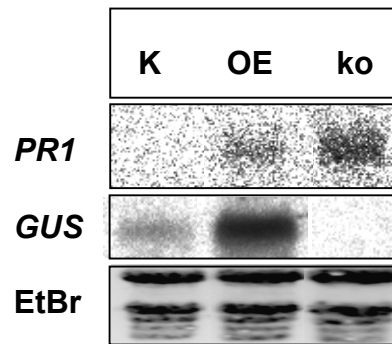


Abbildung 5.25: Northern Blot Analyse der für die Mikroarray-Analyse verwendeten RNA, um die Reproduzierbarkeit des Ergebnisses exemplarisch untersuchen zu können. Die Pflanzen der Ausgangslinie Col-0 –90 #6 (K), der Überexpressionslinie #5 (OE) sowie der ko-Linie im *as-1:GUS*-Hintergrund #32 (ko) wurden parallel unter Langtags-Bedingungen in Sterilkultur angezogen. Die Ernte des Blattmaterials erfolgte nach 25 Tagen. Es wurden jeweils 10 µg RNA aufgetragen. Für die Hybridisierung des Filters wurden eine *PR1* und eine *GUS*-Sonde verwendet.

5.12.3 Auswertung der Mikroarray-Analyse

SCL14 sollte erwartungsgemäß in der ko-Linie niedriger und in der OE-Linie höher als in der Ausgangslinie exprimiert sein. Die erhaltenen Zahlenwerte spiegeln dieses Verhältnis auch wider. Ein positiver Zahlenwert bedeutet hier eine verringerte Expression, ein negativer Wert eine erhöhte Expression gegenüber der Ausgangslinie.

Für die Auswertung der Mikroarray-Analyse wurden nur die Gene berücksichtigt, die im Vergleich zwischen der Ausgangslinie und der ko-Linie mindestens einen Kontrastwert von $-2,5$ bzw. $+2,5$ aufwiesen (Tabelle 5.4 bis 5.7). Von diesen Genen zeigte die Mehrheit eine Expressionsverstärkung in der ko-Linie gegenüber der Ausgangslinie.

Alle so erhaltenen Gene wurden in verschiedene Gruppen aufgeteilt. Zum einen erfolgte die Einteilung in zwei Gruppen mit Genen, die in der Überexpressionslinie entgegengesetzt zur ko-Linie reguliert werden, wie man es für potentielle Zielgene erwarten würde (Tabelle 5.4 und 5.5), und eine Gruppe mit Genen, die in der ko- und der Überexpressionslinie in die gleiche Richtung reguliert werden (Tabelle 5.6 und 5.7). In Tabelle 5.4 sind alle Gene zusammengefasst, die, wie SCL14, in der ko-Linie schwach und in der OE-Linie stark exprimiert werden. Umgekehrt regulierte Gene sind in Tabelle 5.5 aufgelistet. Nach dem gleichen Prinzip wurden auch die in die gleiche Richtung regulierten Gene unterteilt (Tabelle 5.6 und 5.7).

Tabelle 5.3: Einteilungsschema der Tabellen 5.4 bis 5.7 nach Richtung der Expression in der ko- sowie der OE-Linie. ↓: schwächer exprimiert als in der Ausgangslinie, ↑: stärker exprimiert als in der Ausgangslinie

	Expression in der ko-Linie	Expression in der OE-Linie
Tabelle 5.4	↓	↑
Tabelle 5.5	↑	↓
Tabelle 5.6	↓	↓
Tabelle 5.7	↑	↑

Von allen erhaltenen Genen wurden zunächst die Promotorbereiche auf das Vorkommen von TGA-Bindemotiven hin untersucht (Tabelle 5.4 bis 5.7). Dabei wurden sowohl TGACG- als auch reziproke CGTCA- sowie ACGT-Motive gesucht, die in dieser Form häufig in *as-1*-Elementen vorkommen (LAM *et al.*, 1989). Allerdings ließ sich hier kein bestimmtes Muster finden, das mit einer hohen oder niedrigen Expressionsstärke korreliert hätte. Es fällt jedoch auf, dass unter den 22 Genen, die in der ko-Linie schwach und in der OE-Linie stark exprimiert wurden, eine größere Anzahl von sogenannten perfekten *as-1*-Elementen mit einem Abstand von 12 Basenpaaren zwischen den Bindemotiven in den Promotorbereichen vorhanden sind (At5g61820, At3g14990, At2g29420, At2g05380). Insgesamt ist die Anzahl der TGA-Bindemotive in den Promotoren dieser Gene am höchsten (zum Vergleich siehe Tabelle 5.4 bis 5.7).

In einem zweiten Schritt wurde die Expression der gefundenen Gene nach Stressinduktion, in den verschiedenen Organen sowie in den verschiedenen Entwicklungsstadien untersucht. Zu diesem Zweck wurde eine *in silico* Analyse mit dem Programm Genevestigator/Metaanalyser der ETH Zürich durchgeführt. Es wurde nur eine Auswahl der verschiedenen Stressinduktionen dargestellt (Abbildung 5.26). Die verwendeten Farben spiegeln die Richtung der Regulation wider. Im Falle der Stressregulation bedeutet ein rotes Kästchen eine erhöhte Expression, ein grünes Kästchen entspricht einer erniedrigten Expression. Die Farbintensität gibt die Stärke der Regulation an. Je heller der Farbton, desto stärker die Regulation des jeweiligen Gens. Für die Expressionsanalysen in den verschiedenen Organen und Entwicklungsstadien

entspricht eine tiefe Blaufärbung einer starken, ein helles Blau einer schwachen Expression (Abbildung 5.27 und 5.28).

Die Expression von SCL14 wird nach den Genevestigator-Daten nur schwach reguliert. Allerdings wird die SCL14-Genexpression nach Seneszenz, Hitze, osmotischem, oxidativem und nach Salzstress leicht verstärkt. Außerdem ist bereits bekannt, dass SCL14 nach dunkel-induzierter Seneszenz eine verstärkte Expression zeigt (LIN und WU, 2004).

Gene, die in der ko-Linie schwächer exprimiert wurden als in der Ausgangslinie, sind durch Isoxaben, ein Cellulose Synthese Inhibitor, ebenso wie durch NPA, ein Inhibitor des Auxin Transports, und PCIB, ein Auxin Inhibitor, induzierbar (Abbildung 5.26A). Formal gesehen könnte dies bedeuten, dass SCL14 an der Expression dieser Gene beteiligt sein könnte. Allerdings wird SCL14 unter diesen Bedingungen nur schwach exprimiert. Die Behandlung mit den oben genannten Inhibitoren führte bei den Genen, die in der ko-Linie stark exprimiert wurden, zu einer Verringerung der Genexpression. Aber auch Seneszenz, osmotischer, oxidativer und Salzstress führten z.T. zu einer geringeren Expression der in der ko-Linie höher exprimierten Gene. Allerdings finden sich unter beiden Gruppen Ausnahmen.

Da in der Gruppe der Gene, die sowohl in der ko-Linie als auch in der OE-Linie schwach exprimiert wurden, nur vier der neun Gene in der Genevestigator-Datenbank erfasst waren, kann hier keine repräsentative Aussage über die Unterschiede in der Regulation getroffen werden (Abbildung 5.26B).

Des Weiteren wurde mit Hilfe der Genevestigator-Datenbank die Expression der einzelnen Gengruppen in den verschiedenen Organen einer Pflanze analysiert (Abbildung 5.27A und B). Dabei fiel zunächst auf, dass viele Gene, die in der ko-Linie eine schwache Expression aufwiesen, z.T. nur schwach in den Blättern exprimiert werden. Gene, die in der ko-Linie stark exprimiert wurden, werden hingegen auch in Blättern verstärkt exprimiert. Während die in der ko-Linie verstärkt exprimierten Gene nicht in Samen exprimiert werden, zeigen einige der in der ko-Linie schwächer exprimierten Gene dort eine erhöhte Expression. Zu diesen in den Samen verstärkt exprimierten Genen zählt auch *SCL14*, das mit zwei Genen der *NAM*-Familie (*At1g01720* und *At1g77450*), die ebenfalls in diese Gengruppe fallen, die stärkste Expression in Samen zeigt. Aus der Gruppe der Gene, die nicht differenziert exprimiert

wurden, wird nur ein Gen, das in der ko-Linie und in der OE-Linie eine verstärkte Expression gezeigt hat, auch in Samen exprimiert. Dabei handelt es sich um einen Glucose-6-Phosphat Translokator (At1g61800). Insgesamt werden auch die Gene, die sowohl in der ko-Linie als auch in der OE-Linie stark exprimiert wurden, in den Blattorganen verstärkt exprimiert.

Die Analyse der Expression der Gengruppen in den verschiedenen Entwicklungsstadien zeigte, dass die Gruppen der reziprok regulierten Gene auch in den Entwicklungsstadien reziprok reguliert werden (BOYES *et al.* 2001) (Abbildung 5.28A). Während die in der ko-Linie schwach exprimierten Gene hauptsächlich in den Stadien 0 bis 3 (Samen-Keimung bis Rosetten-Entwicklung) und 9 (Seneszenz) verstärkt exprimiert werden, zeigen die in der ko-Linie stark exprimierten Gene eine erhöhte Expression in den Entwicklungsstadien 2 bis 8 (u.a. Blütenbildung). Ausnahmen dazu sind die in der ko-Linie verstärkt exprimierten Gene At2g29420 (AtGSTU7), At1g02960 (*GST11*), At1g65500 (expr. Protein) und At5g42830 (Transferase Familie). Sie werden auch in Stadium 9 verstärkt exprimiert. Allerdings werden diese Gene durchgehend während der Entwicklung der Pflanze exprimiert.

Auch die nicht differenziert regulierten Gene werden reziprok während der Entwicklung einer Pflanze exprimiert. Auch die Mitglieder dieser Gruppe, die in der ko-Linie und der OE-Linie eine verstärkte Expression zeigten, werden verstärkt in den Entwicklungsstadien 0 bis 3 und 9 exprimiert.

Zusammenfassend scheint es für die Regulation der an der Seneszenz bzw. am Auskeimen der Samen beteiligten Gene auf die vorhandene Menge an SCL14 anzukommen.

Tabelle 5.4: Liste der reziprok regulierten und in der ko-Linie schwach exprimierten Gene, die in der vorliegenden Mikroarray-Analyse mindestens einen Kontrastwert von $-2,5$ bzw. $+2,5$ aufwiesen. Angegeben sind die Namen der Gene, die dazugehörigen AGI-Codes, die Kontrastwerte in den einzelnen Arrays sowie die dazugehörigen P-Werte. In den drei rechten Spalten ist die Anzahl der TGACG- bzw. CGTCA- bzw. ACGT-Motive in den jeweiligen Promotoren (1000bp stromaufwärts des Startcodons) angegeben. Die Zahlen in den Klammern geben die Abstände zwischen zwei Motiven wieder. 1!: Es handelt sich um zwei Motive mit einem Abstand von 12 bp (ein sogenanntes „perfektes“ *as-I*-Element). In der untersten Zeile ist die Summe der Motive angegeben. Für alle Gene, die einen Kontrast <1 zeigten, wurde der p-Wert gleich 1 gesetzt.

Gen Name		wt-oe Expr	wt-oe P-Wert	wt-ko Expr	wt-ko P-Wert	oe-ko Expr	oe-ko P-Wert	Anzahl TGACG- Motive	Anzahl CGTCA- Motive	Anzahl ACGT- Motive
cytochrome P450 family protein	At3g28740	-2.5	0.276	8.4	0.0258	10.8	0.0101	1	0	2
SCL14	At1g07530	-3.7	0.166	7.5	0.0283	11.2	0.01	0	0	1
UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	At1g05680	-1.8	0.296	6.9	0.0255	8.7	0.01	0	0	4
expressed protein MtN19, aldo/keto reductase family protein	At5g61820	-1.8	0.267	5.7	0.0268	7.6	0.0103	2 (1 !)	2	4
monooxygenase, putative (MO1)	At2g37770	-2.8	0.181	5.4	0.0327	8.2	0.0113	1	0	6
NADP-dependent oxidoreductase	At4g15760	-1.3	0.282	4.8	0.0255	6.1	0.0098	0	2 (13)	1
nitrilase 4 (NIT4)	At5g16980	-1.7	0.193	4.6	0.0255	6.3	0.0091	2	2	4
4-methyl-5(b-hydroxyethyl)-thiazole monophosphate biosynthesis protein	At5g22300	-1.8	0.111	4.0	0.0252	5.8	0.0083	1	0	3
no apical meristem (NAM) family protein c	At3g14990	-2.2	0.1	3.9	0.0252	6.1	0.0084	1	2	8 (1!)
ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase-related transporter-related	At1g01720	-1.3	0.168	3.9	0.0252	5.2	0.0083	0	2	5
short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein	At5g61950	-1.8	0.244	3.5	0.045	5.3	0.0147	0	0	3
GST25	At1g79410	-0.9	1	3.5	0.0252	4.4	0.0086	0	0	2
NADP-dependent oxidoreductase, putative (P1)	At4g13180	-2.1	0.169	3.4	0.0387	5.5	0.0119	0	1	2
no apical meristem (NAM) family protein	At2g29420	-2.2	0.14	3.3	0.0353	5.5	0.0107	2	2 (1 !)	4
glycine-rich protein (GRP3S)	At5g16970	-1.5	0.101	3.3	0.0252	4.7	0.0083	1	2	5
tolB protein-related	At1g77450	-1.9	0.0881	3.1	0.0253	5.1	0.0083	3	0	9
UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	At2g05380	-0.9	1	3.1	0.0293	4.0	0.0125	2	0	3 (1!)
PHD finger family protein	At4g01870	-0.9	1	2.8	0.0252	3.7	0.0089	0	1	3
GDSL-motif lipase/hydrolase family protein	At4g15490	-1.3	0.0721	2.7	0.0252	4.0	0.0083	0	0	0
cysteine proteinase, similar to RD21A	At5g63900	-1.7	0.0683	2.6	0.0252	4.3	0.0083	0	0	6
	At4g30140	-1.0	1	2.6	0.0252	3.6	0.0083	0	1	2
	At4g11320	-0.3	1	2.5	0.0272	2.8	0.0132	0	1	1
Summe der Motive pro 22 Gene								16	16	78

Tabelle 5.5: Liste der reziprok regulierten und in der ko-Linie stark exprimierten Gene, die in der vorliegenden Mikroarray-Analyse mindestens einen Kontrastwert von $-2,5$ bzw. $+2,5$ aufwiesen. Angegeben sind die Namen der Gene, die dazugehörigen AGI-Codes, die Kontrastwerte in den einzelnen Arrays sowie die dazugehörigen P-Werte. In den drei rechten Spalten ist die Anzahl der TGACG- bzw. CGTCA- bzw. ACGT-Motive in den jeweiligen Promotoren (1000bp stromaufwärts des Startcodons) angegeben. Die Zahlen in den Klammern geben die Abstände zwischen zwei Motiven wieder. 1!: Es handelt sich um zwei Motive mit einem Abstand von 12 bp (ein sogenanntes „perfektes“ *as-1*-Element). In der untersten Zeile ist die Summe der Motive pro 22 Gene (bezogen auf die Anzahl der Gene, die in der ko-Linie schwach und der OE-Linie stark exprimiert werden, Tabelle 5.4), angegeben. Für alle Gene, die einen Kontrast <1 zeigten, wurde der p-Wert gleich 1 gesetzt.

Gen Name		wt-oe Expr	wt-oe P-Wert	wt-ko Expr	wt-ko P-Wert	oe-ko Expr	oe-ko P-Wert	Anzahl TGACG- Motive	Anzahl CGTCA- Motive	Anzahl ACGT- Motive
WRKY4	At3g56400	0.8	1	-4.9	0.0269	-5.7	0.0122	0	2 (15)	4
GST1	At1g02930	0.5	1	-4.5	0.0252	-5.0	0.0099	0	0	3
GST11	At1g02960	0.2	1	-4.1	0.0252	-4.3	0.0091	0	0	0
aspartyl protease family protein	At5g10760	1.7	0.193	-4.1	0.0273	-5.8	0.01	2	0	1
disease resistance protein	At1g72910	0.3	1	-4.0	0.0252	-4.3	0.0086	0	2	0
expressed protein	At2g14560	2.1	0.144	-4.0	0.0272	-6.1	0.0093	2 (14)	1	5
calcium-binding EF hand family protein	At5g39670	0.5	1	-3.9	0.0252	-4.5	0.0084	0	0	1
expansin family protein (EXPR3)	At2g18660	0.4	1	-3.7	0.0252	-4.1	0.0102	1	0	3
ankyrin repeat family protein	At4g03450	1.1	0.231	-3.6	0.0252	-4.7	0.0090	0	1	1
expressed protein	At2g18690	1.2	0.325	-3.5	0.0404	-4.7	0.0163	2	0	3
ankyrin repeat family protein (ACD6)	At4g14400	2.5	0.0628	-3.4	0.0252	-6.0	0.0083	0	0	1
expressed protein	At3g22235	2.9	0.0958	-3.4	0.0358	-6.3	0.0097	1	3 (2x 15)	6
calmodulin-binding protein	At5g26920	0.6	1	-3.3	0.0259	-3.9	0.0113	0	1	1
hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	At5g19800	1.3	0.174	-3.3	0.0255	-4.7	0.0091	0	0	2
calcium-binding EF hand family protein	At3g47480	0.6	1	-3.2	0.0252	-3.8	0.0093	0	0	2
expressed protein	At5g25250	1.7	0.148	-3.2	0.0285	-4.9	0.0098	0	0	2
zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	At4g14365	2.2	0.0851	-3.2	0.0257	-5.4	0.0084	0	0	2
protein kinase-related	At3g46280	1.5	0.101	-3.1	0.0252	-4.6	0.0083	1	0	5
chitinase, putative	At2g43620	2.4	0.0884	-3.0	0.0295	-5.5	0.0089	1	0	2
expressed protein	At3g60420	0.6	1	-2.9	0.0252	-3.6	0.0089	0	0	1
ethylene-responsive element-binding family protein, similar to AtERF5	At5g61600	0.3	1	-2.9	0.0252	-3.2	0.0089	0	2	1

Gen Name		wt-oe Expr	wt-oe P-Wert	wt-ko Expr	wt-ko P-Wert	oe-ko Expr	oe-ko P-Wert	Anzahl TGACG- Motive	Anzahl CGTCA- Motive	Anzahl ACGT- Motive
AP2 domain-containing transcription factor	At5g51190	0.1	1	-2.9	0.0252	-3.0	0.0083	0	1	0
transferase family protein	At5g42830	0.4	1	-2.8	0.0252	-3.2	0.0095	0	0	6
TAZ zinc finger family protein	At4g37610	0.8	1	-2.8	0.0252	-3.6	0.0083	0	0	4
alpha 1,4-glycosyltransferase family protein	At3g09020	1.0	0.152	-2.8	0.0252	-3.8	0.0084	0	0	2
leucine-rich repeat transmembrane protein kinase	At1g35710	1.4	0.132	-2.8	0.0259	-4.2	0.0089	0	1	1
AtGSTU7	At2g29420	2.0	0.0909	-2.8	0.0274	-4.7	0.0087	2	2 (1 !)	4
WRKY6	At2g46400	0.4	1	-2.7	0.0259	-3.1	0.0117	1	1	2
kelch repeat-containing F-box family protein	At1g80440	0.4	1	-2.6	0.0269	-3.0	0.012	0	0	0
calmodulin-binding protein	At1g73805	0.6	1	-2.6	0.0259	-3.3	0.0106	2 (24)	1	1
zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	At5g27420	0.6	1	-2.6	0.0461	-3.2	0.0213	1	0	1
proline-rich extensin-like family protein	At5g19810	0.9	1	-2.6	0.0298	-3.6	0.0122	0	0	2
lysine and histidine specific transporter	At5g40780	0.3	1	-2.6	0.0252	-2.9	0.0094	0	0	0
protein kinase family protein	At4g11890	0.4	1	-2.5	0.0286	-2.9	0.0135	1	0	3
expressed protein	At1g65500	0.4	1	-2.5	0.0252	-3.0	0.0084	0	0	3
oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	At5g24530	2.2	0.0683	-2.5	0.0268	-4.7	0.0083	2 (14)	1	1
broad-spectrum mildew resistance RPW8 family protein	At3g50480	2.2	0.0683	-2.5	0.0265	-4.7	0.0083	1	0	4
Summe der Motive pro 22 Gene								0,9	0,9	3,6

Tabelle 5.6: Liste der Gene, die sowohl in der ko-Linie als auch in der OE-Linie schwach exprimiert wurden und in der vorliegenden Mikroarray-Analyse mindestens einen Kontrastwert von $-2,5$ bzw. $+2,5$ aufwiesen. Angegeben sind die Namen der Gene, die dazugehörigen AGI-Codes, die Kontrastwerte in den einzelnen Arrays sowie die dazugehörigen P-Werte. In den drei rechten Spalten ist die Anzahl der TGACG- bzw. CGTCA- bzw. ACGT-Motive in den jeweiligen Promotoren (1000bp stromaufwärts des Startcodons) angegeben. Die Zahlen in den Klammern geben die Abstände zwischen zwei Motiven wieder. !: Es handelt sich um zwei Motive mit einem Abstand von 12 bp (ein sogenanntes „perfektes“ *as-1*-Element). In der untersten Zeile ist die Summe der Motive pro 22 Gene (bezogen auf die Anzahl der Gene, die in der ko-Linie schwach und der OE-Linie stark exprimiert werden, Tabelle 5.4), angegeben. Für alle Gene, die einen Kontrast <1 zeigten, wurde der p-Wert gleich 1 gesetzt.

