

**Die Rolle der beiden Transkriptionsfaktoren AtbZIP1
und AtbZIP53 aus *Arabidopsis thaliana* in der
Anpassung des pflanzlichen Metabolismus an
Energiemangelbedingungen**

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

vorgelegt von
Katrin Dietrich
aus Wilhelmshaven

Göttingen 2010

D7

Referent: Prof. Dr. Wolfgang Dröge-Laser

Korreferent: Prof. Dr. Christiane Gatz

Tag der mündlichen Prüfung: 29.04.2010

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung.....	3
2.1	Die Auswirkungen von Zuckerverfügbarkeit und Energiemangel auf das Wachstum der Pflanze	3
2.2	Die Anpassung der Genexpression an Energiemangelbedingungen ist nicht nur abhängig vom Zuckerstatus der Pflanze, sondern auch eng verknüpft mit anderen Faktoren wie Stickstoffverfügbarkeit und Licht	4
2.3	Zuckererkennung und zuckervermittelte Signaltransduktion	6
2.4	Die SnRK-Kinasen KIN10 und KIN11 aus <i>Arabidopsis</i> als zentrale Regulatoren des Primärstoffwechsels unter Energiemangelbedingungen	9
2.5	Pflanzliche bZIP Transkriptionsfaktoren.....	14
2.6	Die Bedeutung der Gruppe S1 und C AtbZIP Transkriptionsfaktoren für die Anpassung an Energiemangelbedingungen	18
2.7	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	21
3	Material.....	23
3.1	Organismen	23
3.1.1	Bakterien	23
3.1.2	Pflanzen.....	23
3.2	Nukleinsäuren	24
3.2.1	Plasmide	24
3.2.2	Oligonukleotide.....	25
3.2.3	Hybridisierungssonden.....	28
3.3	Größenstandards	28
3.3.1	DNA-Größenstandard	28
3.3.2	Protein-Größenstandard	28
3.4	Antikörper	28
3.5	Nährmedien und Zusätze	29
3.5.1	Bakterienmedien	29
3.5.2	Pflanzenmedien	29
3.5.3	Medienzusätze.....	29
3.5.3.1	Antibiotika	29
3.5.3.2	Agar.....	30
3.5.3.3	Sonstige Zusätze.....	30

3.6	Lösungen und Puffer	30
3.7	Geräte	34
3.8	Verbrauchsmittel	35
3.9	Chemikalien	35
3.10	Radiochemikalien	36
3.11	Enzyme	37
3.12	Kits	37
4	Methoden	38
4.1	Bakterienanzucht, Lagerung und Transformation	38
4.1.1	Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	38
4.1.2	Anzucht von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	38
4.1.3	Lagerung der Bakterien	38
4.1.4	Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i>	38
4.1.5	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	39
4.1.6	Herstellung kompetenter <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	39
4.1.7	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	39
4.2	Pflanzenanzucht und Transformation	40
4.2.1	Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> auf Erde	40
4.2.2	Oberflächensterilisation und sterile Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> auf MS-Platten	40
4.2.3	Dunkelinduzierte Seneszenz	41
4.2.4	„Flower-dip“ Transformation	41
4.2.5	Selektion auf Basta [®] -Resistenz	42
4.2.6	Selektion auf Hygromycin-Resistenz	42
4.2.7	Kreuzen von <i>Arabidopsis thaliana</i> Pflanzen	43
4.2.8	<i>Arabidopsis thaliana</i> -Protoplasten-Transformation	43
4.2.8.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> -Protoplasten-Gewinnung	43
4.2.8.2	<i>Arabidopsis thaliana</i> -Protoplasten-PEG-Transformation	44
4.2.8.3	<i>Arabidopsis thaliana</i> -Protoplasten-Ernte	44
4.2.8.4	Messung der β -Glucuronidase (GUS)-Aktivität	45
4.2.8.5	Messung der NAN-Aktivität und NAN-Abgleich	45
4.3	Extraktion genomischer DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	46
4.4	Polymerase-Kettenreaktion	47
4.4.1	Mutagenese-PCR	48
4.5	Klonierung von amiRNA-Konstrukten	49
4.5.1	Estradiol-Induktion	51
4.6	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	51

4.7	Restriktionsspaltung von DNA	52
4.8	Agarosegelelektrophorese von DNA-Molekülen	52
4.9	DNA-Elution aus Agarosegelen	53
4.10	Ligation	53
4.11	Blau-Weiß-Selektion.....	53
4.12	Gateway-Rekombination	54
4.12.1	BP-Reaktion	54
4.12.2	LR-Reaktion.....	55
4.13	Colony-Screen mittels PCR	55
4.14	Plasmid-Präparation mit Hilfe von Kits.....	55
4.15	Plasmid-Präparation durch alkalische Lyse	56
4.16	DNA-Sequenzierung.....	56
4.17	RNA Extraktion mit Trizol	58
4.18	Northern Blot Analyse	58
4.18.1	Auftrennung von RNA in denaturierenden Agarosegelen.....	58
4.18.2	Kapillar Blot.....	59
4.18.3	Herstellen einer radioaktiv markierten DNA-Sonde.....	59
4.18.4	Hybridisierung der Northern Blot Membran	60
4.18.5	Rehybridisierung	60
4.19	RT-PCR mit quantitativer Real-Time-PCR.....	61
4.19.1	RT-PCR.....	61
4.19.2	Quantitative Real-Time-PCR.....	62
4.20	Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)	63
4.20.1	Kreuzvernetzung der DNA-Protein Komplexe.....	63
4.20.2	Isolation der Kerne.....	63
4.20.3	Fragmentierung des Chromatins	64
4.20.4	Immunopräzipitation	65
4.21	Herstellung von Proteinextrakten aus Pflanzen	66
4.22	Western Blot Analyse	67
4.22.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	67
4.22.2	Proteintransfer auf PVDF-Membranen	67
4.22.3	Immunodetektion mit dem ECL+ System	67
4.23	Messung des Chlorophyllgehalts	68
4.24	Stärkenachweis in <i>Arabidopsis</i>	69
4.24.1	Stärkefärbung von <i>Arabidopsis</i> Pflanzen.....	69
4.24.2	Quantitative Messung des Stärkegehalts.....	69

4.25	Bestimmung des Aminosäuregehalts mittels HPLC.....	69
4.26	Massenspektrometrische Bestimmung der Metabolitgehalte	70
4.27	Verwendete Computerprogramme.....	71
5	Ergebnisse	72
5.1	Eine verlängerte Dunkelphase als experimentelles Modellsystem für Studien der Energieverarmung in Pflanzen.....	72
5.2	Viele bZIP Transkriptionsfaktoren werden während der verlängerten Nacht transkriptionell induziert.....	74
5.3	<i>AtbZIP1</i> und <i>AtbZIP53</i> werden während der verlängerten Nacht transkriptionell aktiviert.....	76
5.4	Die Überexpression von <i>AtbZIP1</i> bzw. <i>AtbZIP53</i> führt zu einem verfrühten Eintritt in die dunkelinduzierte Seneszenz.....	79
5.5	Die Überexpression von <i>AtbZIP1</i> bzw. <i>AtbZIP53</i> führt zu einer verstärkten Expression von Genen des Primärstoffwechsels	80
5.5.1	Gene des Lipidstoffwechsels werden durch <i>AtbZIP1</i> und <i>AtbZIP53</i> reguliert	82
5.5.2	Der Kohlenhydratmetabolismus wird durch <i>AtbZIP1</i> und <i>AtbZIP53</i> beeinflusst	86
5.5.3	Die Überexpression von <i>AtbZIP1</i> und <i>AtbZIP53</i> führt zu einer veränderten Expression von Genen aus Aminosäureabbau und -Biosynthese	92
5.5.3.1	Die verstärkte Expression der <i>ProDH</i> in den Überexpremierern führt zu einem reduzierten Prolingehalt dieser Pflanzen während der verlängerten Nacht	94
5.5.3.2	Die <i>BCAT2</i> wird in den Überexpremierern von <i>AtbZIP1</i> und <i>AtbZIP53</i> verstärkt expremiert und führt zu einer Reduktion der verzweigten Aminosäuren.....	99
5.5.3.3	Die Überexpression von <i>AtbZIP1</i> und <i>AtbZIP53</i> führt zu einer verstärkten Expression der Gene der Asparagin Biosynthese während der verlängerten Nacht	103
5.6	<i>ASN1</i> und <i>ProDH</i> werden auch im Protoplasten-System durch dunkelinduzierte Energieverarmung aktiviert	110
5.6.1	Auch andere bZIP Transkriptionsfaktoren können im Protoplastensystem <i>ProDH</i> und <i>ASN1</i> aktivieren.....	114
5.6.2	Eine G-Box im <i>ASN1</i> Promotor sowie zwei ACTCAT Motive und eine C-Box im <i>ProDH</i> Promotor sind notwendig für die Aktivierung der beiden Gene durch Dunkelheit	116
5.7	Verschiedene „loss-of-function“ Ansätze führen zu einer Reduktion der bZIP vermittelten Expression der Zielgene des Aminosäuremetabolismus	120