Gen Name	AT-Nr.	wt-oe Expr	wt-oe Padj	wt-ko Expr	wt-ko Padj	oe-ko Expr	oe-ko Padj	Anzahl TGACG- Motive	Anzahl CGTCA- Motive	Anzahl ACGT- Motive
hypothetical protein	At5g03090	5.2	0.0516	5.8	0.0252	0.6	1	1	0	3
expressed protein	At1g53480	5.1	0.0516	5.5	0.0252	0.4	1	0	0	1
auxin-responsive protein	At5g18030	1.5	0.225	3.3	0.0325	1.8	0.0765	0	0	2
xyloglucan:xyloglucosyl transferase,	At4g14130	0.5	1	3.0	0.0255	2.6	0.0173	0	0	1
protease inhibitor, putative DR4	At1g73330	0.0	1	2.6	0.0252	2.5	0.0087	0	0	3
SEN1	At4g35770	0.6	1	2.6	0.0252	2.0	0.0151	0	0	0
auxin-responsive proteins]	At5g18020	1.0	0.147	2.6	0.0252	1.6	0.0234	0	0	1
auxin-responsive protein	At5g18050	1.3	0.133	2.6	0.0257	1.3	0.0486	0	0	0
cysteine proteinase, similar to RD21A	At4g11320	-0.3	1	2.5	0.0272	2.8	0.0132	0	1	1
Summe der Motive pro 22 Gene								0,05	0,05	0,5

Tabelle 5.7: Liste der Gene, die sowohl in der ko-Linie als auch in der OE-Linie stark exprimiert wurden und in der vorliegenden Mikroarray-Analyse mindestens einen Kontrastwert von $-2,5$ bzw. $+2,5$ aufwiesen. Angegeben sind die Namen der Gene, die dazugehörigen AGI-Codes, die Kontrastwerte in den einzelnen Arrays sowie die dazugehörigen P-Werte. In den drei rechten Spalten ist die Anzahl der TGACG- bzw. CGTCA- bzw. ACGT-Motive in den jeweiligen Promotoren (1000bp stromaufwärts des Startcodons) angegeben. Die Zahlen in den Klammern geben die Abstände zwischen zwei Motiven wieder. 1!: Es handelt sich um zwei Motive mit einem Abstand von 12 bp (ein sogenanntes „perfektes“ *as-1*-Element). In der untersten Zeile ist die Summe der Motive pro 22 Gene (bezogen auf die Anzahl der Gene, die in der ko-Linie schwach und der OE-Linie stark exprimiert werden, Tabelle 5.4), angegeben. Für alle Gene, die einen Kontrast <1 zeigten, wurde der p-Wert gleich 1 gesetzt.

Gen Name	AT-Nr.	wt-oe Expr	wt-oe Padj	wt-ko Expr	wt-ko Padj	oe-ko Expr	oe-ko Padj	Anzahl TGACG- Motive	Anzahl CGTCA- Motive	Anzahl ACGT- Motive
PR-1	At2g14610	-6.4	0.0586	-9.6	0.0252	-3.2	0.056	0	2 (17)	3
MD-2-related lipid recognition domain-containing protein	At5g23820	-0.6	1	-6.1	0.0252	-5.6	0.0127	0	0	3
SAG12	At5g45890	-1.6	0.266	-5.7	0.0252	-4.1	0.0202	0	0	5
ZAT10	At1g27730	-0.3	1	-5.1	0.0252	-4.8	0.0106	0	0	5
expressed protein	At1g76960	-0.8	1	-4.5	0.0252	-3.6	0.0109	0	0	2
MD-2-related lipid recognition domain-containing protein	At5g23840	-0.4	1	-4.4	0.0252	-3.9	0.0083	0	0	2
protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	At3g22600	-2.9	0.0568	-4.0	0.0252	-1.1	0.102	0	2	2
FAD-binding domain-containing protein	At1g26390	-1.5	0.193	-3.7	0.0268	-2.2	0.0411	0	0	7
arabinogalactan-protein (AGP5)	At1g35230	-0.2	1	-3.3	0.0299	-3.1	0.0218	1	0	0
cytochrome P450 71B15, putative (CYP71B15)	At3g26830	-1.7	0.121	-3.2	0.0257	-1.5	0.0594	1	0	0
aminotransferase	At2g24850	-0.5	1	-3.2	0.0282	-2.7	0.0237	1	0	1
heavy-metal-associated domain-containing protein	At5g52760	-0.0	1	-3.2	0.0297	-3.2	0.0195	1	0	4
DNA-binding protein RAV1	At1g13260	-0.5	1	-3.1	0.0252	-2.7	0.0117	0	0	2
lipoxygenase (LOX2)	At3g45140	0.0	1	-3.1	0.0257	-3.1	0.0134	0	1	4
zinc finger (C2H2 type) family protein	At3g46080	-1.5	0.132	-3.0	0.0257	-1.5	0.0505	3 (1 !)	1	2
ZAT7	At3g46090	-0.7	1	-3.0	0.0252	-2.2	0.0134	2 (8)	2	2
chitinase, putative	At2g43570	-1.8	0.0683	-2.8	0.0252	-1.0	1	1	0	6
AP2 domain-containing transcription factor family	At1g21910	-0.7	1	-2.8	0.0252	-2.1	0.014	0	0	4
glucose-6-phosphate/phosphate translocator	At1g61800	-0.6	1	-2.8	0.0252	-2.2	0.0096	1	0	6
peroxidase, putative	At3g49120	-1.0	1	-2.7	0.0252	-1.7	0.022	0	0	2
expressed protein	At5g25260	-0.5	1	-2.7	0.0252	-2.2	0.0106	0	0	2

Gen Name	AT-Nr.	wt-oe Expr	wt-oe Padj	wt-ko Expr	wt-ko Padj	oe-ko Expr	oe-ko Padj	Anzahl TGACG- Motive	Anzahl CGTCA- Motive	Anzahl ACGT- Motive
protein kinase family protein	At4g04490	-0.4	1	-2.7	0.0252	-2.3	0.0135	0	1	6
FAD-binding domain-containing protein	At1g26380	-0.3	1	-2.6	0.0316	-2.3	0.0271	2	0	4
disease resistance protein	At1g57630	-0.3	1	-2.6	0.0475	-2.3	0.0433	0	0	2
CCR4-NOT transcription complex protein	At3g44260	-0.2	1	-2.6	0.0252	-2.5	0.0132	2	0	1
AAA-type ATPase family protein	At3g50930	-0.1	1	-2.6	0.0345	-2.5	0.0261	1	0	1
expressed protein	At3g13950	-0.1	1	-2.6	0.0333	-2.5	0.0248	1	0	3
expressed protein	At1g35210	-0.1	1	-2.6	0.03	-2.5	0.0215	0	1	1
AAA-type ATPase family protein	At1g43910	-0.8	1	-2.5	0.0252	-1.7	0.0125	1	0	4
Summe der Motive pro 22 Gene								0,8	0,5	3,9

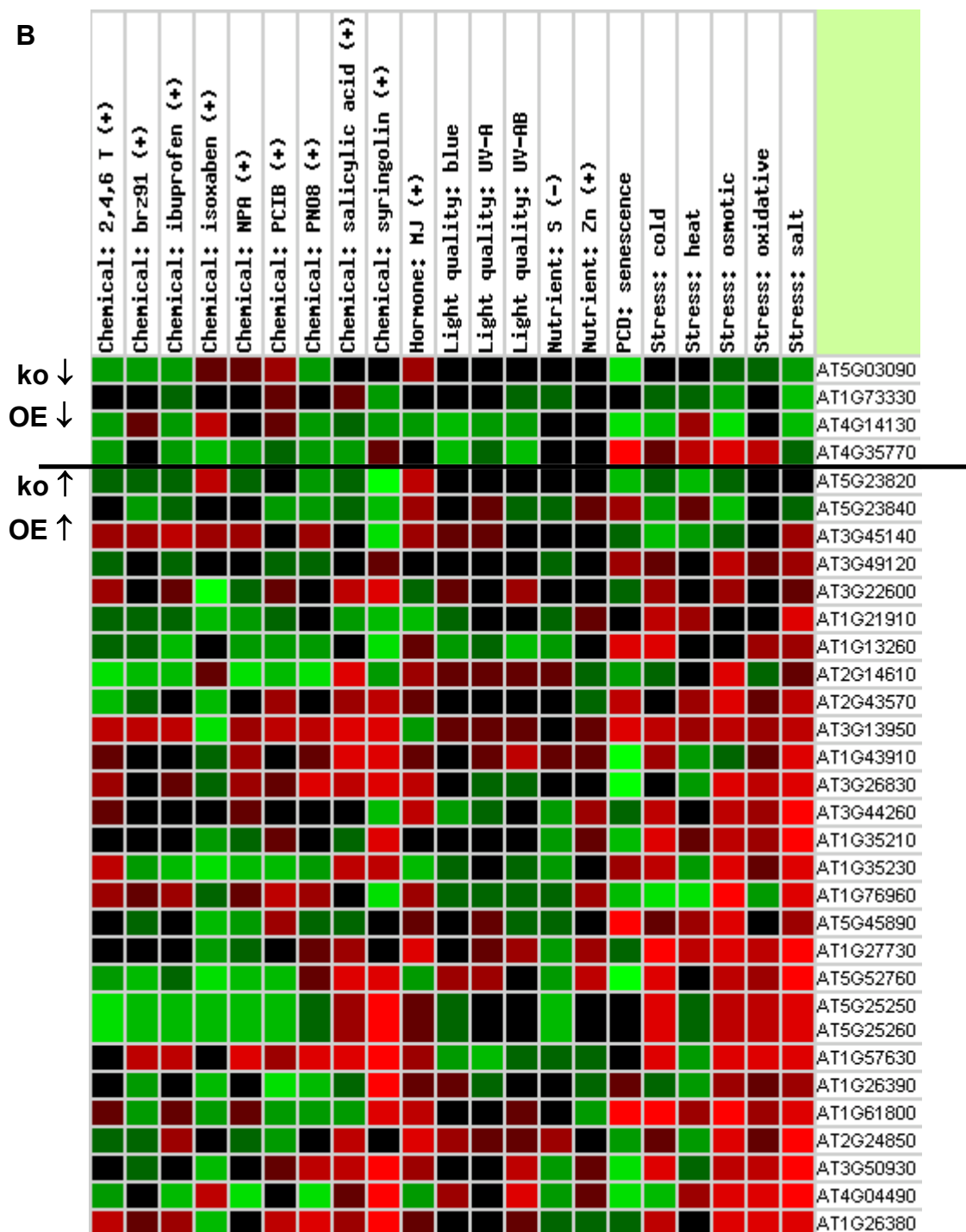


Abbildung 5.26: Darstellung der Expressionsstärke nach verschiedenen Stressen. Die Analyse wurde mit dem Programm Genevestigator/Metaanalyser durchgeführt. A: In dieser Abbildung sind die reziprok regulierten Gene dargestellt, d.h. deren Expression in der ko-Linie herunterreguliert bzw. in der OE-Linie verstärkt war. B: Hier wurden alle Gene zusammengefasst, die sich in der ko- und der OE-Linie nicht reziprok verhielten. In allen Abbildungen konnten nur die Gene berücksichtigt werden, die auch in der Genevestigator-Datenbank erfasst sind. Ein rotes Kästchen bedeutet eine verstärkte Expression, ein grünes Kästchen eine schwächere Expression und ein schwarzes Kästchen bedeutet, dass das Gen nicht reguliert wird. Die Helligkeit der Farbe gibt die Stärke der Regulation wieder.

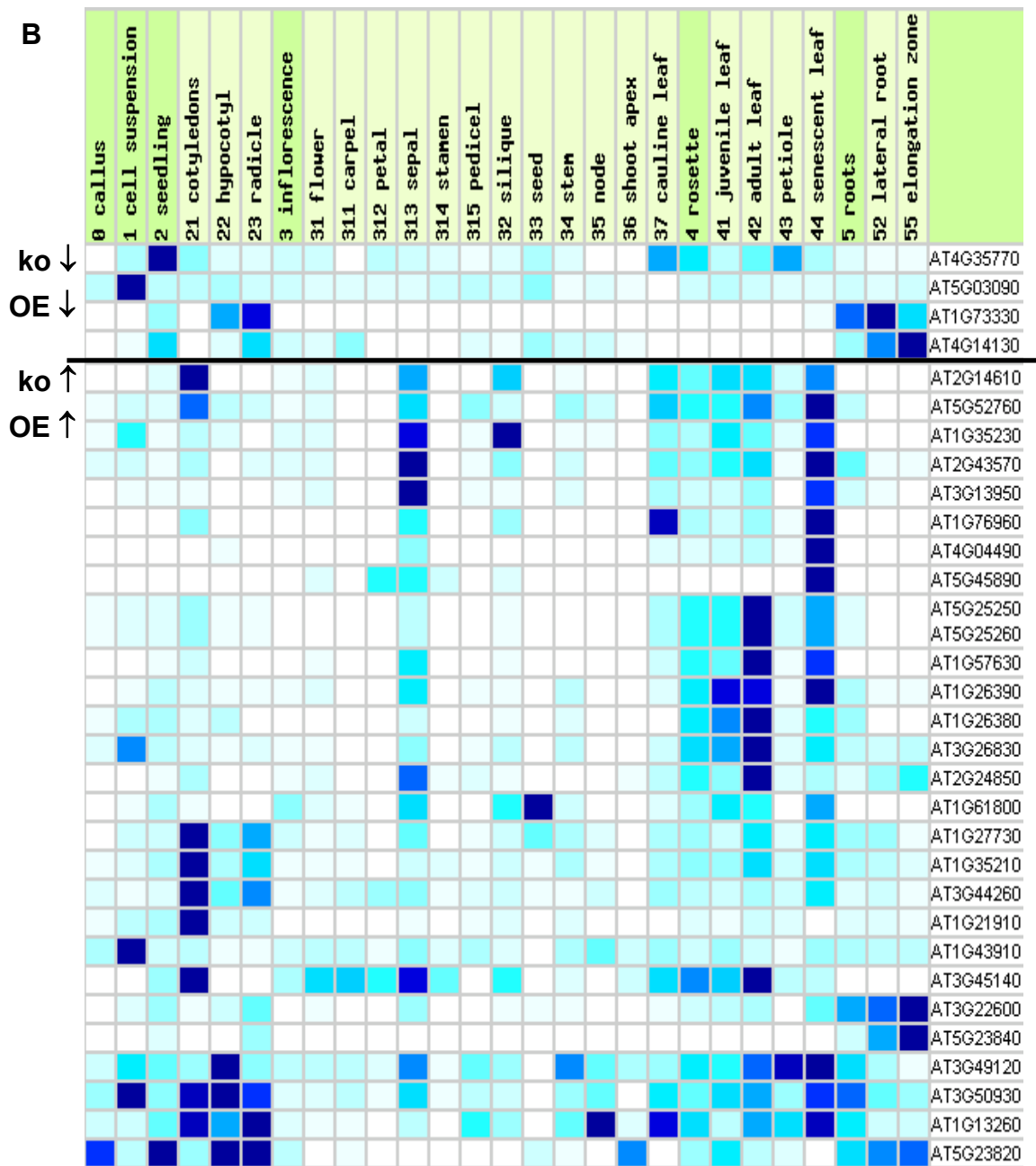


Abbildung 5.27: Darstellung der Expressionsstärke in den verschiedenen Pflanzenorganen. Die Analyse wurde mit dem Programm Genevestigator/Metaanalyser durchgeführt. A: In dieser Abbildung sind die reziprok regulierten Gene dargestellt, d.h. deren Expression in der ko-Linie herunterreguliert bzw. in der OE-Linie verstärkt war. B: Hier wurden alle Gene zusammengefasst, die sich in der ko- und der OE-Linie nicht reziprok verhielten. In allen Abbildungen konnten nur die Gene berücksichtigt werden, die auch in der Genevestigator-Datenbank erfasst sind. Die Farbe gibt die Stärke der Expression wieder, d.h. je dunkler, desto stärker exprimiert.

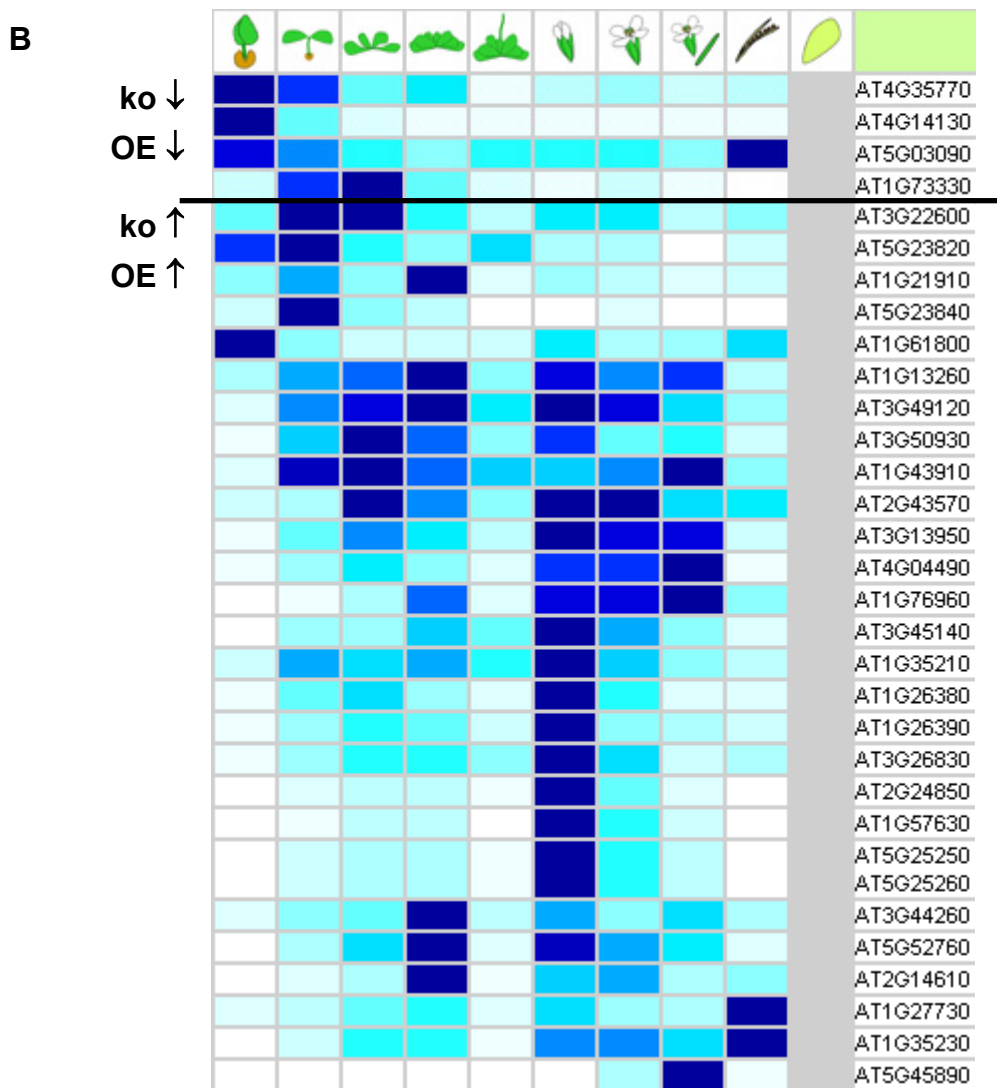


Abbildung 5.28: Darstellung der Expressionsstärke in den verschiedenen Entwicklungsstadien. Die Analyse wurde mit dem Programm Genevestigator/Metaanalyser durchgeführt. A: In dieser Abbildung sind die reziprok regulierten Gene dargestellt, d.h. deren Expression in der ko-Linie herunterreguliert bzw. in der OE-Linie verstärkt war. B: Hier wurden alle Gene zusammengefasst, die sich in der ko- und der OE-Linie nicht reziprok verhielten. In allen Abbildungen konnten nur die Gene berücksichtigt werden, die auch in der Genevestigator-Datenbank erfasst sind. Die Farbe gibt die Stärke der Expression wieder, d.h. je dunkler, desto stärker exprimiert.

6 Diskussion

Ein Beispiel für ein regulatorisches *cis*-Element, das durch Salizylsäure (SA), 2,4-D und ROS induziert werden kann, ist das *as-1*-Element (Abbildung 6.1). Transkriptionsfaktoren der TGA-Familie binden an das *as-1*-Element und führen zu seiner Aktivierung. Für TGA2 aus *Arabidopsis* konnte in Hefe gezeigt werden, dass er zwar an die DNA binden kann, aber kein eigenes Aktivierungspotential besitzt. In einem modifizierten Hefe Einhybridsystem (YOH), in dem TGA2 unfusioniert an ein dreifaches *as-1*-Element binden kann, konnte das unfusionierte Protein Scarecrow-like 14 (SCL14) als co-aktivierender Interaktionspartner isoliert werden (SIEMSEN, 2002). In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob SCL14 an der Regulation des *as-1*-Elements beteiligt ist.

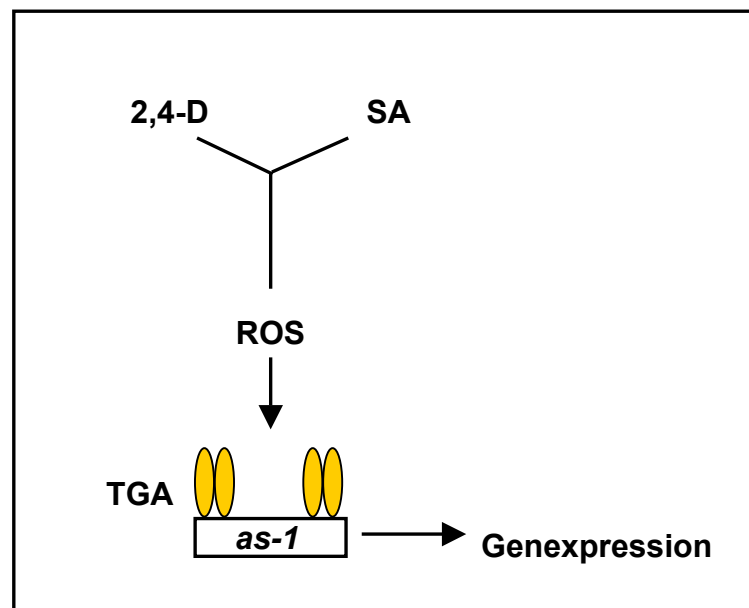


Abbildung 6.1: Hypothetisches Modell der Regulation des *as-1*-Elements. 2,4-D und SA aktivieren Signalwege, die die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) fördern. ROS-Akkumulation führt unter Beteiligung der TGA-Faktoren zu einer Aktivierung des *as-1*-Elements.

6.1 Überprüfung der Spezifität der TGA2-SCL14-Interaktion in heterologen Hefesystemen

Die Interaktion zwischen SCL14 und TGA2 bzw. TGA6 konnte bereits 2002 in einem modifizierten Hefe-Einhybridsystem (YOH) gezeigt werden (SIEMSEN, 2002). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde diese Interaktion mit der Interaktion zwischen TGA2 und dem bekannten Interaktionspartner NPR1, einem an der Ausbildung einer systemisch erworbenen Resistenz (SAR) beteiligten Protein, verglichen.

UQUILLAS *et al.* (2004) fanden heraus, dass NPR1 an SA-vermittelter Genexpression sogenannter „später“ Gene, die *as-1*-ähnliche Elemente in ihren Promotoren tragen und eine Proteinneusynthese benötigen, beteiligt ist. Gleichzeitig konnten sie zeigen, dass NPR1 nicht an der 2,4-D-vermittelten Aktivierung von „frühen“ Genen beteiligt ist.

Demnach scheint NPR1 in dem hypothetischen Modell der *as-1*-Aktivierung durch SA und 2,4-D unter Beteiligung von ROS unbeteiligt zu sein (Abbildung 6.1).

Im Hefe-Einhybridsystem ist das Aktivierungspotential von SCL14 deutlich nachweisbar (Abbildung 5.1). Die Aktivität des Reportergens kann durch eine Fusion von SCL14 an die GAL4-Aktivierungsdomäne (AD) noch gesteigert werden. Wenn TGA2 an das *as-1*-Element gebunden vorlag, führte die Interaktion von TGA2 mit AD-SCL14 zu einer deutlich stärkeren Aktivierung als die Interaktion mit AD-NPR1.

Im Anschluss wurden die Interaktionen im Zweihybridsystem (YTH) verglichen. Das YOH und das YTH unterscheiden sich u.a. dadurch, dass TGA2 im Einhybrid-System direkt an das *as-1*-Element gebunden vorliegt, während das Protein im Zweihybrid-System (YTH) über eine fusionierte GAL4-Bindedomäne (BD) an die DNA bindet. Ein entscheidender Unterschied ist, dass die Proteine im YOH unfusioniert vorliegen.

Die Interaktion des an die BD fusionierten TGA2 mit AD-SCL14 führt im YTH zu einer deutlich schwächeren Aktivierung als die Interaktion mit AD-NPR1 (Abbildung 5.2). AD-NPR1 ist daher im YTH ein stärkerer Interaktionspartner von TGA2 als AD-SCL14 und scheint die YTH-Bedingungen zu bevorzugen.

SCL14 scheint hingegen die Interaktion mit TGA2 zu bevorzugen, wenn TGA2 an das *as-1*-Element gebunden ist. Da SCL14, wenn TGA2 im Überschuss vorliegt, vom

TGA2-SCL14-Komplex weg titriert wird (SIEMSEN, 2002) und dies für eine gute Interaktion spricht, scheint es wahrscheinlich, dass die Interaktion zwischen TGA2 und SCL14 im YTH durch die amino-terminale BD-Fusion von TGA2 gestört wird.

Die schwächere Interaktion zwischen TGA2 und SCL14 unter YTH-Bedingungen hätte vermutlich nicht ausgereicht, um SCL14 als Interaktionspartner identifizieren zu können.

Die Transformation mit TGA5 führte im YTH-System nur zu einer schwachen Interaktion mit SCL14 (Abbildung 5.2). Eine insgesamt schwächere Affinität zwischen TGA5 und SCL14 könnte daher vermutet werden, zumal die Interaktion mit NPR1 vergleichbar mit der Interaktion zwischen NPR1 und TGA2 war. Möglicherweise liegt die Interaktionsdomäne zwischen den Aminosäuren 98 und 142, da sich beide Faktoren in diesem Bereich am meisten unterscheiden (siehe Anhang). TGA2 und TGA6, die beide eine starke Interaktion mit SCL14 gezeigt haben unterscheiden sich in diesem Bereich nur in 5 Aminosäuren.

Wäre TGA5 für den ursprünglichen Screen zur Identifizierung eines mit TGA-interagierenden Co-Aktivators eingesetzt worden, hätte SCL14 vermutlich nicht identifiziert werden können.

Es konnte erneut gezeigt werden, dass SCL14 nicht selber an das *as-1*-Element binden kann (SIEMSEN, 2002).

Des Weiteren wurde die Spezifität der TGA2-SCL14-Interaktion in Bezug auf SCL14-verwandte Proteine untersucht. Die aufgrund von Aminosäuresequenzhomologien nächstverwandten Proteine SCL26 (At1g07520) und SCL27 (At2g29060) wurden gemeinsam mit dem entfernter verwandten Protein SCL9 sowie WRKY54, einem nicht verwandten Protein, ausgewählt, um im YTH-System mit TGA2 getestet zu werden. Die Expression von SCL26 bzw. SCL27 führte in Hefezellen, die gleichzeitig TGA2 exprimierten, nur zu einer Aktivität des Reportergens, die mit der Hintergrundaktivität vergleichbar war (Abbildung 5.4).

SCL27 ist mit 1337 Aminosäuren ein sehr großes Protein. SCL14 umfasst hingegen nur 770 Aminosäuren. Der 316 Aminosäuren umfassende aminoternale Teil von SCL27

ist zu 50% identisch mit dem aminoterminalen Teil von SCL14, unterscheidet sich aber durch Fehlen einiger Bereiche (Abbildung 6.2 und 5.6). Der carboxyterminale Bereich von SCL14, ab Aminosäure 391, ist zu 78% identisch mit dem Bereich zwischen den Aminosäuren 317 und 694 von SCL27 (Abbildung 8.2). Innerhalb dieses Bereichs befinden sich u.a. die für die *GRAS*-Familie beschriebenen distinkten Domänen LHRI, VHIID, PFYRE und SAW. Für die Analyse der Interaktion mit TGA2 wurden die ersten 697 Aminosäuren von SCL27 verwendet.

Die mit WRKY54 und TGA2 transformierten Hefezellen zeigten erwartungsgemäß nur eine Hintergrundaktivität des Reportergens (Abbildung 5.4).

Da die drei verwandten Proteine im C-Terminus stark konserviert sind (siehe Anhang), ist anzunehmen, dass die Interaktionsdomäne im N-Terminus zu finden ist (Abbildung 5.6). Benjamin Fode ist es bereits gelungen, diese Domäne auf einen Bereich zwischen den Aminosäuren 160 und 380 einzugrenzen. Eine genauere Identifizierung steht noch aus.

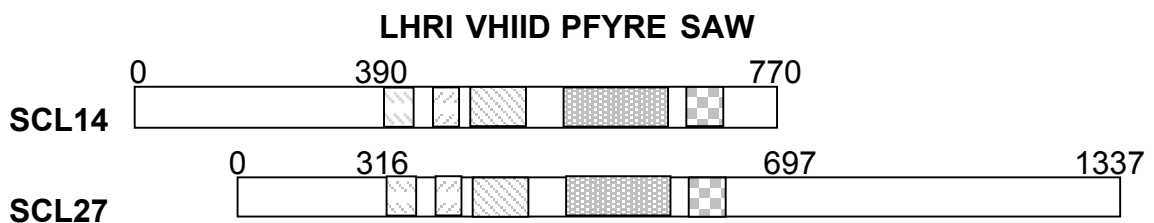


Abbildung 6.2: Domänenstruktur von SCL14 und SCL27 in Anlehnung an PYSH et al., 1999. Eingezeichnet wurden nur die Domänen LHRI, VHIID, PFYRE und SAW. LHRI: „Leucine Heptad Repeats“; VHIID, PFYRE, SAW: distinkte konservierte Domänen innerhalb der *GRAS*-Genfamilie

6.2 Einfluss von SCL14 auf *as-1*-vermittelte Expression

Der Einfluss von SCL14 auf die *as-1*-Element vermittelte Expression wurde zunächst in transient transfizierten Tabak BY-2-Protoplasten untersucht. In diesem System führte die Expression von SCL14 zu einer 3-4-fachen Steigerung der *as-1*-abhängigen Reporterogenaktivität gegenüber der Basalaktivität (Abbildung 5.8). Es ist wahrscheinlich, dass diese gesteigerte Aktivität durch Interaktion von SCL14 mit endogenen TGA-Faktoren verursacht wurde. Eine direkte DNA-Bindung ist eher unwahrscheinlich, da Untersuchungen in Hefe gezeigt haben, dass SCL14 alleine nicht an das *as-1*-Element binden kann (Kapitel 5.1).

Die Co-Transfektion eines Fusionsgens aus der GAL4-Bindedomäne (BD) und SCL14 mit einem *GUS*-Reportergen unter Kontrolle des GAL4-Promotors führte hingegen nur zu einer 1,8-fachen Steigerung der Reporterogenaktivität gegenüber der negativen Kontrolle (Abbildung 5.9). Dies deutet darauf hin, dass das Aktivierungspotential von SCL14 durch Interaktion mit weiteren Proteinen, u.a. mit TGA-Faktoren, die an die DNA binden, begünstigt wird, oder dass die BD-Fusion störend wirkt. Denkbar wäre auch, dass die positive Wirkung von SCL14 darauf beruht, dass SCL14 negativ-wirkende Faktoren vom *as-1*-Element weg rekrutiert und somit eine Aktivierung des *as-1*-Elements durch positiv-wirkende Faktoren ermöglicht. Aber eine direkte Aktivierung scheint wahrscheinlich, da sie auch in Hefe zu beobachten ist.

Die gemeinsame Expression von *SCL14* und dem *TGA2*-orthologen Faktor *TGA2.2* aus Tabak führte unter Verwendung des *as-1::GUS*-Reporters nicht zu einer Steigerung der Reporterogenaktivität, sondern blieb auf dem Niveau der Hintergrundaktivität (Abbildung 5.8). Bei Erhöhung der *TGA2.2*-Menge könnte SCL14 von der DNA weg rekrutiert werden. Dies hätte eine geringe Aktivität des Reportergenkonstrukts *as-1::GUS* zur Folge. Gestützt wird diese Annahme durch Beobachtungen in Hefe. In einem modifizierten Einhybridsystem führte eine geringe Menge an *TGA2* in Kombination mit SCL14 zu einem verstärkten Wachstum auf Selektivmedium, während eine Steigerung der *TGA2*-Menge zu geringerem Wachstum führte (SIEMSEN, 2002).

Die gemeinsame Expression von *SCL14* und *TGA1a* aus Tabak führte zu einer ähnlichen Aktivitätssteigerung gegenüber der Hintergrundaktivität, wie sie in Zellen, die nur mit *SCL14* transformiert worden waren, gemessen werden konnte (Abbildung 5.8). Im Gegensatz zur gemeinsamen Expression von *TGA2* und *SCL14*, wurde *SCL14* hier nicht von der DNA weg rekrutiert. Die Steigerung der Aktivität beruht wahrscheinlich auf einem additiven Effekt.

Der positive Einfluss von *SCL14* auf das *as-1*-Element konnte *in planta* sowohl auf RNA-Ebene als auch auf Proteinebene mit stabil transformierten Pflanzen nachgewiesen werden (Abbildung 5.12 und 5.13). Die Überexpression von *SCL14* bewirkte eine deutliche Steigerung der *as-1::GUS*-Expression, während Pflanzen, in denen *SCL14* nicht exprimiert wurde, eine verringerte *as-1::GUS*-Expression zeigten (Abbildung 5.16). Dies deutet auf eine essentielle Beteiligung von *SCL14* an der Aktivierung der *as-1*-vermittelten Expression hin.

Das verwendete Reportergenkonstrukt *as-1::GUS* reagierte in der *SCL14*-Überexpressionslinie (OE) relativ zum uninduzierten Zustand genauso stark auf eine Salizylsäure (SA)- bzw. 2,4-D-Induktion wie die Ausgangslinie *as-1::GUS* (Abbildung 5.13). In der ko-Linie ließ sich *as-1::GUS* hingegen nicht stimulieren (Abbildung 5.16). Die Beobachtungen deuten darauf hin, dass *SCL14* ein allgemeines Co-Aktivator-Protein ist, das die Expression mit und ohne SA bzw. 2,4-D erhöht.

Für die Untersuchung der ko-Linie war es entscheidend, dass die beiden nächstverwandten Proteine von *SCL14*, *SCL26* und *SCL27*, nicht mit *TGA2* interagieren können. Wäre dies doch der Fall, hätte eine mögliche Redundanz die Verwendung eines *SCL14/SCL26/SCL27* „triple knock out“ erforderlich machen können.