5.7.1	Die Expression einer Fusion aus AtbZIP1 bzw. AtbZIP53 mit der EAR-Repressor-Domäne kann die dunkelinduzierte Aktivierung der <i>ProDH</i> verhindern	120
5.7.2	Vierfachmutanten von AtbZIP1, AtbZIP53 und Mitgliedern der Gruppe C der bZIP Transkriptionsfaktoren führen zu einer deutlichen Reduktion der Expression von <i>ProDH</i> , <i>BCAT2</i> und <i>ASN1</i>	122
5.8	Bedeutung der beiden SnRK1-Kinasen KIN10 und KIN11 als mögliche Regulatoren der bZIP Transkriptionsfaktoren in der Anpassung an Energieverarmung.....	126
5.8.1	Die Expression von KIN10 bzw. KIN11 führt zu einer Aktivierung von <i>ProDH</i> und <i>ASN1</i> im Protoplastensystem	127
5.8.2	KIN10 und KIN11 regulieren nicht die Transkription von <i>AtbZIP1</i> und <i>AtbZIP53</i>	128
5.8.3	Die Mutation putativer SnRK-Phosphorylierungsstellen in AtbZIP1 bzw. AtbZIP53 hat keinen Einfluss auf die Aktivierung der <i>ProDH</i>	130
5.8.4	Die Mutation putativer SnRK-Phosphorylierungsstellen in AtbZIP63 führt zu einer Reduktion der <i>ProDH</i> Expression.....	133
6	Diskussion	136
6.1	Protoplasten und transgene Pflanzen: Vor- und Nachteile zweier Modellsysteme zur Untersuchung von Energiemangel in Pflanzen	136
6.2	Die beiden Transkriptionsfaktoren AtbZIP1 und AtbZIP53 werden transkriptionell und posttranskriptionell durch Energieverarmung aktiviert..	138
6.3	AtbZIP1 und AtbZIP53 führen unter Energiemangelbedingungen zu einer Umprogrammierung des pflanzlichen Kohlenhydratmetabolismus	140
6.4	AtbZIP1 und AtbZIP53 aktivieren unter Energiemangel Gene des Lipid- und Aminosäurestoffwechsels	144
6.5	AtbZIP1 und AtbZIP53 kontrollieren die Transkription von Genen des Aminosäurestoffwechsels über Bindung an G-Box-, C-Box- und ACTCAT-Promotorelemente	149
6.6	Unter Energiemangelbedingungen zeigen bZIP Transkriptionsfaktoren des C/S1-Netzwerks eine partielle Redundanz	151
6.7	Die SnRK1 Kinasen KIN10 und KIN11 aktivieren unter Energiemangel das C/S1-bZIP Transkriptionsfaktor-Netzwerk wahrscheinlich über eine Phosphorylierung von AtbZIP63	155
6.8	Modell: SnRK1 Kinasen und bZIP Faktoren des C/S1 Netzwerks vermitteln eine Reprogrammierung des pflanzlichen Metabolismus unter Energiemangelbedingungen.....	158
7	Literaturverzeichnis.....	160

8	Anhang	181
8.1	Zusätzliche Informationen	181
8.1.1	Northern Analyse der Expression der Lipoxygenasen <i>LOX3</i> , <i>LOX4</i> , <i>LOX5</i> und <i>LOX6</i>	181
8.1.2	Expression der β -Amylasen <i>BAM1-4</i> und <i>BAM6-9</i>	182
8.1.3	Expression von <i>AtbZIP1</i> und <i>AtbZIP53</i> in Wildtyp, <i>AtbZIP1</i> und <i>AtbZIP53</i> Überexpresmierern und Doppelmutante	183
8.1.4	Aminosäuresequenz von <i>AtbZIP1</i>	184
8.1.5	Aminosäuresequenz von <i>AtbZIP53</i>	184
8.1.6	Aminosäuresequenz von <i>AtbZIP63</i>	185
8.1.7	ACGT Elemente in den Promotoren der untersuchten Aminosäuregene .	186
8.1.8	Charakterisierung der <i>AtbZIP</i> Einzel- und Mehrfachmutanten	187
8.2	Tabellarische Darstellung der Originaldaten aus der Aminosäuremessung ...	188
9	Abkürzungsverzeichnis	193
9.1	Allgemeine Abkürzungen	193
9.2	Einheiten	195
9.3	Präfixe	195
9.4	Aminosäuren	195
9.5	Nukleotide	196

1 Zusammenfassung

Energiemangelbedingungen, wie sie während langanhaltender Dunkelheit auftreten, führen zu einer massiven Umprogrammierung des pflanzlichen Metabolismus. Dies hat den Abbau von Proteinen, Aminosäuren und Nukleinsäuren sowie die Hydrolyse von Polysacchariden und Oxidation von Fettsäuren zur Folge, die unter diesen Bedingungen als alternative Energiequellen genutzt werden. Zentrale Regulatoren dieser pflanzlichen Anpassung an Energiemangel sind die SnRK1 (Snf1 RELATED KINASES) Kinasen KIN10 und KIN11. In dieser Arbeit werden die beiden bZIP (basic leucine zipper) Transkriptionsfaktoren (TF) AtbZIP1 und AtbZIP53 identifiziert, die ein Teil dieses SnRK1 Signalweges sind. Besonders AtbZIP1, aber auch AtbZIP53, werden sowohl transkriptionell als auch posttranskriptionell durch Energiemangel aktiviert.

Die Überexpression von AtbZIP1 und AtbZIP53 führt zu einem verfrühten Eintritt in die dunkelinduzierte Seneszenz. Unter diesen Bedingungen kommt es in den Überexpremierern zu einem verstärkten Abbau von Aminosäuren wie Prolin, Leucin, Isoleucin und Valin. Die Aminosäure Asparagin, die als Transportform für Kohlenstoff und Stickstoff unter Mangelbedingungen dient, wird dagegen in AtbZIP53 Überexpremierern verstärkt gebildet. Dagegen werden in den AtbZIP53 Überexpressionspflanzen die Stärke- und Saccharosereserven trotz Energiemangel nur begrenzt als Energiequelle genutzt.

Die Unterschiede in den Metaboliten des Primärstoffwechsels zwischen Überexpremierern und Wildtyp kommen durch eine veränderte Genexpression zustande. Gene wie *PROLIN DEHYDROGENASE (ProDH)* und *BRANCHED CHAIN AMINO ACID TRANSAMINASE 2 (BCAT2)*, deren Genprodukte zum Abbau von Aminosäuren führen, werden in beiden Überexpremierern ebenso transkriptionell aktiviert wie die *ASPARAGIN SYNTHETASE 1 (ASN1)* und andere Gene der Asparagin Biosynthese. Gene, die für Enzyme des Lipidabbaus wie verschiedene Lipasen und Lipoxygenasen codieren, werden in beiden Überexpremierern aktiviert, während die Genexpression stärkeabbauender Enzyme wie der β -AMYLASE5 (BAM5), vor allem in den AtbZIP53 Überexpremierern stark reduziert ist.

ChIP (Chromatin Immunopräzipitation) Analysen belegen eine direkte Bindung von AtbZIP1 und AtbZIP53 an die Promotoren von *ProDH* und *ASN1*. In Experimenten mit Promotormutanten konnte zudem gezeigt werden, dass typische bZIP-Bindestellen wie eine G-Box im *ASN1* Promotor und zwei ACTCAT Motive im *ProDH* Promotor essentiell für die Induktion dieser Gene unter Energiemangelbedingungen sind.

Da die bZIP TF teilweise redundante Funktionen übernehmen, zeigen „loss-of-function“-Ansätze mit Einzelmutanten von AtbZIP1 und AtbZIP53 oder der Doppelmutante *atbzip1 atbzip53* in der Expression ihrer Zielgene nur geringe Unterschiede zum Wildtyp. Vierfachmutanten von AtbZIP1 und AtbZIP53 mit je zwei der vier heterodimerisierenden Gruppe C Faktoren führen dagegen zu einer deutlichen Reduktion der dunkelinduzierten Expression von *ProDH*, *BCAT2* und *ASN1*.

Versuche zur Energieverarmung im Protoplastensystem zeigen deutlich den Einfluss der Kinasen KIN10 und KIN11 auf die Expression von *ASN1* und *ProDH*. Co-Expression der Kinasen mit AtbZIP1 und AtbZIP53 hat einen synergistischen Effekt auf die Aktivierung der beiden Gene, was zeigt, dass AtbZIP1 und AtbZIP53 Teil des kinaseabhängigen Signalweges zur Aktivierung von *ASN1* und *ProDH* unter Energiemangelbedingungen sind. Durch Mutation putativer SnRK1-Phosphorylierungsmotive in der Aminosäuresequenz von AtbZIP1 und AtbZIP53 kann aber eine Aktivierung durch eine direkte Phosphorylierung an diesen Motiven ausgeschlossen werden. Die Mutation von *in vivo* phosphorylierten Serinen ihres Heterodimerisierungspartners AtbZIP63 führt allerdings zu einer deutlichen Reduktion der KIN10 vermittelten *ProDH*-Aktivierung. Es wird deshalb postuliert, dass die SnRK1-Kinasen Heterodimere des C/S1-Netzwerks posttranslational aktivieren und so zur Änderung der Genexpression und damit zur Umprogrammierung des Metabolismus unter Energiemangelbedingungen beitragen.