Neuere Untersuchungen von Benjamin Fode unterstützen das Vorhandensein eines TGA-*SCL14*-Komplexes am *as-1*-Element. Er konnte in Chromatin-Immunpräzipitations-Analysen (ChIP) zeigen, dass *SCL14* direkt oder indirekt an das *as-1*-Element bindet. Eine direkte Bindung ist jedoch unwahrscheinlich, da Untersuchungen in Hefe gezeigt haben, dass *SCL14* nicht an das *as-1*-Element binden

kann. Die bisherigen Daten legen nahe, dass SCL14 über Interaktion mit TGA2 in den Promotorkontext rekrutiert wird. Allerdings zeigen die CHIP-Daten von Benjamin Fode, dass die Überexpression von SCL14 nicht gleichzeitig zu einer erhöhten SCL14-Menge am *as-1*-Element führt. Daher scheint die Beteiligung eines Inhibitors an der Regulation der *as-1*-Aktivität wahrscheinlich.

Für die Aktivierung der *as-1*-vermittelten Expression wäre daher folgendes denkbar:

Zusätzlich zu TGA2 und SCL14, die sich im Zellkern befinden, könnte ein weiteres Protein, möglicherweise ein Inhibitor, die *as-1::GUS*-Aktivität beeinflussen. Dieser Inhibitor könnte durch SCL14 von dem an der DNA befindlichen TGA2-SCL14-Komplex aus dem Promotorkontext gezogen werden und eine Aktivierung der *as-1*-vermittelten Expression ermöglichen (Abbildung 6.3). Im Wildtyp bindet TGA2 konstitutiv an das *as-1*-Element. SCL14 führt zum einen durch Interaktion mit TGA2 zu einer Aktivierung, zum anderen zieht es einen putativen Inhibitor aus dem Promotorkontext. In der ko-Linie bleibt die Aktivierung der *as-1*-vermittelten Expression aus, da SCL14 fehlt. Bei Überexpression von SCL14 wird die Genexpression gegenüber dem Wildtyp noch verstärkt, da die größere Menge an SCL14 den putativen Inhibitor effektiver entfernen kann.

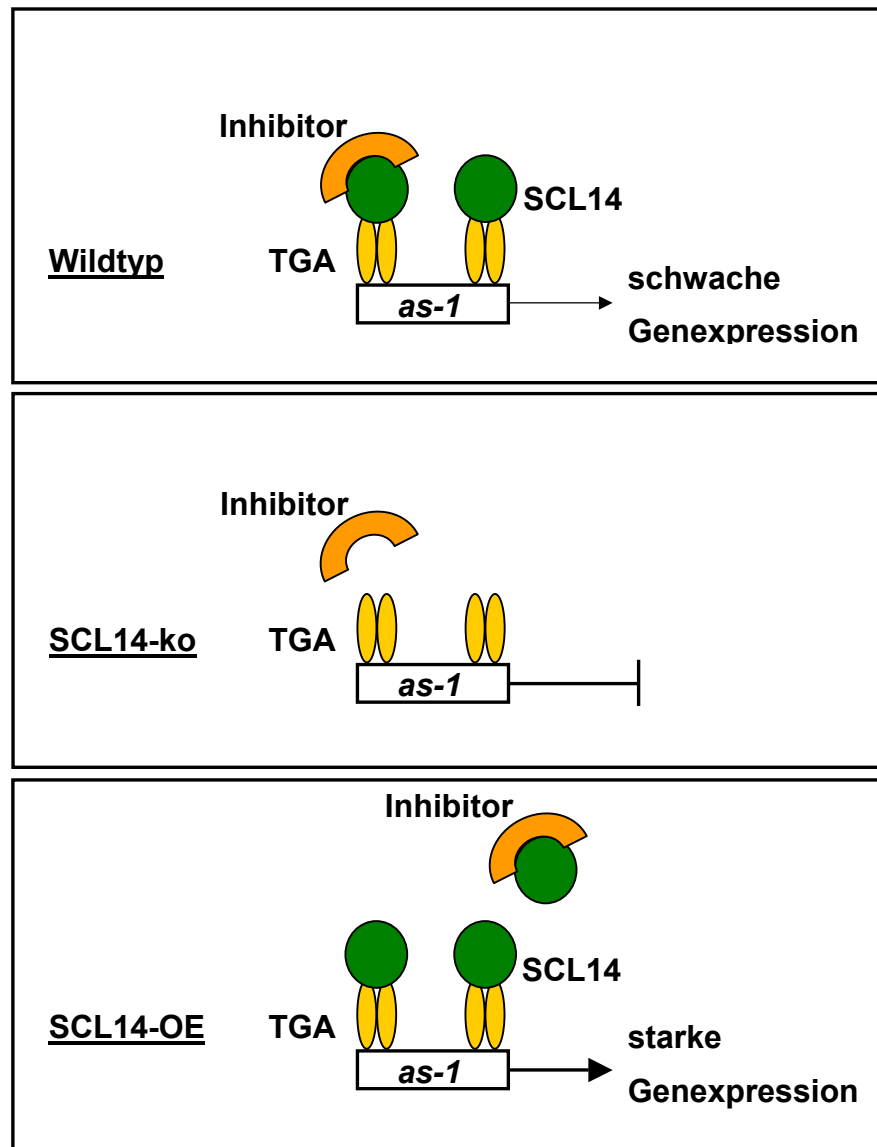


Abbildung 6.3: Hypothetisches Modell zur Aktivierung des *as-1*-Elements im Wildtyp sowie in der SCL14-ko- bzw. OE-Linie. Im Wildtyp bindet TGA2 konstitutiv an das *as-1*-Element. SCL14 aktiviert die Genexpression zum einen durch Interaktion mit TGA2, zum anderen zieht es einen putativen Inhibitor aus dem Promotorkontext und ermöglicht so die *as-1*-vermittelte Expression. In der ko-Linie kann die Genexpression nicht aktiviert werden, da SCL14 fehlt. Bei Überexpression von SCL14 wird die Genexpression gegenüber dem Wildtyp noch verstärkt, da die größere Menge an SCL14 den putativen Inhibitor effektiver entfernen kann.

6.3 Die Bedeutung der SCL14-Lokalisation für die Aktivierung des *as-1*-Elements

SCL14 ist sowohl im Zellkern als auch im Cytosol lokalisiert. Außerdem ist bekannt, dass SCL14 mit dem Kernexportrezeptor XPO1 interagieren kann (Thomas MERKLE, unveröffentlicht). Der TGA2-orthologe Transkriptionsfaktor TGA2.2 aus Tabak ist im Gegensatz zu SCL14 ausschließlich im Zellkern lokalisiert (Abbildung 5.10). KANG et al. (2005) konnten ebenfalls zeigen, dass TGA2 aus *Arabidopsis thaliana* vorwiegend im Zellkern zu finden ist.

Da die in der Zelle vorhandene Menge an SCL14 möglicherweise über die Stärke der *as-1*-vermittelten Expression entscheidet, wurde dieser Einfluss durch Inhibierung des SCL14-Kernexports überprüft. Mit Hilfe der Chemikalie Leptomycin B (LMB) ist es möglich, verschiedene Kernexportrezeptoren, u.a. XPO1, zu blockieren (FUKUDA et al., 1997; KUDO et al., 1999; WOLFF et al., 1997; TUNAC et al., 1985). Die Verwendung von LMB führte in mit SCL14-GFP transient transfizierten BY-2-Protoplasten, zu einer ausschließlichen Lokalisierung im Kern. Daraus lässt sich schließen, dass der Kernexportrezeptor XPO1 für die cytosolische Lokalisation von SCL14 verantwortlich zu sein scheint.

Eine Inhibierung des Kernexports durch LMB hatte jedoch keinen Einfluss auf die Aktivität des *as-1::GUS*-Konstrukts. Allerdings verhindert LMB den Kernexport nur kurzfristig. Es ist möglich, dass eine längerfristige Fixierung von SCL14 im Zellkern zu einem Effekt geführt hätte. Eine langfristige Fixierung von SCL14 im Cytosol ist durch Fusion mit der Bindedomäne des Glucocorticoidrezeptors (GR) möglich.

Es wurden Pflanzen hergestellt, in denen SCL14 über eine Fusion mit GR außerhalb des Zellkerns gehalten wird. In uninduziertem Zustand bildet die GR-Domäne mit zellulären Proteinen, u.a. mit dem Hitzeschock-Protein 90 (HSP90), einen Komplex, wodurch das Fusionsprotein außerhalb des Kerns gehalten wird (PICARD und YAMAMOTO, 1987). Durch Induktion mit dem Glucocorticoid Dexamethason und der Bindung dieses Hormons an die GR-Domäne dissoziiert das Fusionsprotein von HSP90 und das „freie“ SCL14-Fusionsprotein kann in den Zellkern transportiert werden (Abbildung 5.18A).

Allerdings konnte der Versuch zunächst nur mit Pflanzen durchgeführt werden, die zusätzlich zum *SCL14-GR*-Fusionsgen noch das endogene *SCL14* exprimierten. In uninduziertem Zustand zeigte die *SCL14-GR*-Linie bereits eine erhöhte *as-1::GUS*-Aktivität gegenüber der Ausgangslinie (Abbildung 5.18B). Dies könnte entweder auf eine unvollständige Inaktivierung des Fusionsproteins hindeuten, oder dafür sprechen, dass das Vorhandensein von *SCL14* außerhalb des Zellkerns bereits einen positiven Einfluss auf das *as-1*-Element hat. Durch Dexamethason-Induktion konnte die *as-1::GUS*-Aktivität in diesen Pflanzen gesteigert werden (Abbildung 5.18B). Dies könnte auf eine zusätzliche Menge an *SCL14-GR* zurückzuführen sein, die dabei in den Zellkern gelangt ist. In diesem Fall würde *SCL14* sowohl im Zellkern als auch außerhalb im Cytosol einen positiven Einfluss auf die Aktivierung des *as-1*-Elements ausüben. Alternativ wäre es auch möglich, dass *SCL14-GR* einen Inhibitor aus dem Kern transportiert.

Für die Regulation der *as-1*-vermittelten Genexpression in den *SCL14-GR*-Linien ist folgendes Modell denkbar:

Die untersuchte *SCL14-GR*-Linie befindet sich im Wildtyp (WT)-Hintergrund und enthielt zusätzlich endogenes *SCL14*. In uninduziertem Zustand zieht die große Menge an *SCL14-GR* im Cytosol den putativen Inhibitor aus dem Kern (Abbildung 6.4). Endogenes *SCL14* kann dadurch die *as-1*-vermittelte Genexpression aktivieren. Allerdings reicht es nicht aus, dass *SCL14-GR* im Cytosol in großer Menge vorliegt, da der Inhibitor vermutlich wieder zurück in den Kern gelangen kann. Es scheint daher wahrscheinlich, dass ein „Shuttling“ von *SCL14* nötig ist, um den Inhibitor wieder aus dem Zellkern zu befördern.

Durch Induktion mit Dexamethason (Dex) kann eine größere Menge an *SCL14-GR* in den Zellkern gelangen und beim erneuten Export den Inhibitor aus dem Kern ziehen. Dadurch wird eine stärkere Aktivierung der Genexpression bewirkt.

Des Weiteren könnte in das Modell passen, dass *SCL14* wahrscheinlich über den XPOI-vermittelten Export aus dem Zellkern transportiert wird, und dass die Inhibierung dieses Exports keinen deutlichen Einfluss auf die Aktivität des *as-1*-Elements gezeigt hat.

Vermutlich ist das „Shuttling“ von SCL14 erforderlich, um den putativen Inhibitor aus dem Zellkern zu befördern, und so die Transkription zu ermöglichen.

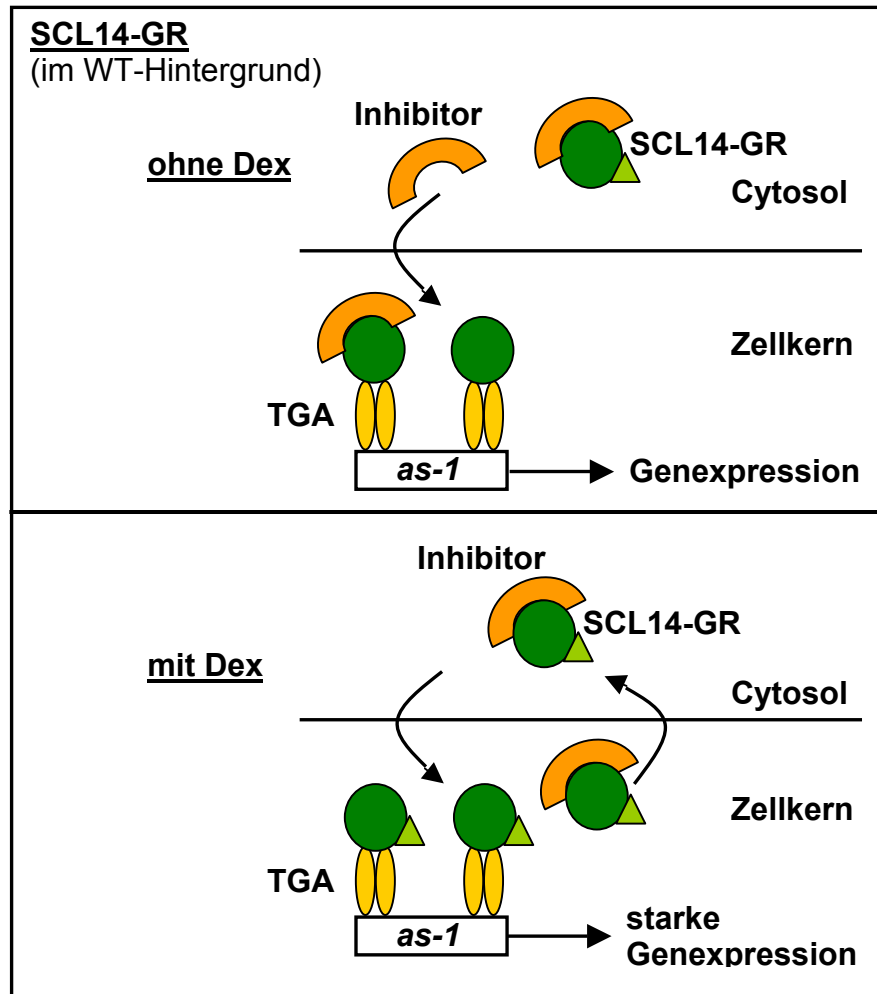


Abbildung 6.4: Hypothetisches Modell zur Aktivierung des *as-1*-Elements in der SCL14-GR-Linie im Wildtyp (WT)-Hintergrund. Die große Menge an SCL14-GR zieht in uninduziertem Zustand den putativen Inhibitor aus dem Kern, der durch einen „Shuttling“-Mechanismus wieder in den Kern gelangen kann. Endogenes SCL14 aktiviert die *as-1*-vermittelte Genexpression. Durch Induktion mit Dexamethason (Dex) kann eine größere Menge an SCL14-GR in den Zellkern gelangen und dadurch eine stärkere Aktivierung der Genexpression bewirken. Vermutlich ist das „Shuttling“ von SCL14 erforderlich, um den putativen Inhibitor aus dem Zellkern zu befördern, und so die Transkription zu ermöglichen.

6.4 SCL14 scheint nicht an der pflanzlichen Pathogenabwehr beteiligt zu sein

Promotoren mit *as-1*-ähnlichen Elementen wurden bereits als Pathogen-induzierbar beschrieben (STROMPEN *et al.*, 1998; LEBEL *et al.*, 1998). Es war jedoch nicht möglich, den Einfluss von SCL14 auf endogene Promotoren mit *as-1*-ähnlichen Elementen, beispielsweise den *PRI*-Promotor, zu zeigen. Auch auf die Expression von *GST6*, eines Gens, dessen Promotor ebenfalls ein *as-1*-ähnliches Element enthält, konnte für SCL14 kein Einfluss gezeigt werden, da sowohl in der OE- als auch in der ko-Linie starke Schwankungen in der *GST6*-Expressionsstärke auftraten (Daten nicht gezeigt). Es ist daher denkbar, dass das *as-1*-Element im Promotorkontext nur eine untergeordnete Rolle spielt und die Regulation am *as-1*-Element durch Reaktionen an anderen *cis*-Elementen überdeckt wird.

Da SCL14 einen positiven Einfluss auf die Regulation des isolierten *as-1*-Elements ausübt, lag die Möglichkeit nahe, dass SCL14 an der Pathogenabwehr beteiligt sein könnte, obwohl kein Einfluss von SCL14 auf die Expression des an der Abwehr beteiligten Gens *PRI* nachgewiesen werden konnte. Die nach Pseudomonaden-Infiltration durchgeführten Bestimmungen des Bakterientiters in den transgenen Linien unterlagen großen Schwankungen (Daten nicht gezeigt). Die ko-Linie schien dabei z.T. resistenter als die Ausgangslinie *as-1::GUS*. Dies ließ sich jedoch nicht konstant reproduzieren. Auch die Expression von *PRI* und *ICS1*, einem Gen, das an der SA-Synthese beteiligt ist und somit indirekt auch an systemisch erworbener Resistenz (SAR), schwankte nach Behandlung mit Pseudomonaden stark (Daten nicht gezeigt). Es ist daher davon auszugehen, dass SCL14 wahrscheinlich keinen entscheidenden Einfluss auf die pflanzliche Pathogenabwehr gegen Pseudomonaden ausübt. Es ist jedoch möglich, dass SCL14 die Abwehr gegen andere Pathogene beeinflussen könnte.

6.5 Expression von SCL14 unter abiotischem Stress

Da SCL14 einen positiven Einfluss auf die Aktivierung des *as-1*-Elements ausübt, der sich besonders deutlich in der OE-Linie zeigen lässt, aber unabhängig von den bekannten Stimuli wie SA oder 2,4-D zu sein scheint, wurde nach Bedingungen gesucht, unter denen die Expression von SCL14 verstärkt wird. LIN und WU (2004) konnten in einer Mikroarray-Analyse mit dunkel-induzierten *Arabidopsis* Blättern zeigen, dass die Expression von *SCL14* unter diesen Bedingungen erhöht ist. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (Abbildung 5.20). Zusätzlich wurde eine erhöhte SCL14-Expression nach Behandlung mit 200 ppm Ozon gefunden (Abbildung 5.21). Die Gemeinsamkeit beider Prozesse liegt darin, dass in ihrem Verlauf reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen (BUCHANAN-WOLLASTON et al., 2003; OVERMYER et al., 2000; PELLINEN et al., 1999; RAO und DAVIS, 1999; RAO et al., 2000b; SCHRAUDNER et al., 1998; JABS, 1999; LAMB und DIXON, 1997). Die Expression von *SCL14* könnte also durch ROS induziert werden. Ein möglicher Hinweis auf die ROS-induzierte Expression ist, dass *SCL11*, ein verwandtes Gen der *GRAS*-Familie, bereits in Tabak als H₂O₂-induzierbar beschrieben wurde (MAXWELL und MCINTOSH, 2002). Zusätzlich spricht dafür, dass GARRETÓN et al. (2002) zeigen konnten, dass die SA-vermittelte Induktion eines (*as-1*)/*GUS*-Konstrukts im Licht stärker ist, als im Dunkeln. Sie führten dies auf einen erhöhten Gehalt an ROS zurück. Eine Beteiligung von SCL14 an dieser vermutlich durch ROS verstärkten Induktion kann nicht ausgeschlossen werden.