2 Einleitung

2.1 Die Auswirkungen von Zuckerverfügbarkeit und Energiemangel auf das Wachstum der Pflanze

Pflanzen sind in ihrer Umwelt ständig wechselnden Bedingungen ausgesetzt, in denen auch die Verfügbarkeit von Energie stark schwankt. Ein Beispiel dafür ist der tägliche Wechsel von Licht und Dunkelheit. Pflanzen sind darauf angewiesen, das Licht während des Tages zu nutzen um Photosynthese zu betreiben, in der aus Kohlendioxid (CO₂) und Wasser (H₂O) Zucker produziert werden. Diese Zucker benötigt die Pflanze zum Leben und Wachsen. Auch während der Nacht finden weiterhin energieverbrauchende Stoffwechselprozesse statt, die ein Wachstum der Pflanze gewährleisten (Schurr et al., 2006). Dies ist nur möglich, weil ein Teil des fixierten Kohlenstoffs während des Tages in Form von Stärke gespeichert wird. Die Stärke kann dann im Verlauf der Nacht remobilisiert und bis zum Beginn der nächsten Lichtphase fast vollständig verbraucht werden (Fondy und Geiger, 1985; Geiger und Servaites, 1994; Matt et al., 1998; Smith et al., 2004).

Änderungen der Umweltbedingungen wie längere Dunkelphasen während des Herbstes führen dazu, dass kurzzeitig am Ende der längeren Nacht ein Mangel an Kohlenstoff entsteht. Die Pflanze kann ihren Metabolismus aber an diese neuen Umweltbedingungen anpassen. Die Stärkesynthese während des Tages wird erhöht und gleichzeitig der Stärkeabbau und die Wachstumsrate während der Nacht herabgesetzt (Gibon et al., 2004; Smith und Stitt, 2007; Usadel et al., 2008). So wird vermieden, dass über längere Zeiträume hinweg Versorgungslücken im Kohlenstoffhaushalt entstehen, die zu einem Wachstumsstop führen würden. Denn schon kurze Zeiträume der Kohlenstoffverarmung führen zu einer Inhibierung des Wachstums, die nicht sofort reversibel ist, wenn Kohlenstoff wieder verfügbar ist (Smith und Stitt, 2007; Usadel et al., 2008).

Welche wichtige Rolle Stärke als Speicherstoff bei dieser Anpassung der Pflanze an die täglich wechselnde Verfügbarkeit von Kohlenstoff hat, zeigen zwergwüchsige Stärkemutanten wie die *pgm* (*PHOSPHOGLUCOMUTASE*) Mutante. Jede Nacht sind

sie einem Mangel an Kohlenstoff ausgesetzt, der zu einer Inhibierung des Wachstums führt, die noch bis in den nächsten Tag hinein anhält (Gibon et al., 2004; Caspar et al., 1985). Ein hoher Stärkegehalt korreliert aber nicht unbedingt mit einem starken Wachstum der Pflanzen. Langsam wachsende Pflanzen akkumulieren viel Stärke, während schnell wachsende Pflanzen mit viel Biomasse ihre Kohlenstoffreserven in Wachstumsprozesse investieren und dadurch niedrige Stärke- und Zuckermengen aufweisen (Sulpice et al., 2009).

Generell führen Änderungen im Kohlenstoff-/Energiegehalt der Pflanze zu einer massiven Änderung der Genexpression. Ein hoher Zuckergehalt induziert dabei Gene, die für Biosynthese und Wachstum verantwortlich sind, während Zuckermangel zu einer Aktivierung von Genen führt, die zur weiteren Kohlenstoffassimilation beitragen oder für den Abbau von alternativen Kohlenstoffquellen sorgen (Koch, 1996; Usadel et al., 2008). Energiemangel während einer verlängerten Nacht führt so zu einer Umprogrammierung des Metabolismus, die letztendlich zum Abbau von Proteinen, Aminosäuren und Nukleinsäuren sowie zur Hydrolyse von Polysacchariden und zur Oxidation von Fettsäuren führt (Smart, 1994). Die koordinierte Expression der hierfür verantwortlichen Gene wird durch eine komplexe Signalverarbeitung vermittelt.

2.2 Die Anpassung der Genexpression an Energiemangelbedingungen ist nicht nur abhängig vom Zuckerstatus der Pflanze, sondern auch eng verknüpft mit anderen Faktoren wie Stickstoffverfügbarkeit und Licht

Das Wachstum der Pflanze ist abhängig von vielen Faktoren, eine besondere Rolle spielt jedoch die Verfügbarkeit von Zuckern. Zucker werden von der Pflanze nicht nur für ihr Wachstum benötigt, sondern dienen auch als Signalmoleküle (zur Übersicht: Ramon et al., 2008).

Die Identifizierung von Signalwegen des Zuckerstoffwechsels der Pflanze ist kompliziert, da diese eng verknüpft sind mit der Lichtwahrnehmung, der inneren Uhr, Nährstoffverfügbarkeit, Hormonen oder auch dem allgemeinen Entwicklungsstand der Pflanze (zur Übersicht: Rolland et al., 2006; Smith und Stitt, 2007). So ist z.B. bekannt, dass Zucker die Phytochrom gesteuerte Wahrnehmung von Licht und die darauf

folgende Signalvermittlung beeinflussen können (Dijkwel et al., 1997). Gene die für typische Enzyme der Photosynthese, wie das CHLOROPHYLL A/B BINDENDE PROTEIN, PLASTOCYANIN oder die kleine Untereinheit der RUBISCO codieren, werden stark durch Licht induziert, dagegen aber durch Zucker reprimiert (Koch, 1996). Andere Gene werden sowohl durch Zucker als auch durch Licht induziert. Dazu gehören z.B. die *GLUTAMIN SYNTHETASE*, die *NITRAT REDUKTASE* und die *ASPARAGIN SYNTHETASE 2* (Koch, 1996; Lam et al., 1998; Oliveira und Coruzzi, 1999).

Auch zwischen der zucker- und der stickstoffvermittelten Signaltransduktion besteht eine enge Verbindung. Viele Gene von Stickstofftransportern sind z.B. auch durch Zucker induzierbar (Lejay et al., 1999; Lejay et al., 2008). Auch viele andere Gene werden durch Zucker, Stickstoff oder eine Kombination von beiden induziert, wie genomweite Transkriptionsanalysen gezeigt haben (Wang et al., 2003; Palenchar et al., 2004; Price et al., 2004; Scheible et al., 2004; Gutiérrez et al., 2007).

Ein gutes Beispiel für die komplexe Integration vieler verschiedener Signale ist die Regulation der Asparagin und Glutamin Biosynthese. Die Expression der für diese Enzyme codierenden Gene wird durch Zucker, Licht, die innere Uhr und die Stickstoffverfügbarkeit bestimmt (Melo-Oliveira et al., 1996; Oliveira und Coruzzi, 1999; Lam et al., 1994; Lam et al., 1998; Gutierrez et al., 2008).

Während tagsüber hauptsächlich Glutamin als Transportform für Stickstoff und Kohlenstoff in der Pflanze dient, übernimmt nachts, wenn der Zuckergehalt niedrig ist, Asparagin diese Funktion. Der Grund hierfür liegt in der Struktur dieser beiden Aminosäuren. Während Glutamin aus fünf Kohlenstoffatomen und zwei Stickstoffatomen besteht, hat Asparagin bei gleicher Menge Stickstoff ein Kohlenstoffatom weniger. Unter Kohlenstoffmangelbedingungen während der Dunkelheit wird deshalb bevorzugt Asparagin gebildet und transportiert (Lam et al., 1994).

Die Verfügbarkeit von Glutamin während des Tages und Asparagin während der Nacht wird durch eine koordinierte Expression ihrer Biosynthesegene gewährleistet. So induziert Licht während des Tages die Expression der *GLUTAMIN SYNTHETASE 2* (*GLNS2*) und sorgt so für hohe Glutaminmengen. Die Expression der *ASPARAGIN SYNTHETASE 1* (*ASN1*) wird dagegen durch Licht reprimiert. Auch Zucker führen zu

einer Induktion der *GLNS2*. Im Gegensatz dazu wird die Expression der *ASN1* durch Zucker reprimiert (Thum et al., 2003). Sowohl von der *GLUTAMIN SYNTHETASE* als auch von der *ASPARAGIN SYNTHETASE* gibt es mehrere Isoformen (z.B. *ASN1*, *ASN2*, *ASN3*), die jeweils unterschiedlich, teils sogar gegenläufig, durch Licht, Zucker und Stickstoff reguliert werden (Lam et al., 1998). Die Endprodukte der Stickstoffassimilation, Glutamat und Glutamin, dienen ihrerseits wieder als Signalmoleküle, die den Stickstoffstatus der Pflanze anzeigen und durch eine „Feedback“-Hemmung die Expression der beteiligten Synthesegene regulieren.

Die Mengen von Asparagin und Glutamin in der Pflanze sind aber nicht nur abhängig von Zucker, Licht und Stickstoff, sondern auch von der Expression des wichtigsten Kontrollgens der inneren Uhr *CCA1* (*CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1*). Die Expression von *CCA1* reduziert die Asparaginsmengen indem die Transkription des bZIP Transkriptionsfaktors *AtbZIP1* reprimiert wird (siehe Kapitel 2.6). *AtbZIP1* ist ein positiver Regulator der *ASN1* Transkription (Baena-Gonzales et al., 2007). *CCA1* induziert aber auch direkt die Expression einer *GLUTAMIN SYNTHETASE* (*GLNS1.3*; Gutierrez et al., 2008) und sorgt dadurch für eine Erhöhung des Glutamingehalts.

Die Regulation der Glutamin- und Asparaginsynthese ist ein gutes Beispiel für die komplexe Integration der verschiedenen Signale. Sie zeigt, wie schwierig es tatsächlich ist, die Effekte eines einzelnen Signalweges zu untersuchen.

2.3 Zuckererkennung und zuckervermittelte Signaltransduktion

Zucker sind sehr potente Signalmoleküle und können die Expression von tausenden von Genen beeinflussen (Price et al., 2004; Thimm et al., 2004; Thum et al., 2004; Bläsing et al., 2005; Li et al., 2006; Osuna et al., 2007).

Die am besten beschriebenen Zuckerrezeptoren in *Arabidopsis* sind zwei Hexokinasen (*HXK1* und *HXK2*) (Rolland et al., 2002). Die *HXK1* phosphoryliert Glukose und Fruktose zu Hexose-6-Phosphaten und katalysiert damit den ersten Schritt der Glykolyse. Neben der metabolischen Funktion dient die *HXK1* auch als Glukoserezeptor und initiiert damit die weitere Signaltransduktion. Die Expression vieler Zucker regulierter Gene wird über einen Hexokinase abhängigen Signalweg

moduliert. Ein Beispiel dafür ist die Hexokinase vermittelte Reprimierung von Photosynthese-Genen durch Glukose.

Allerdings existiert auch eine ganze Reihe von Genen, deren Expression nicht Hexokinase abhängig ist. So werden einige dunkelinduzierte (DIN) Gene wie z.B. die *ASN1* bei Zuckermangel auch noch in der *hxx1* Nullmutante reprimiert (Baena-Gonzales und Sheen, 2008). RGS1 (REGULATOR OF G-PROTEIN SIGNALING 1) ist ein Plasmamembran gebundenes Protein, das eine Rolle in der pflanzlichen Zellvermehrung spielt und möglicherweise als Hexokinase unabhängiger Glukoserezeptor fungiert (Chen et al., 2003; Chen und Jones, 2004).

Auch andere Zucker können eine Funktion als Signalmolekül in der Pflanze übernehmen. Ein Beispiel ist Trehalose-6-Phosphat (T6P). T6P ist ein Zwischenprodukt der Trehalosesynthese, das nur in sehr geringen Mengen in der Pflanze vorliegt. In vielen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die T6P Mengen in der Pflanze sehr stark mit dem Saccharosegehalt korrelieren, sogar stärker als die Mengen von Glukose und Fruktose (Lunn et al., 2006; Paul, 2008). T6P ist damit ein Indikator für die Saccharosemenge in der Zelle und kann in dieser Funktion möglicherweise Prozesse wie die Stärkesynthese regulieren (Kolbe et al., 2005). Erst vor kurzem konnte gezeigt werden, dass T6P die Aktivität von SnRK Kinasen (Snf1 RELATED KINASES) inhibiert (Zhang et al., 2009), die zentrale Regulatoren des primären Metabolismus während Energiemangel sind (Baena-Gonzales et al., 2007; siehe Kapitel 2.4).

Ein weiterer Zucker, der auch als Signalmolekül wirken kann, ist Fruktose-2,6-Bisphosphat (Stitt, 1990). Durch Fruktose-2,6-Bisphosphat werden u.a. wichtige Enzyme der Glykolyse wie die PHOSPHOFRUCTOKINASE (PFK1) und FRUCTOSE-1,6-BISPHOSPHATASE (FBPase1) allosterisch kontrolliert (Stryer, Biochemie).

Auch Disaccharide, wie die Saccharose, können eine Funktion als Signalmolekül haben. Viele der durch Saccharose ausgelösten Effekte sind zwar auf die Eigenschaften ihrer monomeren Bestandteile Glukose und Fruktose zurückzuführen, es gibt aber auch eine saccharosespezifische Regulation von Transkription und Translation. So wird die Expression von *UDP-GLUKOSE PYROPHOSPHORYLASE*, *ANTHOCYANIN BIOSYNTHESIS ENZYME* und einem putativen chloroplastidären *GLUCOSE-6-*

PHOSPHATE/PHOSPHATE TRANSLOCATOR durch Saccharose induziert (Wenzler et al., 1989; Yokoyama et al., 1994; Ciereszko et al., 2001; Teng et al., 2005; Gonzali et al., 2006; Solfanelli et al., 2006). Die Expression eines *PROTON-SUCROSE SYMPORTER* Gens aus Zuckerrübe wird dagegen durch Saccharose reprimiert (Chiou und Bush, 1998; Vaughn et al., 2002).

Nach der Erkennung der Zucker durch verschiedene Rezeptoren wird die Information über eine komplexe Signaltransduktion weitergeleitet und führt schließlich zur Änderung der oben beschriebenen Genexpression, oder auch zu einer Veränderung von Enzymaktivitäten.

Eine molekulare Komponente der zuckervermittelten Signaltransduktion sind Protein Phosphatasen. Erste Hinweise auf eine Beteiligung von Phosphatasen am Zuckersignalweg lieferten Versuche mit PP1 und PP2A Phosphatase Inhibitoren, die, wie die Behandlung mit Zuckern, zu einer Repression von Photosynthese-Genen in Maisprotoplasten führten (Sheen, 1993). Auch die saccharoseinduzierte Expression von Genen wie der β -*AMYLASE* aus Süßkartoffel konnte durch Phosphatase Inhibitoren verhindert werden (Takeda et al., 1994).

Studien mit dem Calciumkanal-Blocker LaCl_3 und Calmodulin Inhibitoren in Süßkartoffel zeigten, dass Ca^{2+} eine wichtige Funktion in der zuckerinduzierten Expression von Genen wie der β -*AMYLASE* hat. Möglicherweise wirkt Ca^{2+} dadurch, dass es die Proteinphosphorylierung im Zuckersignalweg ermöglicht (Boudsocq und Sheen, 2008), denn Saccharose kann den cytosolischen Calciumeinstrom induzieren und so die Expression einer calciumabhängigen Protein Kinase aus Tabak verstärken (Iwata et al., 1998; Furuichi et al., 2001).

Auch Protein Kinasen haben eine wichtige Bedeutung in der Zuckersignaltransduktion. Dies konnte durch Versuche mit dem Protein Kinase Inhibitor Staurosporin gezeigt werden (Ehness et al., 1997). Erst kürzlich wurden die beiden Kinasen KIN10 und KIN11 aus *Arabidopsis* beschrieben, die als Masterregulatoren eines Netzwerks aus Transkriptionsfaktoren die Genexpression unter Energiemangelbedingungen regulieren (Baena-Gonzalez et al., 2007; Baena-Gonzalez und Sheen, 2008).

2.4 Die SnRK-Kinasen KIN10 und KIN11 aus *Arabidopsis* als zentrale Regulatoren des Primärstoffwechsels unter Energiemangelbedingungen

Die beiden Kinasen KIN10 (SnRK1.1) und KIN11 (SnRK1.2) gehören zur SnRK1 Untergruppe der SnRK (Snf1 RELATED KINASES) Genfamilie. Diese Genfamilie besteht in *Arabidopsis* aus 3 Untergruppen (SnRK1, SnRK2 und SnRK3), von denen die SnRK1 Protein Kinasen das pflanzliche Ortholog zu Snf1 (Sucrose non-fermenting1) aus Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) und den AMPKs (AMP-ACTIVATED PROTEINE KINASES) aus Säugetieren sind (Abb. 2.1). Die beiden anderen Untergruppen SnRK2 und SnRK3 kommen dagegen nur in Pflanzen vor und spielen z.B. eine Rolle in der ABA-Antwort (zur Übersicht: Halford und Hey, 2009).

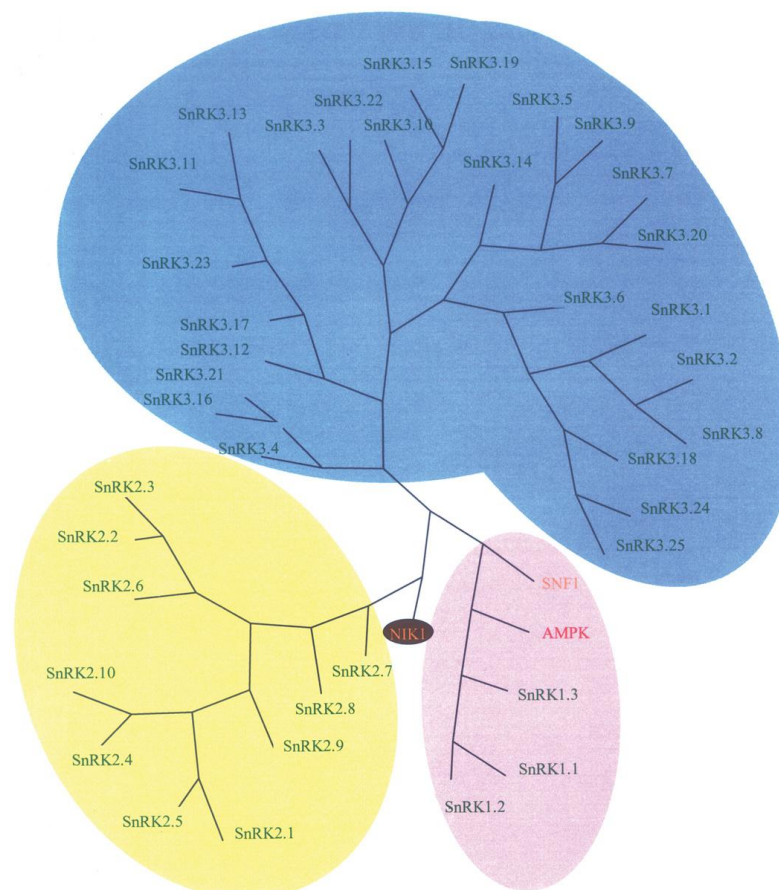


Abb. 2.1: Stammbaum der Mitglieder der SnRK Familie aus *Arabidopsis* (Halford und Hay, 2009) Gezeigt sind die Untergruppen SnRK1, SnRK2 und SnRK3 aus *Arabidopsis* sowie Snf1 (*Saccharomyces cerevisiae*) und AMPK (*Homo sapiens*).