Die Expression von SCL14 wird durch dunkel-induzierte Seneszenz erhöht (LIN und WU, 2004). Da es in der Seneszenz zu einer Erhöhung der zellulären ROS kommt (BUCHANAN-WOLLASTON et al., 2003), würde dies zu einer Beteiligung von SCL14 an der Antwort auf einen erhöhten ROS-Gehalt passen.

Verschiedenen Studien zufolge bewirkt Ozon eine Induktion der hypersensitiven Reaktion (HR) (RAO et al., 2000a; SANDERMANN et al., 1998; SHARMA et al., 1996). Dabei aktiviert Ozon einen oxidativen „burst“, ähnlich dem der bei der Abwehr gegen manche Pathogene auftritt, der zur Akkumulation von ROS führt (OVERMYER et al., 2000; PELLINEN et al., 1999; RAO und DAVIS, 1999; RAO et al., 2000b;

SCHRAUDNER et al., 1998; JABS, 1999; LAMB und DIXON, 1997). Dies legt den Schluss nahe, dass die Expression von SCL14 auch durch Pathogen-Infektion erhöht wird. Da dies aber nicht der Fall ist (Daten nicht gezeigt), scheint die erhöhte *SCL14*-Expression nach Ozon-Behandlung auf einem anderen Mechanismus als auf einer Induktion in Folge eines oxidativen „bursts“ zu beruhen. Möglicherweise reagiert die *SCL14*-Expression auch nur auf bestimmte ROS, die im Verlauf einer Pathogenabwehr nicht oder nur in geringen Mengen entstehen könnten.

6.6 Keimungsverhalten transgener Pflanzen unter oxidativem Stress

ROS werden in der Pflanze u.a. während der Keimung produziert (PUNTARULO et al., 1991) und ihre Detoxifizierung ist für die Keimlinge entscheidend. Sollte SCL14 tatsächlich an der Reaktion auf erhöhten ROS Produktion beteiligt sein, könnten Unterschiede im Keimungsverhalten von SCL14-OE- bzw. SCL14-ko-Samen zu erwarten sein. Daher wurde untersucht, ob SCL14-OE- bzw. SCL14-ko-Samen ein differenziertes Keimungsverhalten unter oxidativen Stressbedingungen, im Vergleich zur Ausgangslinie *as-1::GUS* zeigen. Mit Hilfe von Paraquat, auch Methylviologen genannt, kann die Bildung von ROS, wie Superoxid-Anionen und H₂O₂, hervorgerufen werden (BOWLER et al., 1991). Tatsächlich konnten die Samen der SCL14-ko-Linie auf Paraquat-haltigem Medium und somit unter oxidativem Stress, nur bis zu einem Entwicklungsstadium von 0,7 auskeimen (BOYES et al., 2001), wohingegen die SCL14-OE-Linie sowie die Ausgangslinie ein normales Keimungsverhalten zeigten (Abbildung 5.22). Dies deutet auf eine mögliche Beteiligung von SCL14 an der Detoxifizierung hin. Bei Vorhandensein könnte SCL14 möglicherweise zu einem Abbau von ROS beitragen. Ein Fehlen von SCL14 scheint hingegen dazu zu führen, dass vermutlich toxische ROS-Konzentrationen in den Samen erreicht werden, die ein weiteres Auskeimen verhindern. Weitere Keimungsstudien beispielsweise unter osmotischem Stress, in dessen Verlauf ebenfalls ROS entstehen, bzw. in Anwesenheit von Inhibitoren, die die Bildung von ROS unterbinden, wären in diesem Zusammenhang interessant.

Obwohl *SCL14* laut PYSH et al. (1999) ubiquitär exprimiert wird, sprechen die Daten der Genevestigator-Datenbank für Mikroarray-Analyse-Ergebnisse für einen besonders hohen RNA-Gehalt in trockenen Samen (Abbildung 5.27). Nach Imbibition, d.h. erneuter Bewässerung, nimmt der Gehalt an *SCL14*-RNA sehr schnell ab. Ein wichtiger Aspekt bei Austrocknung ist der Schutz gegen freie Radikale (LEPRINCE et al., 1993). Während verschiedene antioxidative Systeme, unter Beteiligung von Katalasen (CAT), Superoxid-Dismutasen (SOD) und Peroxidasen (PER), im sich entwickelnden Samen aktiv sind, spielen sie in trocknenden und ruhenden Samen eine untergeordnete Rolle (CAKMAK et al., 1993; PUNTARULO et al., 1991; SCANDALIOS, 1987). *SCL14* könnte an der Regulation antioxidativer Prozesse in austrocknenden Samen, die möglicherweise unabhängig von CAT, SOD und PER ablaufen, beteiligt sein.

Interessanterweise konnten HASLEKÅS et al. (2003) bei Überexpression des Peroxiredoxins *AtPER1* ebenfalls ein schlechteres Auskeimen in Anwesenheit von Paraquat, NaCl und Mannitol, also unter oxidativem Stress, Salzstress und unter osmotischem Stress beobachten. Peroxiredoxine schützen Lipide, Enzyme und DNA vor ROS. Zudem wird *AtPER1* ebenfalls verstärkt in trockenen Samen gebildet, und die Transkriptmenge wird infolge von Imbibition verringert. HASLEKÅS et al. postulierten daher, dass *AtPER1* eine Keimung unter ungünstigen Umweltbedingungen verhindern kann. Allerdings scheint die Aufgabe von *SCL14* nicht darin zu bestehen, ein Auskeimen unter ungünstigen Bedingungen zu verhindern, sondern sie zu ermöglichen.

6.7 Identifizierung potentieller Zielgene von *SCL14*

Da bisher keine potentiellen Zielgene von *SCL14* bekannt waren, wurde mit Pflanzen der Ausgangslinie *as-1::GUS*, der *SCL14*-OE- sowie der ko-Linie in Mikroarray-Analysen nach möglichen Zielgenen gesucht. Im Rahmen dieser Analysen konnte *Cytochrom P450 (CYP81D11; At3g28740)* als potentieller Kandidat identifiziert werden, da es sich in den Mikroarray-Analysen wie *SCL14* verhielt, d.h. in der ko-Linie

niedrig exprimiert und in der OE-Linie stark exprimiert vorlag. *CYP81D11* war in den Analysen von allen identifizierten Genen am stärksten reguliert.

CYP81D11 wurde von NARUSAKA et al. (2004) bereits in weiteren Mikroarray-Analysen untersucht. Sie fanden heraus, dass *CYP81D11* sowohl durch *Alternaria brassicicola*, als auch durch SA, Jasmonsäure (JA), Paraquat, NaCl und Abscisinsäure (ABA) induzierbar ist. Allerdings ist die von ihnen gezeigte Expression nach Paraquat-Induktion nur gering.

Im 1000 bp stromaufwärts des Transkriptionsstartpunkts gelegenen Promotorbereich von *CYP81D11* befinden sich ein TGACG- sowie zwei ACGT-Motive, die als mögliche TGA-Faktor-Bindestellen fungieren könnten. Allerdings enthält dieser Bereich kein vollständiges *as-1*-ähnliches Element, sodass eine Regulation der *CYP81D11*-Expression durch TGA-Faktoren, möglicherweise unter Beteiligung einer SCL14-Interaktion, eher unwahrscheinlich ist. Es ist jedoch denkbar, dass SCL14 entweder über andere Transkriptionsfaktoren oder durch direkte Bindung an den *CYP81D11*-Promotor die Expression von *CYP81D11* aktiviert. *CYP81D11* ist ein aussichtsreicher Kandidat für ein potentiell Zielgen von SCL14, da es als Monooxygenase an der Katalyse verschiedener oxidativer Reaktionen beteiligt ist. Allerdings wird *CYP81D11* laut Genevestigator-Datenbank im Gegensatz zu SCL14 nicht verstärkt im Samen oder in seneszenten Pflanzen exprimiert.

Den Genevestigator-Daten zufolge werden *CYP81D11* und *SCL14* u.a. durch Behandlung mit Isoxaben, einem Cellulose Synthese Inhibitor, Ozon und durch oxidativen Stress verstärkt exprimiert. Zusätzlich wird die Expression von *CYP81D11* laut Datenbank durch Seneszenz verstärkt. Dieses Expressionsmuster stimmt mit dem Muster der SCL14-Expression überein.

Interessanterweise sind die Gene, deren Expression durch SCL14 positiv beeinflusst wird, in frühen Stadien der Entwicklung und während der Seneszenz aktiv, während die Gene, deren Expression durch SCL14 negativ beeinflusst wird, in der vegetativen Phase aktiv sind (Abbildung 5.28). Dies deutet auf eine spezifische Funktion von SCL14 während der Keimung und der Seneszenz hin und entspricht den in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Daten.

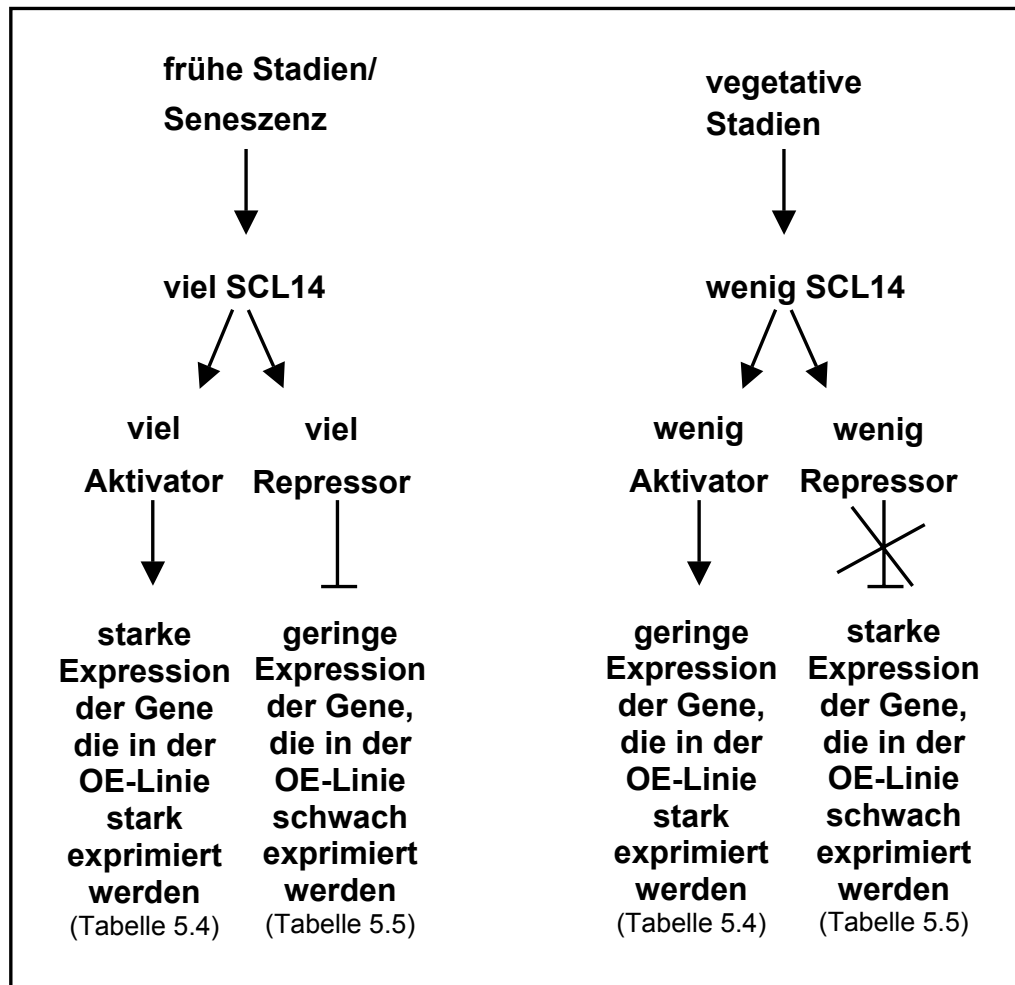


Abbildung 6.5: Hypothetisches Modell zur Regulation der Genexpression unter Beteiligung von SCL14. In frühen Entwicklungsstadien einer Pflanze sowie während der Seneszenz wird *SCL14* verstärkt exprimiert. Die große Menge an SCL14 führt zur Aktivierung eines putativen Aktivators und eines putativen Repressors. Der putative Aktivator aktiviert seinerseits die Expression der Gene, die auch in der OE-Linie stark exprimiert werden (Tabelle 5.4). Der putative Repressor hemmt wiederum die Expression der Gene, die in der OE-Linie schwach exprimiert werden (Tabelle 5.5). In den vegetativen Entwicklungsstadien wird SCL14 schwach exprimiert. Daher sind von dem putativen Aktivator und dem putativen Repressor nur geringe Mengen vorhanden. Die Gene, die auch in der OE-Linie stark exprimiert werden (Tabelle 5.4), werden infolgedessen nur schwach exprimiert. Da der putative Repressor auch nur in geringer Menge vorliegt, werden die Gene, die in der OE-Linie schwach exprimiert werden (Tabelle 5.5), stark exprimiert.

Ein mögliches Modell für die Regulation der Genexpression unter Beteiligung von SCL14 ist in Abbildung 6.5 dargestellt. Für die Erläuterung wird davon ausgegangen, dass in den Mikroarray Analysen entsprechende Bedingungen vorlagen, d.h. dass beide Situationen, die in dem hypothetischen Modell diskutiert werden, in den Pflanzenlinien durch Überexpression bzw. T-DNA-Insertion simuliert wurden.

Es ist bekannt, dass *SCL14* sowohl in frühen Phasen der pflanzlichen Entwicklung als auch während der Seneszenz verstärkt exprimiert wird, und sehr wahrscheinlich ein Transkriptionsaktivator ist. Die große Menge an *SCL14*, die in diesen Phasen vorhanden ist, führt zu einer starken Aktivierung der Genexpression eines putativen Aktivators und eines putativen Repressors. Der putative Aktivator aktiviert seinerseits die Expression der Gene, die in den Mikroarray Analysen in der ko-Linie schwach und in der OE-Linie stark exprimiert wurden (Tabelle 5.4). Die Expression der Gene, die in der ko-Linie stark und in der OE-Linie schwach exprimiert wurden (Tabelle 5.5), wird hingegen von dem putativen Repressor inhibiert.

In der vegetativen Entwicklungsphase wird *SCL14* hingegen nur schwach exprimiert. Demzufolge liegen auch nur geringe Mengen des putativen Aktivators sowie des putativen Repressors vor. Die Expression der Gene, die in den Mikroarray Analysen in der ko-Linie schwach und in der OE-Linie stark exprimiert wurden (Tabelle 5.4), wird durch die geringe Menge des putativen Aktivators nur schwach aktiviert. Da gleichzeitig nur eine geringe Menge des putativen Repressors vorhanden ist, wird die Expression der Gene, die in der ko-Linie stark und in der OE-Linie schwach exprimiert worden waren (Tabelle 5.5), nur schwach inhibiert. Infolgedessen war für viele Gene eine starke Expression unter den für die Analysen gewählten Bedingungen zu detektieren, obwohl sie unter anderen Bedingungen nicht oder nur schwach exprimiert worden wären.

Es ist ebenfalls möglich, dass *SCL14* selber den postulierten Aktivator darstellt.

Der postulierte negative Regulator hätte in den Mikroarray Analysen in der ko-Linie schwach und in der OE-Linie stark exprimiert werden müssen (Tabelle 5.4). Als mögliche Kandidaten kommen zwei Gene in Frage, die regulatorische Proteine kodieren, *At1g01720* und *At1g77450*. Beide Gene sind nah miteinander verwandt und gehören zur *NAM*-Familie, die u.a. in Petunien, *Arabidopsis*, Raps und Reis beschrieben wurde (SOUER et al., 1996; AIDA et al., 1997; DUVAL et al., 2002; HEGEDUS et al., 2003; OOKA et al., 2003). Die *NAM*-Familie zeichnet sich dadurch aus, dass ihre Mitglieder eine NAC (Petunia NAM, *Arabidopsis* ATAF1 & 2, CUC2)-Domäne im N-Terminus aufweisen, die eine spezifische DNA-Bindedomäne enthält (OOKA et al., 2003; DUVAL et al., 2002). Im C-Terminus wurde eine Transkriptions-Aktivierungsregion

(TAR) beschrieben, deren Aktivierungspotential für At1g01720 und At1g77450 bisher nicht gezeigt wurde. Das namensgebende *NAM*-Gen aus Petunien ist an der Festlegung der Position des Sprossapikalmeristems (SAM) und der Primordien beteiligt (SOUER et al., 1996).

At1g01720 und At1g77450 wurden von OOKA et al. (2003) der Subfamilie ATAF zugeordnet, die nach ATAF1, einem namen-gebenden Gen der NAC-Domäne, benannt worden ist (Abbildung 6.6). Die *ATAF1*-Expression kann durch Verwundung induziert werden. Orthologe-Transkriptionsfaktoren von ATAF1 aus *Brassica napus* können an Promotorsequenzen binden, die mit dem *as-1*-Element überlappen (HEGEDUS et al., 2003).

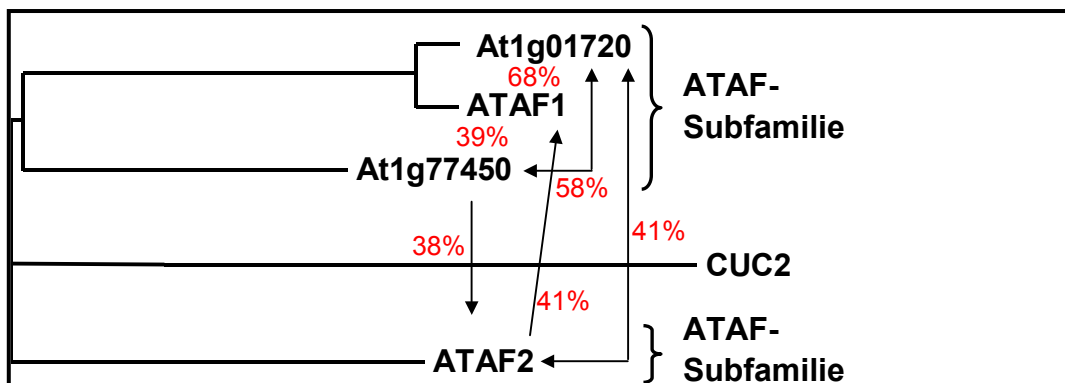


Abbildung 6.6: Darstellung der Verwandtschaft der in den Mikroarray-Analysen gefundenen Gene At1g01720 und At1g77450 mit anderen Mitgliedern der *NAM*-Genfamilie. Als Beispiele wurden ATAF1, ATAF2 und CUC2 ausgewählt. Der Grad der Identität zwischen den einzelnen Proteinen ist mit roten Prozentzahlen angegeben.