Aufbau, Struktur und Funktion von SnRK1, Snf1 und AMPKs sind in Pflanzen, Hefe und Säugetieren stark konserviert. Experimente konnten zeigen, dass SnRK1 aus *Arabidopsis* von einer Protein Kinase aktiviert werden kann, die im tierischen System für die AMPK Aktivierung zuständig ist (Mackintosh et al., 1992). Für Regulatoren der SnRK1 konnte dagegen gezeigt werden, dass sie auch Snf1 aus Hefe aktivieren (Hey et al., 2007).

SnRK1/Snf1/AMPK sind heterotrimere Enzyme, die aus drei Untereinheiten bestehen (Abb. 2.2). Die α -Untereinheit ist dabei die katalytisch aktive Kinase, während die beiden anderen Untereinheiten (β und γ) eine regulatorische Funktion besitzen (Amodeo et al., 2007). In Säugetieren konnte gezeigt werden, dass die Bildung des Heterotrimeren notwendig für die AMPK Aktivität ist (Woods et al., 1996). Auch in Hefe führt eine Deletion der γ -Untereinheit (Snf4) oder aller drei β -Untereinheiten (Sip1, Sip2, Gal83) zu einer Inaktivierung der Snf1 Aktivität *in vivo* (Carlson et al., 1981; Schmidt und McCartney, 2000) und verdeutlicht damit die Bedeutung der einzelnen Komponenten für die Funktion des Komplexes.

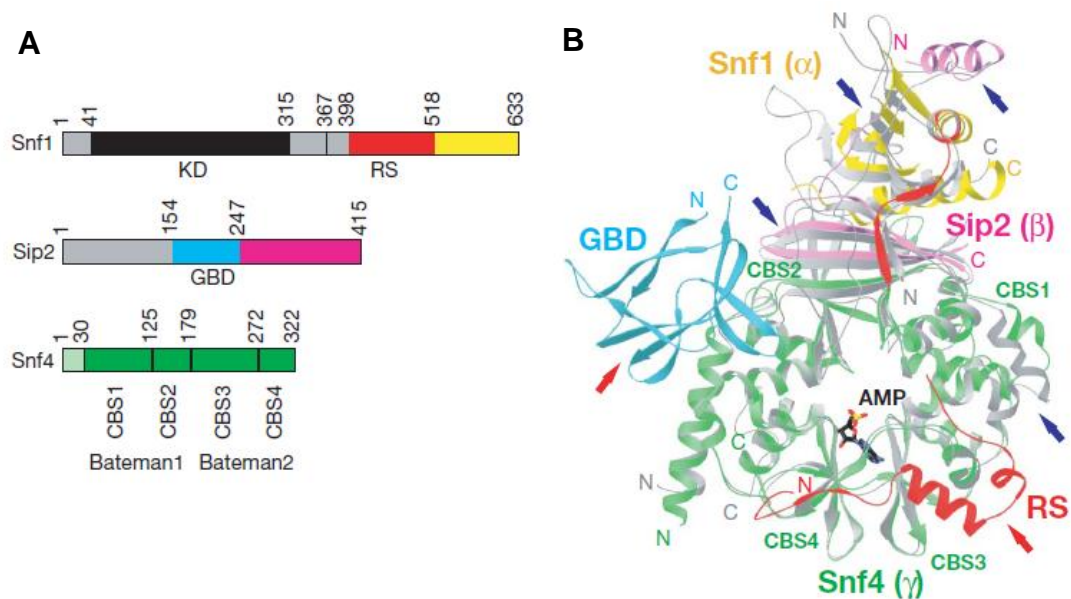


Abb. 2.2: Struktur des heterotrimeren Komplexes von Snf1 aus *Saccharomyces cerevisiae* (Amodeo et al., 2007)

A: Die Domänen der Snf1 Untereinheiten. KD = Proteinkinase Domäne; RS = regulatorische Sequenz; GBD = Glykogen-Bindedomäne; CBS = Cystathionin- β -Synthase (auch Bateman Domäne genannt) **B:** Schema der Struktur des heterotrimeren Snf1 Komplexes

Snf4 aktiviert in Hefe die Snf1 Kinase und ist notwendig für die maximale Kinase Aktivität (Celenza und Carlson, 1989; Woods et al., 1994). Die beiden Proteine interagieren aber nur in Abwesenheit von Glukose. Die drei verschiedenen β -Untereinheiten spielen eine wichtige Rolle in der Erkennung der zu phosphorylierenden Substrate und der Lokalisierung des Kinase-Komplexes (Vincent et al., 2001; Warden et al., 2001). Sie besitzen eine C-terminale ASC (Association with Snf1 Complex)-Domäne, welche eine Snf1 unabhängige Interaktion mit Snf4 erlaubt (Jiang und Carlson, 1997). Diese Domäne könnte auch für die Interaktion der Kinase mit dem Zielprotein verantwortlich sein (Vincent und Carlson, 1999). Die β -Untereinheit besitzt außerdem eine sogenannte KIS-Region (Kinase Interacting Sequence), welche die Interaktion von β -Untereinheit und Snf4 erlaubt. Sie überlappt mit einer weiteren konservierten Sequenz, der GBD (Glykogen-Bindedomäne), deren Funktion noch nicht bekannt ist (Hudson et al., 2003).

Homologe β - und γ -Untereinheiten mit möglicherweise ähnlichen Funktionen existieren auch in *Arabidopsis* (Li et al., 2009). Zusätzlich haben sich in Pflanzen die Untereinheiten AKIN β 3 und AKIN β γ entwickelt. AKIN β 3-Typ Proteinen fehlt die gesamte GBD sowie die N-terminale Region. Dennoch können diese Proteine eine Dreifachmutante der β -Untereinheiten in Hefe komplementieren, was zeigt, dass die grundlegende Funktion konserviert ist (Gissot et al., 2004). AKIN β γ Untereinheiten könnten durch eine Fusion eines γ -Typ Proteins mit einer KIS-verwandten Sequenz entstanden sein (Lumbreras et al., 2001). Im Gegensatz zu AKIN γ kann AKIN γ β die *snf4* Mutante in Hefe komplementieren (Bouly et al., 1999).

Die Funktion der Proteine SnRK1/Snf1/AMPK ist stark konserviert. Alle drei sind zentrale Regulatoren des Kohlenstoffmetabolismus in ihrem jeweiligen System und werden für die Aufrechterhaltung des Energiegleichgewichts benötigt (zur Übersicht: Halford und Hey, 2009; Polge und Thomas, 2007).

Der Snf1 Komplex in Hefe wird durch Glukoseverarmung aktiviert. Unter diesen Bedingungen phosphoryliert Snf1 transkriptionelle Aktivatoren wie Cat8, Sip4 und Repressoren wie Mig1, die zu einer Umprogrammierung des Metabolismus führen, und so das Energiegleichgewicht aufrecht erhalten (zur Übersicht: Polge und Thomas, 2007; Halford und Hey, 2009; Schüller, 2003). Auch die Aktivität der RNA-Polymerase II

(Kuchin et al., 2000) und die Chromatin Struktur (Shirra et al., 2005; Lo et al., 2005; Lo et al., 2001; Liu et al., 2005) wird durch Snf1 modifiziert. Dies führt zu einer Snf1 abhängigen Expression von bis zu einem Viertel der 2160 Hefe-Gene (De Risi et al., 1997), viele davon aus dem Kohlenhydratmetabolismus.

Erst vor kurzem wurden auch die beiden SnRK1 Kinasen KIN10 und KIN11 aus *Arabidopsis* als zentrale Regulatoren eines Netzwerkes aus Transkriptionsfaktoren beschrieben, welches die Genexpression unter Energiemangelbedingungen beeinflusst (Baena-Gonzalez et al., 2007; Baena-Gonzalez und Sheen, 2008). Die Expression von Genen der Protein- und Aminosäurebiosynthese wird reprimiert, Gene die zur weiteren Kohlenstoffassimilation beitragen, oder für den Abbau von alternativen Kohlenstoffquellen sorgen, werden dagegen aktiviert (Baena-Gonzalez et al., 2007; Abb. 2.3).

SnRK1 Kinasen kontrollieren den pflanzlichen Metabolismus aber nicht nur als Regulatoren eines Netzwerkes von Transkriptionsfaktoren, sondern phosphorylieren auch direkt wichtige Enzyme des Kohlenstoff- und Stickstoffhaushalts. So werden 3-HYDROXY-3-METHYLGLUTARYL-CoA-REDUKTASE (HMG-CoAR), NITRAT-REDUKTASE (NR) und SACCHAROSE PHOSPHAT SYNTHASE (SPS) *in vitro* durch SnRK1 phosphoryliert und inaktiviert wodurch anabole Prozesse wie die Saccharose und Isoprenoid Biosynthese sowie die Stickstoffassimilation gehemmt werden (Abb. 2.3; Hardie et al., 1998; Sugden et al., 1999a; Sugden et al., 1999b; Polge und Thomas, 2007).