In neueren Untersuchungen von DELESSERT et al. (2005) konnte gezeigt werden, dass ATAF2 als negativer Regulator u.a. der *PRI*-Expression wirkt. Es ist daher wahrscheinlich, dass At1g01720 und At1g77450 negative Regulatoren darstellen.

Beide Gene zeigen, wie SCL14, eine starke Expression in Samen und im Entwicklungsstadium 9, also während der Seneszenz (Abbildung 5.28). Dies spricht für

eine Beteiligung von At1g01720 und At1g77450 an dem in Abbildung 6.5 vorgestellten Modell. Möglicherweise wurde mit ihnen bereits der postulierte putative Repressor identifiziert.

7 Literaturverzeichnis

Aida, M., Ishida, T., Fukaki, H., Tasaka, M. (1997): Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: an analysis of the *cup-shaped cotyledon* mutant. *Plant Cell* **9**, 841-857

Allen, R.D. (1995): Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Phys.* **107**, 1049-1054

Apel, K. und Hirt, H. (2004): Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**, 373-399

Asada, K. und Takahashi, M. (1987): Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In *Photoinhibition*, eds. DJ Kyle, CB Osborne, CJ Arntzen, pp. 227-278, Amsterdam: Elsevier

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., Chua, N.-H. (1989): The CaMV 35S enhancer contains at least two domains which can confer different developmental and tissue specific expression patterns. *EMBO J.* **8**, 2195-2202

Bent, A. F. (2000): *Arabidopsis* in plant transformation. Uses, Mechanisms, and Prospects for Transformation of other species. *Plant Physiol.* **124**, 1540-1547

Bernard, P., Kezdy, K. E., Van Melderren, L., Steyaert, J., Wyns, L., Pato, M. L., Higgins, P. N., Couturier, M. (1993): *J. Mol. Biol.* **234**, 534

Bolle, C. (2004): The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta* **218**, 683-692

Bolle, C., Koncz, C., Chua, N.H. (2000): PAT1, a new member of the GRAS family, is involved in phytochrome A signal transduction. *Genes Dev.* **14**, 1269-1278

Bouchez, D., Tokuhisa, J.G., Llewellyn, D.J., Dennis, E.S., Ellis, J.G. (1989): The *ocs* element is a component of the promoters of several T-DNA and plant viral genes. *EMBO J.* **8**, 4197-4204

Bowler, C. und Fluhr, R. (2000): The role of calcium and activated oxygen as signals for controlling cross-tolerance. *Trends Plant Sci.* **5**, 241-246

Bowler, C., Slooten, L., Vandenbranden, S. de Rycke, R., Botterman, J., Sybesma, C., Van Montagu, M., Inzé, D. (1991): Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage by oxygen radicals in transgenic plants. *EMBO J.* **10**, 1723-1732

Boyes, D.C., Zayed, A.M., Ascenzi, R., McCaskill, A.J., Hoffman, N.E., Davis, K.R., Görlach, J. (2001): Growth Stage-Based Phenotypic Analysis of Arabidopsis: A Model for High Throughput Functional Genomics in Plants. *Plant Cell* **13**, 1499-1510

Brenner, W. (2002): Etablierung eines induzierbaren Suizidsystems zur Identifizierung von Mutanten der salizylsäureabhängigen Signaltransduktion. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen

Broin, M., Cuiñé, S., Peltier, G., Rey, P. (2000) : Involvement of CDSP32, a drought-induced thioredoxin, in the response to oxidative stress in potato plants. *FEBS Letters* **467**, 245-248

Buchanan-Wollaston, V., Earl, S., Harrison, E., Mathas, E., Navabpour, S., Page, T., Pink, D. (2003): The molecular analysis of leaf senescence – a genomics approach. *Plant Biotech. J.* **1**, 3-22

Buchanan-Wollaston, V. (1997): The molecular biology of leaf senescence. *J. Exp. Bot.* **48**, 181-199

Cakmak, I., Strbac, D., Marschner, H. (1993): Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds. *J. Exp. Bot.* **258**, 127-132

Cakmak I. und Horst W.J. (1991): Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max.*). *Physiol. Plant* **83**, 463-468

Cao, H., Glazebrook, J., Clarke, J.D., Volko, S., Dong, X. (1997): The Arabidopsis *NPR1* gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* **88**, 57-63

Chamnongpol, S., Willekens, H., Moeder, W., Langebartels, C., Sandermann H. Jr. et al. (1998): Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H₂O₂ in transgenic tobacco. *PNAS USA* **95**, 5818-5823

Chen, D., Toone, W.M., Mata, J., Lyne, R., Burns, G. et al. (2003): Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol. Biol. Cell* **14**, 214-229

Chen, W. und Singh, K.B. (1999): The auxin, hydrogen peroxide and salicylic acid induced expression of the *Arabidopsis GST6* promoter is mediated in part by an *ocs* element. *Plant J.* **19**, 667-677

- Chen, W., Chao, G., Singh, K.B. (1996):** The promotor of a H₂O₂-inducible, *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene contains closely linked OBF- and OBP1-binding sites. *Plant J.* **10**, 955-966
- Chern, M.-S., Fitzgerald, H.A., Yadav, R.C., Canlas, P.E., Dong, X., Ronald, P.C. (2001):** Evidence for a disease-resistance pathway in rice similar to the *NPR1*-mediated signalling pathway in *Arabidopsis*. *Plant J.* **27**, 101-113
- Chuang, C.-F., Running, M.P., Williams, R.W., Meyerowitz, E.M. (1999):** The *PERIANTHIA* gene encodes a bZIP protein involved in the determination of floral organ number in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.* **13**, 334-344
- Church, G.M., Gilbert, W. (1984):** Genomic Sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**, 1991-1995
- Clough, S. und Bent, A. (2000):** Vapor-Phase Sterilization of *Arabidopsis* Seed. <http://plantpath.wisc.edu/~afb/vapster.html>.
- Clough, S.J., Bent, A.F. (1998):** Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **16**, 735-743
- Cooke, R. (1990):** The *figwort mosaic virus gene VI* promoter region contains a sequence highly homologous to the octopine synthase (*ocs*) enhancer element. *Plant Mol. Biol.* **15**, 181-187
- Corpas, F.J., Barroso, J.B., del RÍO, L.A. (2001):** Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends Plant Sci.* **6**, 145-150
- Dangl, J., Dietrich, R., Thomas, H. (2000):** Senescence and programmed cell death. *Biochem. and Mol. Biol. of Plants*. Rockville, Maryland: American Society of Plant Physiologists, pp. 1044-1100
- Daniel, V. (1993):** Glutathion S-transferases: gene structure and regulation of expression. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **24**, 337-384
- Dat, J.F., Pellinen, R., Beekman, T., Van De Cotte, B., Langebartels, C., Kangasjärvi, J., Inzé, D., Van Breusegem, F. (2003):** Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco. *Plant J.* **33**, 621-632
- Dat J., Vandenabeele E., Vranová E., Van Montagu M., Inzé D., Van Breusegem F. (2000):** Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**, 779-795
- Desikan, R., Mackerness, S., Hancock, J.T., Neill, S.J. (2001):** Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Phys.* **127**, 159-172

- Després, C., DeLong, C., Glaze, S., Liu, E., Fobert, P.R. (2000):** The *Arabidopsis* NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *Plant Cell* **12**, 279-290
- Després, C., Chubak, C., Rochon, A., Clark, R., Bethune, T., Desveaux, D., Fobert, P.R. (2003):** The *Arabidopsis* NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1. *Plant Cell* **15**, 2181-2191
- Di Laurenzio, L., Wysocka-Diller, J., Malamy, J.E., Pysh, L., Helariutta, Y., Freshour, G., Hahn, M.G., Feldmann, K.A., Benfey, P.N. (1996):** The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell* **86**, 423-433
- Dong, X. (1998):** SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 316-323.
- Droog, F., Spek, A., van der Kooy, A., de Ruyter, A., Hoge, H., Libbenga, K., Hooykaas, P., van der Zaal B. (1995):** Promoter analysis of the auxin-regulated tobacco glutathione S-transferase genes *Nt103-1* and *Nt103-35*. *Plant Mol. Biol.* **29**, 413-429
- Duval, M., Hsieh, T.-F., Kim, S.Y., Thomas, T.L. (2002):** Molecular characterization of *AtNAM*: a member of the *Arabidopsis* NAC domain superfamily. *Plant Mol. Biol.* **50**, 237-248
- Ellis, J.G., Tokuhisa, J.G., Llewellyn, D.J., Bouchez, D., Singh, K., Dennis, E.S., Peacock, W.J. (1993):** Does the *ocs*-element occur as a functional component of the promoters of plant genes? *Plant J.* **4**, 433-443
- Fan, W. und Dong, X. (2002):** In vivo interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**, 1-13
- Feinberg, A.P., Vogelstein, B. (1983):** A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**, 6-13
- Feltkamp, D., Masterson, R., Starke, J., 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**, 259-268
- Fields, S., und Song, O. (1989):** A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-247
- Fitzgerald, H.A., Canlas, P.E., Chern, M.-S., Ronald, P.C. (2005):** Alteration of TGA factor activity in rice results in enhanced tolerance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Plant J.* **43**, 335-347

- Fobert, P.R. und Despres, C. (2005):** Redox control of systemic acquired resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 378-382
- Foley, R.C., Grossmann, C., Ellis, J.G., Llewellyn, D.J., Dennis, E.S., Peacock, W.J., Singh, K.B. (1993):** Isolation of a maize bZIP protein subfamily: Candidates for the *ocs*-element transcription factor. *Plant J.* **3**, 669-679
- Foyer, C.H. und Harbinson, J.C. (1994):** Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plant, eds. CH Foyer, P.M. Mullineaux. pp. 1-42. Boca Raton, Fla. : CRC
- Fromm, H., Katagiri, F., Chua, N.-H. (1989):** An octopine synthase enhancer element directs tissue-specific expression and binds ASF-1, a factor from tobacco nuclear extracts. *Plant Cell* **1**, 977-984
- Fromm, H., Katagiri, F., Chua, N.-H. (1991):** The tobacco transcription activator TGA1a binds to a sequence in the 5'-upstream region of a gene encoding a TGA1a related protein. *Mol. Gen. Genet.* **229**: 181-188.
- Fukuda, M. et al. (1997) :** CRM1 is responsible of nuclear export signal (NES)-dependent protein export from the nucleus. *Nature* **390**, 308-311
- Gan, S. und Amasino, R.M. (1997):** Making sense of senescence. *Plant Phys.* **113**, 313-319
- Gao, M.-J., Parkin, I.A.P., Lydiate, D.J.L., Hannoufa, A. (2004):** An auxin-responsive SCARECROW-like transcriptional activator interacts with histone deacetylase. (*Plant Mol. Biol.* **00**, 1-15
- Garretón, V., Carpinelli, J., Jordana, X., Holuigue, L. (2002):**The *as-1* Promoter Element Is an Oxidative Stress-Responsive Element and Salicylic Acid Activates It via Oxidative Species. *Plant Phys.* **130**, 1516-1526
- Gasch, A., Spellman, P., Kao, C., Harel, O., Eisen, M. et al. (2000):** Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* **11**, 4241-4257
- Gatz, C., Quail, P.H. (1988):** Tn10-encoded tet repressor can regulate an operator-containing plant promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 1394-1397
- Greb, T., Clarenz, O., Schafer, E., Muller, D., Herrero, R., Schmitz, G., Theres, K. (2003):** Molecular analysis of the LATERAL SUPPRESSOR gene in *Arabidopsis* reveals a conserved control mechanism for axillary meristem formation. *genes Dev.* **17**, 1175-1187
- Hanahan D. (1983):** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580

- Hanfrey, C., Fife, M., Buchanan-Wollaston, V. (1996):** Leaf Senescence in *Brassica napus*: expression of genes encoding pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol.* **30**, 597-609
- Haslekas, C., Viken, M.K., Grini, P.E., Nygaard, V., Nordgard, S.H., Meza, T.J., Aalen, R.B. (2003):** Seed l-cysteine peroxiredoxin antioxidants are not involved in dormancy, but contribute to inhibition of germination during stress. *Plant Phys.* **133**, 1148-1157
- Heath, R.L. und Taylor, G.E. (1997):** Physiological processes and plant responses to ozone exposure. In *Forest Decline and Ozone: a Comparison of Controlled Chamber and Field Experiments*, Vol. 127 (sandermann, H. et al., eds). Springer, berlin: Ecological Studies, pp. 317-368
- Heery, D.M., Kalkhoven, E., Hoare, S., Parker M.G. (1997):** A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* **387**, 733-736
- Hegedus, D., Yu, M., Baldwin, D., Gruber, M., Sharpe, A., Parkin, I., Whitwill, S., Lydiate, D. (2003):** Molecular characterization of *Brassica napus* NAC domain transcriptional activators induced in response to biotic and abiotic stress. *Plant Mol. Biol.* **53**, 383-397
- Heinekamp, T. (2002):** Der bZIP-Transkriptionsfaktor BZI-1 aus *Nicotiana tabacum*: Analyse der *in vivo* Funktion durch Modulation der BZI-1-Aktivierungseigenschaften in transgenen Pflanzen. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen
- Helariutta, Y., Fukaki, H., Wysocka-Diller, J., Nakajima, K., Jung, J., Sena, G., Hauser, M.T., Benfey, P.N. (2000):** The SHORT-ROOT gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signalling. *Cell* **101**, 555-567
- Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffmann, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G., Fraley, R.T. (1985):** A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* **227**, 1229-1231
- Ikeda, A., Ueguchi-Tanaka, M., Sonoda, Y., Kitano, H., Koshioka, M., Futsuhara, Y., Matsuoka, M., Yamaguchi, J. (2001):** *slender rice*, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the *SLR1* gene, an ortholog of the height-regulating gene *GAI/RGA/RHT/D8*. *Plant Cell* **13**, 999-1010
- Innes, R.W., Bent, A.F., Kunkel, B.N., Bisgrove, S.R., Staskawicz, B.J. (1993):** Molecular analysis of avirulence gene *avrRpt2* and identification of a putative regulatory sequence common to all known *Pseudomonas syringae* avirulence genes. *J. Bacteriol.* **175**, 4859-4869
- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H. (1990):** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23

Ish-Horowicz, D., Burke, J.F. (1981): Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.*, **9**, 2989-2998

Itoh, H., Ueguchi-Tanaka, M., Sato, Y., Ashikari, M., Matsuoka, M. (2002): The gibberellin signaling pathway is regulated by the appearance and disappearance of SLENDER RICE 1 in nuclei. *Plant Cell* **14**, 57-70

Jabs, T. (1999): Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochem. Pharmacol.* **57**, 231-245

Jakoby, M., Weisshaar, B., Droege-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T., Parcy, F. (2002): bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* **7**, 106-111

James, P., Halladay, J., Craig, E.A. (1996): Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**, 1425-1436

Johnson, C., Glover, G., Arias, J. (2001a): Regulation of DNA binding and trans-activation by a xenobiotic stress-activated plant transcription factor. *J. Biol. Chem.* **276**, 172- 178

Johnson, C., Boden, E., Desai, M., Pascuzzi, P., Arias, J. (2001b): In vivo target promoter binding activities of a xenobiotic stress-activated TGA factor. *Plant J.* **28**, 237-243

Johnson, C., Boden, E., Arias, J. (2003): Salicylic acid and NPR1 induce the recruitment of trans-activating TGA factors to a defense gene promoter in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **15**, 1846-1858

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

Kang, H.-G. und Klessig, D.F. (2005): Salicylic acid-inducible *Arabidopsis* CK2-like activity phosphorylates TGA2. *Plant Mol. Biol.* **57**, 541-557

Kang, H.-G. und Singh, K.B. (2000): Characterization of salicylic acid-responsive, *Arabidopsis* Dof domain proteins: overexpression of OBP3 leads to growth defects. *Plant J.* **21**, 329-339

Kangasjarvi, J., Talvinen, J., Utriainen, M., Karjalainen, R. (1994): Plant defense systems induced by ozone. *Plant Cell Environ.* **17**, 783-794

Karin, M., Liu, Z., Zandi, E. (1997): AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 240-246

Karpinski, S., Gabrys, H., Mateo, A., Karpinski, B., Mullineaux, P.M. (2003): Light perception in plant disease defence signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 390-396

- Karpinski, S., Reynolds, H., Karpinski, B., Wingsle, G., Creissen, J., Mullineaux, P.C. (1999):** Systemic signalling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science* **284**, 654-657
- Katagiri, F., Seipel, K., Chua, N.-H. (1992):** Identification of a novel dimer stabilization region in a plant bZIP transcriptional activator. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 4809-4816
- Katagiri, F., Lam, E., Chua, N.-H. (1989):** Two tobacco DNA-binding proteins with homology to nuclear factor CREB. *Nature* **340**, 727-730
- Kawata, T., Imada, T., Shiraishi, H., Okada, K., Shimura, Y., Ivabuchi, M. (1992):** A cDNA clone encoding a HBP-1b homologue in *Arabidopsis thaliana*. *Nucl. Acids Res.* **20**, 1141-1147
- Kegler, C. (2001):** Analyse des Transkriptionsfaktors TGA2.1 aus *Nicotiana tabacum*. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen
- Kendall, A.C., Keyes, A.J., Turner, J.C., Lea, P.J., Mifflin, B.J. (1983):** The isolation and characterization of a catalase-deficient mutant of barley (*Hordeum vulgare*). *Planta* **159**, 505-511
- Kim, Y., Buckley, K., Costa, M.A., An, G. (1994):** A 20 nucleotide upstream element is essential for the nopaline synthase (*nos*) promoter activity. *Plant Mol. Biol.* **24**, 105-117
- King, E. O., Ward, M. K., Raney, D.E. (1954):** Two simple media for the demonstration of phycocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* **44**, 301-307
- Kinkema, M., Fan, W., and Dong, X. (2000):** Nuclear localisation of NPR1 is required for activation of *PR* gene expression. *Plant Cell* **12**, 2339-2350
- Klinedinst, S., Pascuzzi, P., Redman, J., Desai, M., Arias, J. (2000):** A xenobiotic-stressactivated transcription factor and its cognate target genes are preferentially expressed in root tip meristems. *Plant Mol. Biol.* **42**, 679-688
- Knoche H., Duvick, J.P. (1987):** The role of fungal toxins in plant disease. *Brit Mycol. Soc. Symp. Ser.* **13**, 158-192
- Koncz, C., Schell, J. (1986):** The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carries by a novel type of Agrobacterium binary vector. *Mol. Gen. Genet.* **204**, 383-396
- Krawczyk, S., Thurow, C., Niggeweg, R., Gatz, C. (2002):** Analysis of the spacing between the two palindromes of activation sequence-1 with respect to binding to different TGA factors and transcriptional activation. *Nucl. Acids Res.* **30**, 775-781

- Kudo, N. et al. (1999):** Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cystein residue. PNAS USA **96**, 9112-9117
- Kuhlemeier, C., Green, P.J., Chua, N.-H. (1987):** Regulation of gene expression in higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol. **38**, 221-257
- Kyhse-Anderson, J. (1984):** Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. J. Biochem. Biophys. Meth. **10**, 203-209
- Lam, E., Kato, N., Lawton, M. (2001):** Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. Nature **411**, 848-853
- Lam, E. und Lam, Y.K.-P. (1995):** Binding site requirements and differential representation of TGA factors in nuclear ASF-1 activity. Nucl. Acids Res. **23**, 3778-3785
- Lam, E., Katagiri, F., Chua, N.-H. (1990):** Plant nuclear factor ASF-1 binds to an essential region of the nopaline synthase promoter. J. Biol. Chem. **265**, 9909-9913
- Lam, E., Benfey, P.N., Gilmartin, P.M., Fang, R.-X., Chua, N.-H. (1989):** Site-specific mutations alter *in vitro* factor binding and change promoter expression pattern in transgenic plants. PNAS **86**, 7890-7894
- Lam, E. und Lam Y. K.-P. (1995):** Binding site requirements and differential representation of TGA factors in nuclear ASF-1 activity. Nucl. Acids Res. **23**, 3778-3785
- Lamb, C.J., Dixon, R.A. (1997):** The oxidative burst in plant disease resistance. Ann. Rev. Plant Mol. Biol. **48**, 251-275
- Lebel, E., Heifetz, P., Thorne, L., Uknes, S., Ryals, J., Ward, E. (1998):** Functional analysis of regulatory sequences controlling PR-1 gene expression in Arabidopsis. Plant J. **16**, 223-233
- Leprince, O., Hendry, G.A.F., McKersie, B.D. (1993):** The mechanism of desiccation tolerance in developing seeds. Seed Sci. Res. **3**, 231-246
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., Lamb, C. (1994):** H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. Cell **79**, 583-593
- Li, X., Zhang, Y., Clarke, J.D., Li, Y., und Dong, X. (1999):** Identification and cloning of a negative regulator of systemic acquired resistance, SNI1, through a screen for suppressors of *npr1-1*. Cell **98**, 329-339
- Li, X., Qian, Q., Fu, Z., Wang, Y., Xiong, G., Zeng, D., Wang, X., Liu, X., Teng, S., Hiroshi, F., Yuan, M., Luo, D., Han, B., Li, J. (2003):** Control of tillering in rice. Nature **422**, 618-621

- Lin J.-F. und Wu S.-H. (2004):** Molecular events in senescing *Arabidopsis* leaves. *Plant J.* **39**, 612-628
- 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
- Maxwell, D.P., Nickels, R., McIntosh, L. (2002):** Evidence of mitochondrial involvement in the transduction of signals required for the induction of genes associated with pathogen attack and senescence. *Plant j.* **29**, 269-279
- Medberry, S.L., Lockhart, B.E.L., Olszewski, N.E. (1992):** The commelina yellow mottle virus promoter is a strong promoter in vascular and reproductive tissues. *Plant Cell* **4**, 185-192
- 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**, 887-896
- Miao, Z.-H., Liu, X., Lam, E. (1994):** TGA3 is a distinct member of the TGA family of bZIP transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **25**, 1-11
- Minet, M., Dufour, M.-E., Lacroute, F. (1992) :** Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* auxotrophic mutants by *Arabidopsis thaliana* cDNAs. *Plant J.* **2**, 417-422
- Morohashi, K., Minami, M., Takase, H., Hotta, Y., Hiratsuka, K. (2003):** Isolation and characterization of a novel GRAS gene that regulates meiosis-associated gene expression. *J. Biol. Chem.* **278**, 20865-20873
- Mou, Z., Fan, W., Dong, X. (2003):** Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* **113**, 935-944
- Mudd, J.B. (1997):** Biochemical basis for the toxicity of ozone. In *Plant Response to Air Pollution* (Yunus, M. and Iqbal, M., eds). NY, USA: John Wiley and Sons, pp. 267-284
- Mullis, K.B., Faloona, F.A. (1987):** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerasecatalysed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335-350
- Murashige, T., Skoog, F. (1962):** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiol.* **15**, 473-497
- Narusaka, Y., Narusaka, M., Seki, M., Umezawa, T., Ishida, J., Nakajima, M., Enju, A., Shinozaki, K. (2004):** Crosstalk in the responses to abiotic and biotic stresses in *Arabidopsis*: Analysis of gene expression in *cytochrome P450* gene superfamily by cDNA microarray. *Plant Mol. Biol.* **55**, 327-342
- Neuhaus, G., Neuhaus-Url, G., Katagiri, F., Seipel, K., Chua, N.-H. (1994):** Tissue-specific expression of *as-1* in transgenic tobacco. *Plant Cell* **6**, 827-834

Nickolov, K. I. (2003): Subcellular Localization of *Nicotiana tabacum* TGA Transcription Factors. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen

Niggeweg, R., Thurow, C., Weigel, R., Pfitzner, U., Gatz, C. (2000a): Tobacco TGA factors differ with respect to interaction with NPR1, activation potential and DNA-binding properties. *Plant Mol. Biol.* **42**, 775-788

Niggeweg, R., Thurow, C., Kegler, C., Gatz, C. (2000b): Tobacco transcription factor TGA2.2 is the main component of *as-1*-binding factor ASF-1 and is involved in salicylic acid- and auxin-inducible expression of *as-1*-containing target promoters. *J. Biol. Chem.* **275**, 19897-19905

Niggeweg, R. (1999): Salizylsäure- und Auxin-induzierte Genexpression in *Nicotiana tabacum*: Funktionelle Bedeutung der TGA-Faktoren der Subklasse II. Dissertation, Universität 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

Nishiyama, T., et al. (2003): Comparative genomics of *Physcomitrella patens* gametophytic transcriptome and *Arabidopsis thaliana*: implication for land plant evolution. *PNAS USA* **100**, 8007-8012

Noctor, G., Veljovic-Jovanovic, S., Driscoll, S., Novitskaya, L., Foyer, C.H. (2002): Drought and oxidative load in the leaves of C₃ plants: a predominant role for photorespiration? *Ann. Bot.* **89**, 841-850

Odell, G.T., Nagy, F., Chua, N.-H. (1985): Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* **313**, 810-812

Ooka, H., Satoh, K., Dor, K., Ngata, T., Otomo, Y., Murakami, K., Matsubara, K., Osato, N., Kawai, J., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Suzuki, K., Kojima, K., Takahara, Y., Yamamoto, K., Kikuchi, S. (2003): Comprehensive analysis of *NAC* family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res.* **10**, 239-247

Overmeyr, K., Tuomainen, H., Kettunen, R., Betz, C., Langebartels, C., Sandermann, H., Jr, Kangasjarvi, J. (2000): Ozone-sensitive *Arabidopsis rcd1* mutant reveals opposite roles for ethylene and jasmonate-signaling pathways in regulating superoxide-dependent cell death. *Plant Cell* **12**, 1849-1862

Ow, D.W., Jacobs, J.D., Howell, S.H. (1987): Functional regions of the cauliflower mosaic virus 35S truncated promoter. *Mol. Gen. Genet.* **217**, 209-214

Pascuzzi, P., Hamilton, D., Bodily, K., Arias, J. (1998): Auxin-induced stress potentiates trans-activation by a conserved plant basic/leucine-zipper factor. *J. Biol. Chem.* **273**, 26631-26637

- Pastori, G.M. und Foyer, C.H. (2002):** Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of “redox” and abscisic acid-mediated controls. *Plant Physiol.* **129**, 460-468
- Pell, E.J., Schlagnauffer, C.D., Arteca, R.N. (1997):** Ozone-induced oxidative stress: mechanisms of action and reaction. *Physiol. Plant.* **100**, 264-273
- Pellinen, R., Palva, T., Kangasjarvi, J. (1999):** Subcellular localization of ozone-induced hydrogen peroxide production in birch (*Betula pendula*) leaf cells. *Plant J.* **20**, 349-356
- Peng, J., Carol, P., Richards, D.E., King, K.E., Cowling, R.J., Murphy, G.P., Harberd, N.P. (1997):** The *Arabidopsis* GAI gene defines a signalling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev.* **11**, 3194-3205
- Peng, J., Richards, D.E., Hartley, N.M., Murphy, G.P., Devos, K.M., Flintham, J.E., Beales, J., Fish, L.J., Worland, A.J., Pelica, F., Sudhakar, D., Christou, P., Snape, J.W., Gale, M.D., Harberd, N.P. (1999):** “Green revolution” genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* **400**, 256-261
- Perlmann, D.C., Halvorson, H.O. (1987):** Improved resolution of DNA fragments in polysaccharid-supplemented agarose gels. *Analytical Biochem.* **163**, 247-256
- Picard, D. und Yamamoto, K.R. (1987):** Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* **6**, 3333-3340
- Pontier, D., Gan, S., Amasino, R.M., Roby, D., Lam, E. (1999):** Markers for hypersensitive response and senescence show distinct patterns of expression. *Plant Mol. Biol.* **39**, 1243-1255
- Pontier, D., Miao, Z.-H., and Lam, E. (2001):** Trans-dominant suppression of plant TGA factors reveals their negative and positive roles in plant defence responses. *Plant J.* **27**, 529- 538
- Prasad, T.K., Anderson, M.D., Martin, B.A., Stewart, C.R. (1994):** Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell* **6**, 65-74
- Prat, S., Willmitzer, L., Sanchez-Serrano, J.J. (1989):** Nuclear proteins binding to a cauliflower mosaic virus 35S truncated promoter. *Mol. Gen. Genet.* **217**, 209-214
- Printen, J.A., Spargue, G.F. (1994):** Protein interactions in the yeast pheromone response pathway: Ste5p interacts with all members of the MAP kinase cascade. *Genetics* **138**, 609-619
- Puntarulo, S., Galleano, M., Sanchez, R.A., Boveris, A. (1991):** Super-oxide anion and hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes during germination. *Biochim. Biophys. Acta* **1074**, 277-283

- Pysh, L.D., Wysocka-Diller, J.W., Camilleri, C., Bouchez, D., Benfey, P.N. (1999):** The GRAS gene family in Arabidopsis: sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *Plant J.* **18**, 111-119
- Qin, X.-F., Holuigue, L., Horvath, D., Chua, N.-H. (1994):** Immediate early transcription activation by salicylic acid via the Cauliflower Mosaic Virus *as-1* element. *Plant Cell* **6**, 863-874
- Quorino, B.F., Noh, Y.S., Himelblau, E., Amasino, R.M. (2000):** Molecular aspects of leaf senescence. *Trends in Plant Sciences* **5**, 278-282
- Rao, M.V., Davis, K.R. (1999):** Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms. the role of salicylic acid. *Plant J.* **17**, 603-614
- Rao, M.V., Koch, J.R., Davis, K.R. (2000a):** Ozone: a tool for probing programmed cell death in plants. *Plant Mol. Biol.* **44**, 345-358
- Rao, M.V., Lee, H.-I., Creelman, R.A., Mullet, J.E., Davis, K.R. (2000b):** Jasmonate perception desensitises O₃-induced salicylic acid biosynthesis and programmed cell death in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**, 1633-1646
- Richards, D.E., Peng, J., Harberd, N.P. (2000):** Plant GRAS and metazoan STATs: one family ? *Bioessays* **22**, 573-577
- Richards K.D., Schott E.J., Sharma Y.K., Davis K.R., Gardner R.C. (1998):** Aluminium induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Phys.* **116**, 409-418
- Rieping, M., Fritz, M., Prat, S., Gatz, C. (1994):** A dominant negative mutant of PG13 suppresses transcription from a cauliflower mosaic virus 35S truncated promoter in transgenic tobacco plants. *Plant Cell* **6**, 1087-1098
- Rizhsky, L., Hallk-Herr, E., Van Breusegem, F., Rachmilevitch, S., Barr, J.E., Rodermel, S., Inzé, D., Mittler, R. (2002):** Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase. *Plant J.* **32**, 329-342
- Redman, J., Whitcraft, J., Johnson, C., Arias, J. (2002):** Abiotic and biotic stress differentially stimulates *as-1* element activity in Arabidopsis. *Plant Cell Reports* **21**, 180-185
- Ryals, J.A., Weymann, K., Lawton, K., Friedrich, L., Ellis, D., Steiner, H.-Y., Johnson, J., Delaney, T.P., Jesse, T., Vos, P., Uknes, S. (1997):** The Arabidopsis NIM1 protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor IκB. *Plant Cell* **9**, 425-439
- Ryals, J.A., Neuenschwader, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.-Y., Hunt, M.D. (1996):** Systemic acquired resistance. *Plant Cell* **8**, 1809-1819

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989):** Molecular cloning: A Laboratory Manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sandermann, H., Jr, Ernst, D., Heller, W., Langebartels, C. (1998):** Ozone: an abiotic elicitor of plant defense reactions. *Trends Plant Sci.* **3**, 47-50
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977):** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. (PNAS) USA* **74**, 5463-5467
- Sassa, N., Matsushita, Y., Nakamura, T., Nyunoya, H. (2001):** The molecular characterization and in situ expression pattern of pea *SCARECROW* gene. *Plant Cell Phys.* **42**, 385-394
- Scandlios J.G. (1987):** The antioxidant enzyme genes Cat and Sod of maize: regulation, functional significance, and molecular biology. In: Rattazzi M.C., Scandlios J.G., Whitt G.S. (eds) *Isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research*, vol. 14: Molecular and Cellular Biology, pp. 19-44 Alan R. Liss, New York. (1987)
- Schiermeyer, A., Thurow, C., Gatz, C. (2003):** Tobacco bZIP factor TGA10 is a novel member of the TGA family of transcription factors. *Plant Mol. Biol.* **51**, 817-829
- Schindler, U., Beckmann, H., Cashmore, A. R. (1992):** TGA1 and G-box-binding-factors: two distinct classes of *Arabidopsis* leucine zipper proteins compete for the G-box-like element TGACGTGG. *Plant Cell* **4**, 1309-1319
- Schraudner, M., Langebartels, C., Sandermann, H. (1997):** Changes in the biochemical status of plant cell induced by the environmental pollutant ozone. *Physiol. Plant.* **100**, 274-280
- Schraudner, M., Moeder, W., Wiese, C., Van Camp, W., Inze, D., Langebartels, C., Sandermann, H., Jr (1998):** Ozone-induced oxidative burst in the ozone biomonitor plant, tobacco Bel W3. *Plant J.* **16**, 235-245
- Schumacher, K., Schmitt, T., Rossberg, M., Schmitz, G., Theres, K. (1999):** The lateral suppressor (Ls) gene of tomato encodes a new member of the VHIID protein family. *PNAS USA* **96**, 290-295
- Sharma, Y.K., Davis, K.R. (1997) :** The effects of ozone on antioxidant responses in plants. *Free Rad. Biol. Med.* **23**, 480-488
- Sharma, Y.K., Leon, J., Davis, K.R. (1996):** Ozone-induced expression of stress-related genes in *Arabidopsis thaliana*: the role of salicylic acid in the accumulation of defense-related transcripts and induced resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5099-5104

- Siemsen, T. (2002):** Identifizierung von Protein-Interaktionspartnern des bZIP-Transkriptionsfaktors TGA2 mit Hilfe des modifizierten Hefe-,One-Hybrid“-Systems. Diplomarbeit, Georg-August-Universität Göttingen
- Silverstone, A.L., Ciampaglio, C.N., Sun, T. (1998):** The *Arabidopsis RGA* gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *Plant Cell* **10**, 155-169
- Singh, K., Dennis, E.S., Ellis, J.G., Llewellyn, D.J., Tokuhisa, J.G., Wahleithner, J.A., Peacock, W.J. (1990):** OCSBF-1, a maize Ocs enhancer binding factor: Isolation and expression during development. *Plant Cell* **2**, 891-903
- Singh, K., Tokuhisa, J.G., Dennis, E.S., Peacock, W.J. (1989):** Saturation mutagenesis of the octopine synthase enhancer: Correlation of mutant phenotypes with binding of a nuclear protein factor. *PNAS USA* **86**, 3733-3737
- Smart, C.M. (1994):** Gene expression during leaf senescence. *New Phytol.* **126**, 419-448
- Souer, E., VanHouwelingen, A., Kloos, D., Mol, J., Koes, R. (1996):** The *No Apical Meristem* gene of petunia is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordial boundaries. *Cell* **85**, 159-170
- Stange, C., Ramirez, I., Gómez, I., Jordana, X., Holuigue, L. (1997):** Phosphorylation of nuclear proteins directs binding to salicylic acid-responsive elements. *Plant J.* **11**, 1315- 324
- Strompen, G., Grüner, R., Pfitzner, M. (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
- Studier, F. W., Moffat, B. A. (1986):** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130
- Stuurman, J., Jaggi, F., Kuhlemeier, C. (2002):** Shoot meristem maintenance is controlled by a GRAS-gene mediated signal from differentiating cells. *Genes Dev.* **16**, 2213-2218
- Subramaniam, R., Desveaux, D., Spickler, C., Michnick, S.W., Brisson, N. (2001):** Direct visualization of protein interactions in plant cells. *Nat. Biotechnol.* **19**, 769-772
- Tabata, T., Nakayama, T., Mikami, K., Iwabuchi, M. (1991):** HBP-1a and HBP-1b: Leucine zipper type transcription factors of wheat. *EMBO J.* **10**, 1459-1467
- Takahashi, Y., Kuroda, H., Tanaka, R., Machida, T., Nagata, T. (1989):** Isolation of an auxinregulated gene cDNA expressed during the transition from G0 to S phase in tobacco mesophyll protoplasts. *PNAS USA* **86**, 9279-9283