Schon kleinste Schwankungen im Kohlenstoffhaushalt reichen aus, um die KIN10 und KIN11 abhängige Genexpression zu modulieren (Usadel et al., 2008). Zucker inhibieren dabei die SnRK1 Aktivität (Toroser et al., 2000). Um auch auf kleinste Änderungen im Energiestatus der Pflanze reagieren zu können, sollte die Aktivität der Kinasen regulierbar sein. Dies kann z.B. durch eine Phosphorylierung der SnRK1 geschehen. Ein konserviertes Threonin der SnRK1 kann in *Arabidopsis* durch die zwei Protein Kinasen SnAK1 und SnAK2 (SnRK1-ACTIVATING KINASE) phosphoryliert werden. Diese beiden Protein Kinasen können auch einen Hefe-Stamm komplementieren, der keinerlei Kinase Aktivität oberhalb von Snf1 mehr zeigt (Hey et al., 2007). Auch andere Proteine, wie die Phosphatase PTPKIS1 (Fordham-Skelton et al., 2002) aus *Arabidopsis*, können mit SnRK1 interagieren.

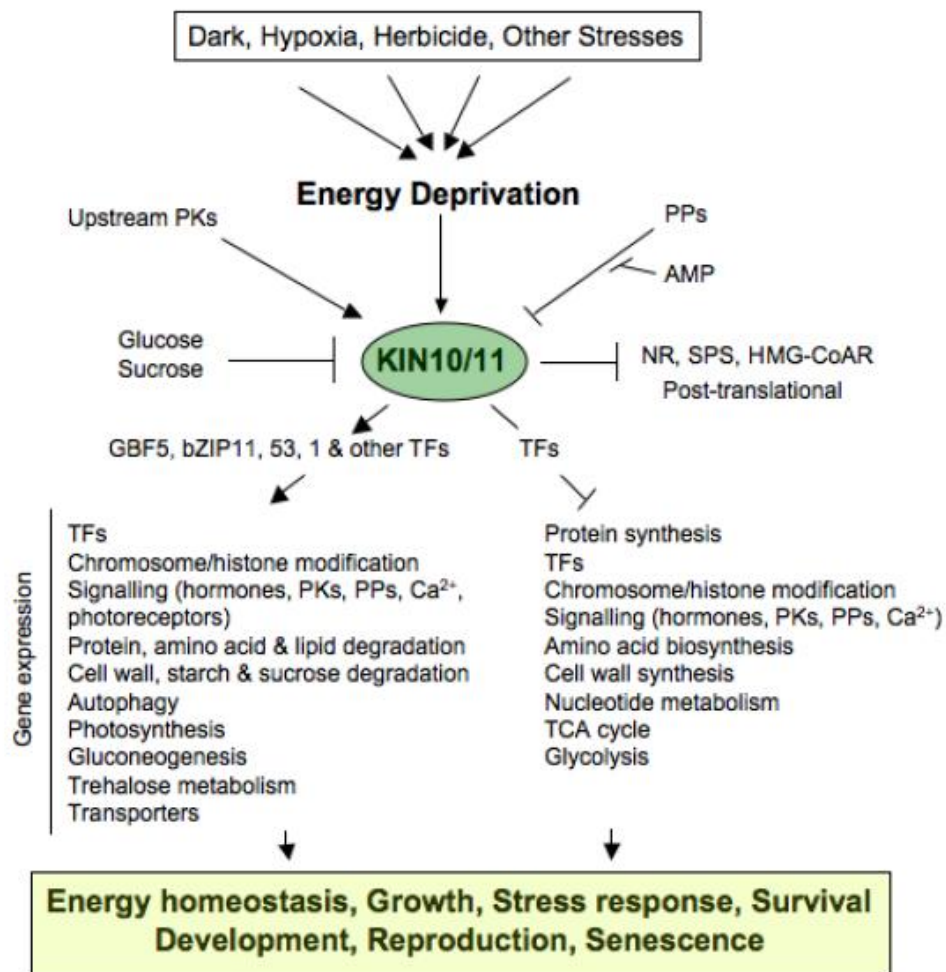


Abb. 2.3: Eine Übersicht über die Rolle der Protein Kinasen KIN10 und KIN11 in der Energieverarmung (Baena-Gonzales et al., 2007)

Dunkelheit und andere Stressbedingungen führen zu einem Energiemangel, der die beiden Kinasen KIN10 und KIN11 aktiviert. Auch eine Reihe anderer Komponenten wie Protein Kinasen (PK) und Phosphatasen (PP) sowie Zucker tragen zur Regulation der beiden Kinasen bei. Diese aktivieren ihrerseits eine Reihe von Transkriptionsfaktoren (TF), die zur Anpassung der Genexpression an diese Bedingungen führen, und phosphorylieren auch direkt wichtige Enzyme des Kohlenstoff- und Stickstoffhaushaltes (NR, SPS, HMG-CoAR), die so inaktiviert werden.

Zumindest ein Teil der durch KIN10 und KIN11 veränderten Genexpression unter Energiemangelbedingungen wird über eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren (TF), die zur Gruppe der bZIP (basische Leucizipper) Transkriptionsfaktoren zählen, vermittelt (Abb. 2.3; Baena-Gonzalez et al., 2007; Hanson et al., 2008).

2.5 Pflanzliche bZIP Transkriptionsfaktoren

bZIP Transkriptionsfaktoren wurden in allen bisher untersuchten eukaryotischen Organismen gefunden. In Pflanzen regulieren sie viele Prozesse wie z.B. die Photomorphogenese und die Entwicklung von Blüten und Samen (Jacoby et al., 2002). Auch an einer Vielzahl von biotischen und abiotischen Stressantworten sowie an der im letzten Kapitel beschriebenen Aufrechterhaltung des Energiegleichgewichts unter Energiemangelbedingungen sind sie beteiligt (Weltmeier et al., 2006; Kaminaka et al., 2006; Pontier et al., 2001; Baena-Gonzales et al., 2007).

Im Genom von *Arabidopsis thaliana* wurden von Jakoby et al. (2002) 75 putative bZIP-Proteine identifiziert und mit AtbZIP1 bis AtbZIP75 benannt. Anhand von Sequenzhomologien der basischen DNA-Bindedomänen und zusätzlicher konservierter Motive wurden diese 75 Proteine mit Hilfe des MEME Analyse-Programms (<http://meme.sdsc.edu/meme/website/meme.html>) in insgesamt 10 Gruppen unterteilt (Abb. 2.5). Allgemein werden bZIP Faktoren durch ihre basische DNA-Bindedomäne und einen benachbarten Leucizipper definiert (Abb. 2.4).



Abb. 2.4: *Dreidimensionale Struktur der an die DNA gebundenen bZIP-Domäne des Transkriptionsfaktors GCN4 aus Hefe (Jakoby et al., 2002)*

Über die Leucizipper-Domäne (hydrophobe Aminosäuren in rot dargestellt) wird die Dimerisierung zweier bZIP-TF vermittelt. Die α -Helices bilden dabei eine doppelt gewundene Struktur. Die Bindung an die DNA erfolgt über die basische DNA-Bindedomäne.