- Thurrow, C., Schiermeyer, A., Krawczyk, S., Butterbrodt, T., Nickolov, K., Gatz, C. (2005):** Tobacco bZIP transcription factor TGA2.2 and related factor TGA2.1 have distinct roles in plant defense responses and plant development. *Plant J.*, in press
- Thurrow, C. (2001):** Biochemische Aufreinigung, funktionelle Analyse und Identifikation eines Interaktionspartners des an der Salicylsäure-induzierbaren Genexpression beteiligten SARP-Komplexes aus Tabak. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen
- Tian, C., Wan, P., Sun, S., Li, J., Chen, M. (2004):** Genome-wide analysis of the *GRAS* gene family in rice and *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* **54**, 519-532
- Tunac, J.B. et al. (1985):** Novel antitumor antibiotics, CI-940 (PD 114,720) and PD 114,721. Taxonomy, fermentation and biological activity. *J. Antibiot.* **38**, 460-465
- Ulmasov, Y., Hagen, G., Guilfoyle, T. (1994):** The *ocs* element in the soybean *GH2/4* promoter is activated by both active and inactive auxin and salicylic acid analogues. *Plant Mol. Biol.* **26**, 1055-1064
- Uquillas, C., Letelier, I., Blanco, F., Jordana, X., Holuigue, L. (2004):** NPR1-independent activation of immediate early salicylic acid-responsive genes in *Arabidopsis*. *MPMI* **17**, 34-42
- Vandenabeele, S., vanderauwera, S., Vuylsteke, M., Rombauts, S., Langebartels, C., Seidlitz, H., Zabeau, M., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Breusegem, F. (2004):** Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **39**, 45-58
- Vandenabeele, S., Van Der Kelen, K., Dat, J. et al. (2003):** A comprehensive analysis of hydrogen peroxide-induced gene expression in tobacco. *PNAS USA* **100**, 16113-16118
- Van Der Zaal, B.J., Droog, F.N.J., Pieterse, F.J., Hooykaas, P.J.J. (1996):** Auxin-sensitive elements from promoters of tobacco *GST* genes and a consensus *as-1*-like element differ only in relative strength. *Plant Physiol.* **110**, 79-88
- Van Der Zaal, E.J., Droog, F.N.J., Boot, C.J.M., Hensgens, L.A.M., Hoge, J.H.C., Schilperoort, R.A., and Libbenga, K.R. (1991):** Promoters of auxin-induced genes from tobacco can lead to auxin-inducible and root tip-specific expression. *Plant Mol. Biol.* **10**, 145-157
- Vranová, E., Atichartpongkul, S., Villarroel, R., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Camp, W. (2002):** Comprehensive analysis of gene expression in *Nicotiana tabacum* leaves acclimated to oxidative stress. *PNAS USA* **99**, 10870-10875
- Whalen, M.C., Innes, R.W., Bent, A.F., Staskawicz (1991):** Identification of *Pseudomonas syringae* pathogens of *Arabidopsis* and a bacterial locus determining avirulence on both *Arabidopsis* and soybean. *Plant Cell* **3**, 49-59

- Walsh, J., Waters, C.A., Freeling, M. (1997):** The maize gene *liguleless2* encodes a basic leucine zipper protein involved in the establishment of the leaf bladesheath boundary. *Genes Dev.* **11**, 208-218
- Weigel, R.R., Bauscher, C., Pfitzner, A.J., Pfitzner, U.M. (2001):** Nimin-1, NIMIN-2 and NIMIN-3, members of a novel family of proteins from *Arabidopsis* that interact with NPR1/NIM1, a key regulator of systemic acquired resistance in plants. *Plant Mol. Biol.* **46**, 143-160
- Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, et al. (1997):** Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants. *EMBO* **16**, 4806-4816
- Wolff, B. et al. (1997) :** Leptomycin B is an inhibitor of nuclear export : inhibition of nucleo-cytoplasmic translocation of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev protein and Rev-dependent mRNA. *Chem Biol.* **4**, 139-147
- Xiang, C., Miao, Z., Lam E. (1997):** DNA-binding properties, genomic organization and expression pattern of TGA6, a new member of the TGA family of bZIP transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **34**, 403-415
- Xiang, C., Miao, Z.-H., Lam, E. (1996):** Coordinated activation of *as-1*-type elements and a tobacco glutathione S-transferase gene by auxins, salicylic acid, methyl-jasmonate and hydrogen peroxide. *Plant Mol. Biol.* **32**, 415-426
- Xiang, C., Miao, Z., Lam, E. (1995):** Isolation of TGA6 (Accession No. L42327), a new member of the TGA family of bZIP transcription factors in *Arabidopsis thaliana* (PGR95-063). *Plant Physiol.* **109**, 721
- Yoshida, K. (2003):** Molecular regulation of leaf senescence. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 79-84
- Zhang, Y., Tessaro, M.J., Lassner, M., Li, X. (2003):** Knockout Analysis of *Arabidopsis* transcription factors TGA2, TGA5, and TGA6 reveals their redundant and essential roles in systemic acquired resistance. *Plant cell* **15**, 2647-2653
- Zhang, Y., Fan, W., Kinkema, M., Li, X., Dong, X. (1999):** Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the PR-1 gene. *PNAS USA* **96**, 6523-6528
- Zhang, B. und Singh, K.B. (1994):** *Ocs* element promoter sequences are activated by auxin and salicylic acid in *Arabidopsis*. *PNAS USA* **91**, 2507-2511
- Zhang, Y., Foley, R. C., Singh, K. B. (1993):** Isolation and characterization of two related *Arabidopsis* *ocs*-element bZIP binding proteins. *Plant J.* **4**, 711-716

Zhou, J.-M., Trifa, Y., Silva, H., Pontier, D., Lam, E., Shah, J., Klessig, D.F. (2000): NPR1 differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the *PR-1* gene required for induction by salicylic acid. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13** (2), 191-202

8 Anhang

8.1 Vektorkarten der im Rahmen dieser Arbeit erstellten Plasmide

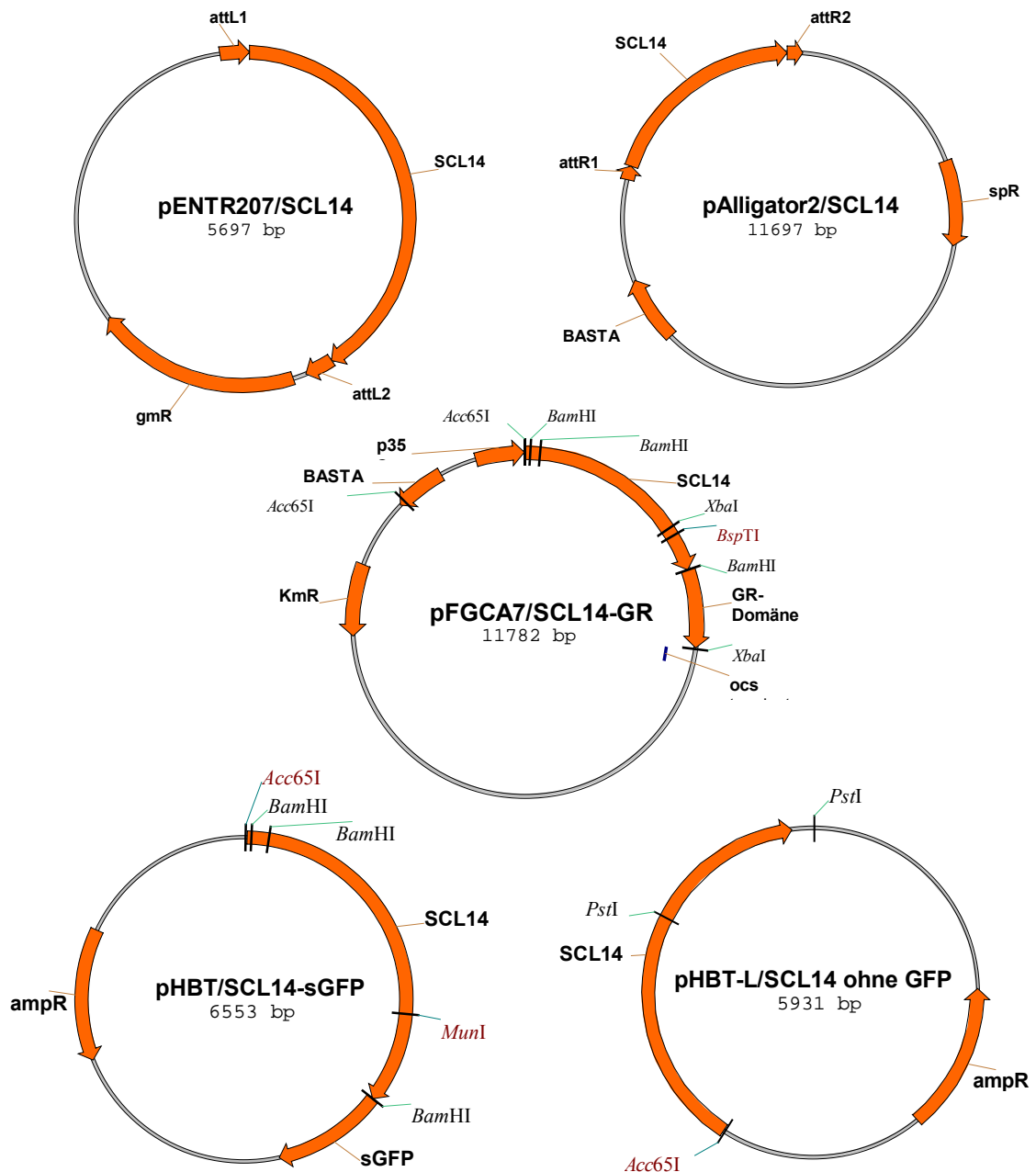


Abbildung 8.1: Vektorkarten der im Rahmen dieser Arbeit erstellten Plasmide. ampR: Ampicillinresistenz; gmR: Gentamycinresistenz; kmR: Kanamycinresistenz; spR: Spektomycinresistenz; BASTA: Phosphinotricinresistenz; attL1 und attL2 bzw attR1 und attR2: gateway attachment sites; p35: CaMV 35S-Promotor; ocs: ocs-Terminator. Eingezeichnet sind nur die jeweils zur Konstruktion verwendeten Schnittstellen.

8.2.2 Aminosäure-Alignment von TGA2, TGA5 und TGA6

TGA2	(1)	MADTSPRTDVSTDDTDHPDLGSEGALVNTAASDSSDRSKGKMDQKTLRR
TGA6	(1)	-----MQSDRGHMHAAASDSSDRSKDKLDQKTLRR
TGA5	(1)	MGDTSPRTSVSTGDGTDHNNLMFDEGHLGIGASDSSDRSKSKMDQKTLRR
TGA2	(51)	LAQNREAARKSRLRKKAYVQQLENSRLKLTQLEQELQRARQQGVFISGTG
TGA6	(31)	LAQNREAARKSRLRKKAYVQQLENSRLKLTQVEQELQRARQQGVFISSSG
TGA5	(51)	LAQNREAARKSRLRKKAYVQQLENSRLKLTQLEQELQRARQQGVFISSSG
TGA2	(101)	DQAHSTGNG-ALAFDAEHSRWLEEKNKQMNELRSALNAHAGDSELRIIV
TGA6	(81)	DQAHSTGNGGALAFDAEHSRWLEEKNRQMNELRSALNAHAGDTELRIIV
TGA5	(101)	DQAHSTAGDG-AMAFDVEYRRWQEDKNRQMKELSSAIDSHATDSELRIIV
TGA2	(150)	DGVMAHYEELFRIKSNAAKNDVFHLLSGMWKTPAERCFLWLGGFRSSELL
TGA6	(131)	DGVMAHYEELFRIKSNAASKNDVFHLLSGMWKTPAERCFLWLGGFPSSELL
TGA5	(150)	DGVI AHYEELYRIKGNAAKSDVFHLLSGMWKTPAERCFLWLGGFRSSELL
TGA2	(200)	KLLANQLEPMTERQLMGINNQQTSQQAEDALSQGMESLQQSLADTLSSG
TGA6	(181)	KLLANQLEPMTERQVMGINSQQTSQQAEDALSQGMESLQQSLADTLSSG
TGA5	(200)	KLIASQLEPLTEQQSLDINNQQSSQQAEDALSQGMENLQQSLADTLSSG
TGA2	(250)	TLGSSSSGNVASYMGQMAMAMGKLGTLLEGFIRQADNLRQLTQQMIRVLT
TGA6	(231)	TLGSSSSDGNVASYMGQMAMAMGKLGTLLEGFIRQADNLRQLTQQMLRVLT
TGA5	(250)	TLGSSSSGNVASYMGQMAMAMGKLGTLLEGFIRQADNLRQLTYQQMVRLLT
TGA2	(300)	TRQSARALLAIHDYFSRLRALSSLWLARPREWIL
TGA6	(281)	TRQSARALLAIHDYSSRLRALSSLWLARPRE-GS
TGA5	(300)	TRQSARALLAVHNYTLRLRALSSLWLARPRE---

Abbildung 8.3: Aminosäure-Alignment von TGA2, TGA5 und TGA6. Blaue Buchstaben kennzeichnen eine Aminosäuresequenzübereinstimmung zwischen zwei Proteinen. Übereinstimmungen zwischen allen drei Proteinen sind mit roten Buchstaben dargestellt. Ähnliche Aminosäuren sind durch schwarze Buchstaben gekennzeichnet, die mit grauer Farbe unterlegt sind. Schwach-ähnliche Aminosäuren sind mit grünen Buchstaben dargestellt.

8.3 Glossar

A	Adenin
AD	Aktivierungsdomäne
ADH1	Alkoholdehydrogenase 1 aus <i>S cerevisiae</i>
amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
<i>as-1</i>	<i>activating sequence-1</i>
ASF-1	activating sequence factor-1
bidest.	bidestilliert
BIS	N, N'-Methylenbisacrylamid
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BY-2	Bright Yellow-2 <i>Nicotiana tabacum</i> Suspensionskultur
bZIP	basischer Leucin-Zipper
bzw.	beziehungsweise
C	Formelzeichen für Kapazität
C	Cytosin
ca.	circa
CaMV	Blumenkohlmosaikvirus „Cauliflower Mosaic Virus“
cDNA	komplementäre DNA
cfu	kolonienbildende Einheit
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
CIAP	Calf Intestine Alcaline Phosphatase
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
Da	Dalton
ddNTPs	Didesoxyribonukleotide
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>et al.</i>	und andere (et alii)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
G	Guanin
β-Gal	β-Galaktosidase
GAL4-AD	GAL4-Aktivierungsdomäne
GFP	green fluorescent protein (= Grün-fluoreszierendes Protein)
GUS	β-Glucuronidase
h	Stunde(n)
H	Histidin
HBT	hybrid booster of transcription, Hybrid-Promotor zur Verstärkung der Transkription
HEC	Hydroxyethyl-Cellulose
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]-piperazin-N'-[2-Ethansulfonsäure]
HR	hypersensitive response (= hypersensitive Reaktion)
HSP	Heringssperma-DNA
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
JA	Jasmonsäure
kb	kiloBasen
Kit	Produkt mit allen Komponenten, die man für einen Versuch braucht.
λ	Bakteriophage Lambda
<i>lacZ</i>	β-Galactosidase-Gen
LB	Luria-Bertani Broth
Leu	Leucin
LiAc	Lithiumacetat
MCS	multiple Klonierungsstelle
Met	Methionin
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure

MS	Murashige und Skoog Medium
MU	Methylumbelliferon
MUG	Methylumbelliferyl- β D-Glucuronid
NLS	Kernlokalisationsignal
NPR1	<i>nonexpresser of PR genes 1</i>
OD	optische Dichte
oNPG	o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid
Poly(A)-	Polyadenyl-
PR	pathogenesis-related
Primer	Oligonukleotid, das als Startfragment für eine DNA-Synthese dient
PVDF	Polyvinylidene Fluorid
R	Formelzeichen für Widerstand
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	reactive oxygen species (= reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)
RT	Raumtemperatur
SA	Salizylsäure
SAI	salicylic acid-insensitiv (= Salicylsäure-insensitiv)
SCL14	Scarecrow-like 14
SD	Hefe Minimalmedium
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde(n)
ss	einzelsträngig (single stranded)
T	Thymin
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N' - Tetraethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trp	Tryptophan
U	definierte Enzym-Einheit (unit)
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolettes Licht
v/v	Volumenprozent (volume per volume)

w/v	Gewichtsprozent (weight per volume)
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-Galactopyranosid

Einzelbuchstabenkürzel für Aminosäuren

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

Danksagung

Zunächst möchte ich Frau Professorin Dr. Christiane Gatz dafür danken, dass ich dieses Thema vertiefen durfte, und dass sie mich stets unterstützt hat. Ich bin ihr besonders für die angenehme Atmosphäre während der gesamten Zeit und insbesondere während der Endphase dieser Arbeit dankbar.

Ein Dankeschön geht auch an PD Dr. Wolfgang Droege-Laser, der nicht nur das Korreferat übernommen hat, sondern mich auch stets bereitwillig mit Kaffee versorgt hat. Danke, Wolfgang !

Ein Dank geht auch an das Graduiertenkolleg 521, das diese Arbeit unterstützt hat.

Nicht vergessen möchte ich die Menschen, die das Laborleben in unserer Abteilung aufrecht erhalten. Ein großes Danke geht daher an Ronald, Annette, Larissa und Anna. Ihr habt mir sehr geholfen.

Heike Freundt möchte dafür danken, dass sie stets da war, wenn etwaige Probleme auftauchten und immer einen Rat wusste.

Dr. Guido Kriete danke ich für die Unterstützung bei den Protoplasten-Assays und auch dafür, dass er uns alle organisatorischen Aufgaben abnimmt. Ich weiß das zu schätzen.

Ein großes Dankeschön geht an Dr. Corinna Thurow, weil sie mir viele Tipps gegeben hat und immer bereit war, über mein Thema zu diskutieren. Danke auch für das Lesen dieser Arbeit.

Meik und Hella gebührt ein sehr großer Dank dafür, dass sie diese Arbeit in kürzester Zeit korrekturgelesen haben.

Ivan, Benjamin, Marco, Katrin, Iris, Kazi und Thomas möchte ich für ihre vielfache Hilfe danken. Viel Erfolg auf dem Gebiet der SCL14-Forschung, Benjamin !

Ein dickes Dankeschön geht natürlich an meine Laborkollegen aus Raum 317 ! Danke Ralf, Matze und Katja. Miriam möchte ich ganz besonders für die Zeit danken, in der wir nebeneinander gegessen haben. Danke für die Pausen und dafür, dass Du meine Vorliebe für die „Turm-Mensa“ unterstützt hast.

Auf gar keinen Fall vergessen möchte ich die Leute „von unten“. Danke Stefan, Andrea, Tim, Thomas, Caroline, Katrin und allen „Ehemaligen“ für die Kaffeepausen und den gemeinsamen Spaß.

Ein großes Danke geht auch an Heike, Ute, Dennis, Yu und Thorsten. Danke für die paper, für alle Tipps und Eure moralische Unterstützung.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich während des Studiums und dieser Arbeit stets unterstützt haben. Ein Dankeschön auch an Siegfried Weltmeier für seine großzügige Unterstützung.

Und zu guter letzt ein ganz, ganz großes Dankeschön an Fridtjof. Danke für alles.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Tanja Siemsen

Geboren am: 20.10.1974 in Göttingen

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

STUDIUM

- | | |
|-----------------|---|
| seit 04/ 2002 | Promotion am „Albrecht-von-Haller“ Institut für Pflanzenwissenschaften |
| 04/02 bis 03/05 | Stipendium des Graduiertenkollegs 521 |
| 10/96 bis 03/02 | Hauptstudium der Biologie an der Georg-August-Universität in Göttingen
Diplomprüfung in den Fächern: Botanik, Mikrobiologie und Biochemie |
| 10/94 bis 09/96 | Grundstudium der Biologie an der Georg-August-Universität in Göttingen
Vordiplom in den Fächern: Botanik, Mikrobiologie, Physik und Chemie |

SCHULE

08/87 bis 06/94	Hainberg Gymnasium, Göttingen Abschluß: Abitur
08/85 bis 06/87	Orientierungsstufe Jahnschule, Göttingen
08/81 bis 06/85	Grundschule Egelsbergschule, Göttingen