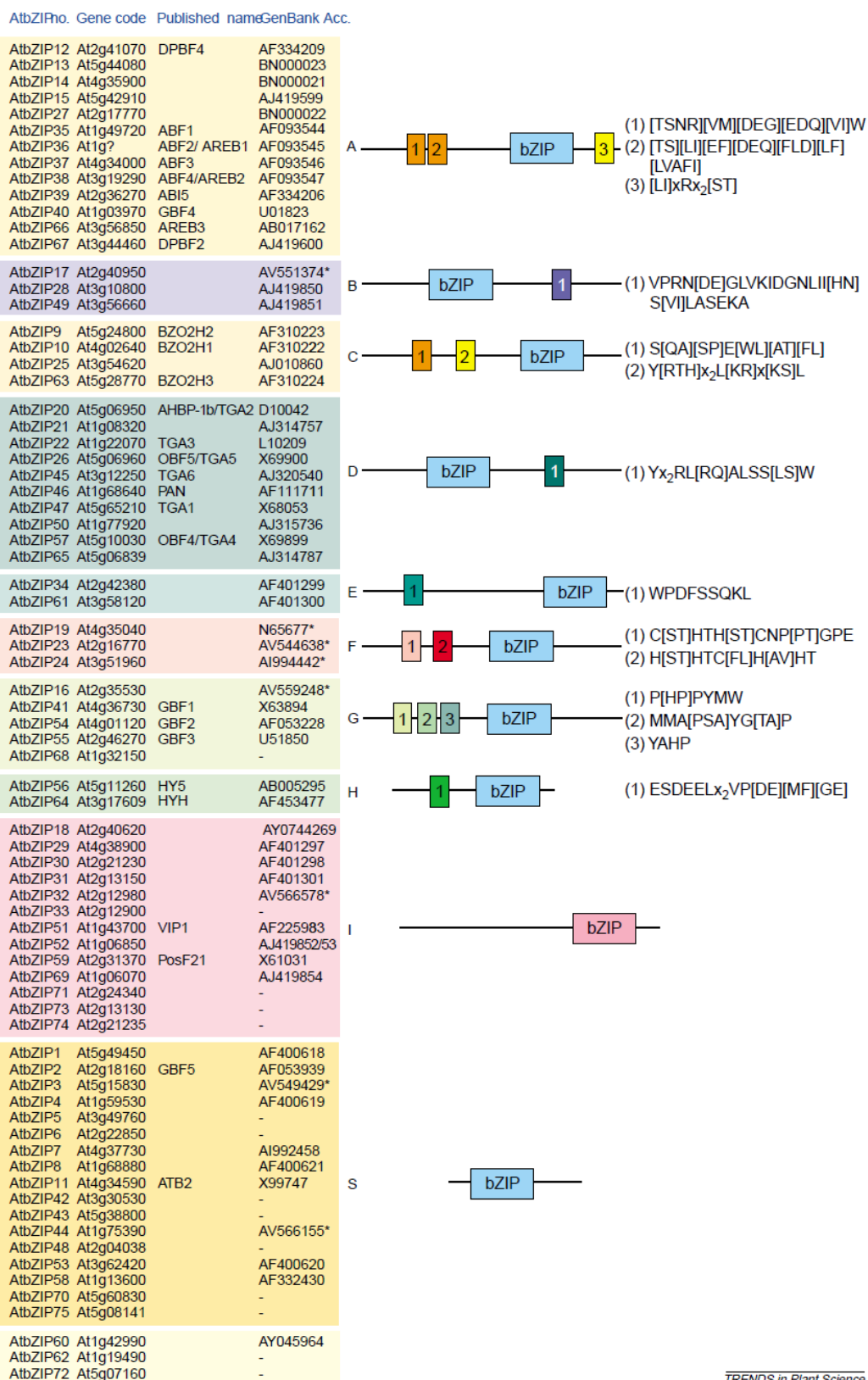


Abb. 2.5: Die 10 Gruppen der AtbZIP Transkriptionsfaktoren (Jakoby et al., 2002)

Dieser enthält in heptameren Wiederholungen Leucin oder eine andere hydrophobe Aminosäure wie Phenylalanin, Isoleucin, Valin oder Methionin. Durch die α -helikale Struktur des Proteins bilden diese hydrophoben Aminosäuren auf einer Seite einen hydrophoben Bereich, der als Kontaktfläche zu anderen bZIP Proteinen dient und durch hydrophobe Wechselwirkung eine Homo- oder Heterodimerisierung zwischen ihnen ermöglicht (Landschulz et al., 1988; O'Shea et al., 1989; Vinson et al., 2002).

Da die hydrophobe Aminosäuren leicht zueinander versetzt sind, winden sich die beiden Alpha-Helices zu einer linksgängigen Super-Helix (engl. Coiled-Coil; Baxevanis und Vinson, 1993; Lupas, 1996). An der DNA-Binderegion endet die Verwindung und bildet eine Gabel. Die Superhelixarme stehen etwas auseinander, sodass die hier häufig anzutreffenden positiv geladenen Aminosäuren Arginin und Lysin an das negativ geladene Phosphat-Rückgrat der DNA binden. Das Dimer richtet sich dabei so aus, dass zu beiden Seiten der DNA jeweils eine Helix mit der basischen Domäne in die große Furche reicht. Die Bindung an die DNA erfolgt fast immer als Dimer (Landschultz et al., 1988), kann bei einigen bZIP Proteinen aber auch als Monomer erfolgen (Metallo und Schepartz, 1997).

Die Bindung der bZIP Transkriptionsfaktoren erfolgt meist an regulatorische *cis*-Elemente mit einer ACGT-Konsensussequenz (Schindler et al., 1992; Siberil et al., 2001). Einige bZIP-Faktoren erkennen aber auch von diesem Motiv abweichende Sequenzen wie z. B. das ACTCAT Kernmotiv aus dem Promotor der *PROLIDIN-DEHYDROGENASE* (*ProDH*; Satoh et al., 2004; de Pater et al., 1994). Für eine effiziente DNA-Bindung sind zusätzlich die flankierenden Sequenzen des Kernmotivs von Bedeutung (Foster et al., 1994; Izawa et al., 1993). Meist wird dabei eine palindromische Sequenz wie z. B. die A-Box (TACGTA), die C-Box (GACGTC) oder die G-Box (CACGTG) als Bindemotiv der bZIP Transkriptionsfaktoren bevorzugt (Izawa et al., 1993). Es gibt jedoch auch Beispiele für die Bindung an nicht palindromische Motive (Choi et al., 2000; Fukazawa et al., 2000).

Für die Spezifität der DNA-Bindung ist nicht nur die basische DNA-Binde-Domäne des Transkriptionsfaktors entscheidend, auch ein kurzer Bereich von circa fünf Aminosäuren zwischen basischer Domäne und Leucin-Zipper kann eine DNA-Bindenspezifität vermitteln (Niu und Gultinan, 1994). Die Affinität zu verschiedenen *cis*-Elementen sowie die Aktivität, Stabilität und Lokalisation der

Transkriptionsfaktoren kann auch abhängig sein von zusätzlichen posttranslationalen Modifikationen der bZIP Faktoren. Die Fähigkeit mit sich selbst oder mit verschiedenen anderen bZIPs zu dimerisieren ist dabei nur eine Möglichkeit der Regulation. Eine andere Möglichkeit ist die Interaktion mit anderen Proteinen wie z.B. die der TGA (TGACG MOTIF-BINDING) Faktoren der Gruppe D mit NPR1 (NONEXPRESSER OF PR GENES 1), oder auch eine Phosphorylierung der bZIPs, wie sie z.B. bei den Gruppe A Faktoren TRAB1 und OREB1 (ABA-RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTORS) aus Reis durch eine SnRK2 Kinase zu beobachten ist (zur Übersicht: Schütze et al., 2008). Auch die Gruppe A bZIP Transkriptionsfaktoren aus *Arabidopsis*, zu denen ABI5 (ABA INSENSITIVE5) zählt, ändern während der ABA Antwort ihren Phosphorylierungsstatus (Chae et al., 2007; Kagaya et al., 2002; Kobayashi et al., 2005).

Es wird postuliert, dass ein Teil der durch die beiden SnRK Kinasen KIN10 und KIN11 veränderten Genexpression unter Energiemangelbedingungen durch die Gruppe S1 der bZIP Transkriptionsfaktoren vermittelt wird (Baena-Gonzalez et al., 2007; Hanson et al., 2008). Ob diese allerdings direkt durch die Kinasen phosphoryliert werden ist bisher nicht bekannt. In der Studie von Baena-Gonzalez et al., (2007) wurden transiente Assays in Protoplasten durchgeführt, in denen verschiedene Mitglieder der bZIP Transkriptionsfaktoren mit einem ProASN1:LUC-Reporterkonstrukt co-transformiert wurden. Dies führte vor allem bei Mitgliedern der Gruppe S1 wie AtbZIP2, AtbZIP11 und AtbZIP53, zu einem deutlicher Anstieg der Luciferase (LUC)-Aktivität. Die zusätzliche Expression von KIN10 zeigt einen synergistischen Effekt und führte zu einer verstärkten Aktivität des ProASN1:LUC Konstrukts, nicht nur bei AtbZIP2, 11 und 53, sondern auch bei AtbZIP1 und dem Gruppe C Faktor AtbZIP63 (Baena-Gonzalez et al., 2007). Die Überexpression der Gruppe S1 AtbZIP Transkriptionsfaktoren verstärkt also zumindest im artifiziellen Protoplastensystem die KIN10/KIN11 vermittelte Expression der *ASN1*, die den zentralen Schritt der Biosynthese von Asparagin katalysiert. Für AtbZIP11 konnte in einer anderen Studie ebenfalls gezeigt werden, dass es die Transkription der *ASN1* aktiviert (Hanson et al., 2008). Die Kinasen KIN10 und KIN11 aktivieren also möglicherweise unter Energiemangel verschiedene Gruppe S1 und C bZIP Transkriptionsfaktoren, die dann

zu einer veränderten Genexpression und damit zur Anpassung des pflanzlichen Metabolismus an Energiemangel beitragen.

2.6 Die Bedeutung der Gruppe S1 und C AtbZIP Transkriptionsfaktoren für die Anpassung an Energiemangelbedingungen

Die Gruppe S (small) ist die größte Gruppe der bZIP Transkriptionsfaktoren in *Arabidopsis thaliana*. Sie umfasst 17 kleine Transkriptionsfaktoren mit einer Masse von 15 bis 20 kDa, die hauptsächlich aus einer zentralen basischen DNA-Bindedomäne und einem langen Leucinzipper mit acht heptameren Wiederholungen bestehen (Jakoby et al., 2002). Daneben gibt es nur noch kurze N- und C-terminale Bereiche. Introns sind in den Genen dieser Gruppe nicht zu finden.

Die Mitglieder der Gruppe S werden in drei Untergruppen unterteilt. Die Gruppe S1 besteht aus den fünf Transkriptionsfaktoren AtbZIP1, 2, 11, 44 und 53. Sie verfügen alle über einen ungewöhnlich langen 5'-untranslatierten Bereich (5'-UTR) mit offenen Leserahmen (uORFs), die eine posttranskriptionale Repression der fünf AtbZIP Transkriptionsfaktoren durch Saccharose vermitteln (Rook et al., 1998a; Wiese et al., 2004, Weltmeier et al., 2009). Dieser Mechanismus wird auch als SIRT (Sucrose induced repression of translation) Mechanismus bezeichnet. Er konnte gezeigt werden, indem ein etwa 500 bp großer Bereich um die uORFs des 5'UTR mit einem GUS-Gen fusioniert und unter Kontrolle eines konstitutiven UBQ10 Promotors expremiert wurde. Behandlung mit Saccharose führte dabei zu einer stark reduzierten GUS-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle (Weltmeier et al., 2009). Die restlichen AtbZIP Transkriptionsfaktoren der Gruppe S besitzen diese uORFs nicht. Auch bezüglich ihrer Funktion in der Pflanze ist bisher wenig bekannt. Aufgrund von Sequenzhomologien werden sie in die Untergruppen S2 und S3 eingeteilt.

Im Gegensatz zur Gruppe S der AtbZIP Transkriptionsfaktoren besteht die Gruppe C nur aus den vier Proteinen AtbZIP9, 10, 25 und 63. Sie teilen sich mit der Gruppe S das Merkmal des langen Leucinzippers mit acht heptamere Wiederholungen, haben mit 30 bis 40 kDa aber eine etwas höhere Masse (Jakoby et al., 2002). Auf genomischer Ebene

zeigen sie im Gegensatz zur Gruppe S eine konservierte Intron-Exon-Struktur (Heinekamp et al., 2002).

Von den Transkriptionsfaktoren der Gruppen S1 und C ist bekannt, dass sie spezifisch Heterodimere formen. Dies konnte bereits für homologe Proteine aus Petersilie (*Petroselinum crispum*; Rugner et al., 2001) und Tabak (*Nicotiana tabacum*; Strathmann et al., 2001) gezeigt werden. In Hefe wurde auch für die *Arabidopsis* bZIP Transkriptionsfaktoren der Gruppe S1 eine starke Protein-Protein Interaktion mit den Faktoren der Gruppe C gefunden (Ehlert et al., 2006), die mit Hilfe von Protoplasten-Two-Hybrid- (P2H; Ehlert et al., 2006; Abb. 2.6) und BIFC- (Bimolecular Fluorescence) Analysen (Weltmeier et al., 2006; Kang et al., 2010) in *Arabidopsis* bestätigt wurde. Innerhalb der einzelnen Gruppen fanden sich dagegen nur schwache Interaktionen.

Weitere Analysen in Protoplasten zeigten, dass das Aktivierungspotenzial der Gruppe S1 und C bZIP Faktoren relativ gering ist, wenn sie allein expremiert werden. Nur AtbZIP2, 11 und 44 zeigen auch ohne Dimerisierungspartner eine starke Aktivierung.

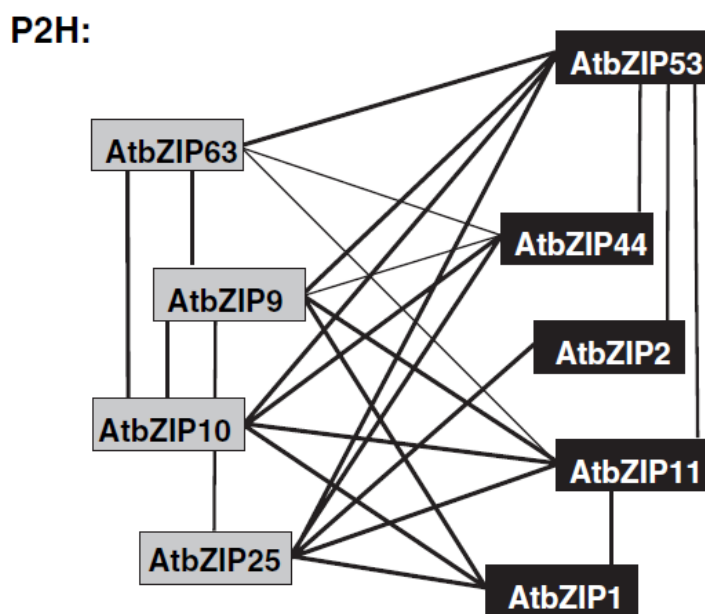


Abb. 2.6: Heterodimerisierung der Gruppe C und S1 AtbZIP Transkriptionsfaktoren in *Arabidopsis*-Protoplasten-Assays
Schwache und starke Interaktionen werden durch dünne bzw. dicke Linien dargestellt (nach Ehlert et al., 2006).

Co-expremiert man zwei der bZIPs, die in der Lage sind Heterodimere zu formen, erhöht sich ihr Aktivierungspotenzial um ein Vielfaches. So können Heterodimere von AtbZIP53 mit AtbZIP10 oder mit AtbZIP25 z.B. an das ACTCAT-Element des *ProDH* Promotors binden und dieses sehr viel stärker aktivieren, als es einzelne der bZIP Faktoren tun würden (Weltmeier et al., 2006). Dieser sogenannte HIT-Mechanismus (Heterodimer Induced Transactivation) wurde auch für die Aktivierung von Samenspeicherproteinen beschrieben (Alonso et al., 2009). Eine mögliche Erklärung ist, dass beide bZIP Proteine notwendig sind, um das Epitop einer Aktivierungsdomäne zu bilden. Eine andere mögliche Erklärung ist, dass durch die Heterodimerisierung eine Interaktionsfläche gebildet wird, welche die Rekrutierung eines Koaktivators ermöglicht (Noble et al., 2006).

Durch die Kombination verschiedener Transkriptionsfaktoren der Gruppen S1 und C können, abhängig von der Verfügbarkeit der einzelnen Proteine in verschiedenen Geweben und Umweltbedingungen, Dimere mit unterschiedlichstem DNA-Bindungsverhalten und Aktivierungseigenschaften entstehen, die eine Integration der Umweltsignale und damit eine gezielte Anpassung der Genexpression ermöglichen. Durch zusätzliche posttranskriptionale und posttranslationale Modifikationen der bZIPs, wie z.B. der Zuckerrepression der Gruppe S1, Interaktion mit anderen Proteinen oder mögliche Phosphorylierungen kann die Stabilität, Lokalisation und Aktivität der einzelnen bZIP Transkriptionsfaktoren weiter beeinflusst, und eine gezielte Anpassung an unterschiedliche Stressbedingungen erreicht werden (Naar et al., 2001).

Unter Energiemangelbedingungen wäre die Phosphorylierung der bZIPs durch die Kinasen KIN10 und KIN11 eine Möglichkeit ihre Aktivität posttranslational zu beeinflussen. Ob eine direkte Interaktion zwischen ihnen und den bZIP Faktoren besteht ist bisher allerdings noch unklar. Auch welche bZIP Transkriptionsfaktoren unter diesen Bedingungen tatsächlich eine Rolle für die Anpassung der Genexpression spielen ist noch nicht vollständig geklärt. Zwar finden Baena-Gonzales et al. (2007), dass Mitglieder der Gruppe S1 in der Lage sind im artifiziellen Protoplastensystem die KIN10 vermittelte Aktivität eines ProASN1:LUC Konstrukts zu verstärken, ob genau diese Faktoren aber auch in der Pflanze eine Bedeutungen für die Anpassung des Metabolismus haben, ist bisher nicht bekannt. So zeigten bereits vor dieser Veröffentlichung Versuche in unserem Labor, dass nicht alle Gruppe S1 Faktoren auch

durch Energiemangelbedingungen aktiviert werden. Dafür finden sich in Northern Analyses auch bZIP Transkriptionsfaktoren der Gruppe C, die während der Dunkelheit verstärkt expremiert werden (Weltmeier, 2005; Dietrich, 2006). Die Induktion von Genen des Primärmetabolismus in Transkriptomanalysen verschiedener bZIP Überexpressionspflanzen der Gruppen S1 und C im Vergleich zum Wildtyp (Weltmeier, 2005) deutet aber bereits auf eine Beteiligung der Gruppe S1 und C bZIPs an der Reprogrammierung des pflanzlichen Metabolismus unter Energiemangelbedingungen hin.

2.7 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Energiemangelbedingungen wie sie während langanhaltender Dunkelheit auftreten, führen zu einer massiven Änderung der Genexpression in der Pflanze. Dies wird durch Transkriptionsfaktoren vermittelt. Die Expression einiger bZIP Faktoren wird durch Energiemangel unter diesen Bedingungen aktiviert (Weltmeier, 2005). Ein erstes Ziel dieser Arbeit besteht daher darin, herauszufinden ob und wenn ja welche der 75 bZIP Transkriptionsfaktoren in *Arabidopsis* eine Rolle in der Anpassung an Energiemangelbedingungen spielen.

Erste Hinweise auf eine Beteiligung der Gruppe S1 bZIP Transkriptionsfaktoren an der KIN10/KIN11 vermittelten dunkelinduzierten Aktivierung der *ASN1* lieferten Baena-Gonzales et al. (2007). Bei den gezeigten Daten handelt es sich allerdings ausschließlich um transiente Überexpressionen der bZIP Faktoren und Kinasen im artifiziellen Protoplastensystem. Studien in transgenen Pflanzen sowie ein „loss-of-function“ Ansatz fehlen dagegen völlig. Dies soll im Verlauf dieser Arbeit nachgeholt werden. Überexpressionspflanzen der relevanten bZIP Transkriptionsfaktoren sollen dabei sowohl phänotypisch als auch auf eine veränderte Genexpression und daraus resultierende veränderte Metabolitgehalte hin untersucht werden. Transkriptomanalysen dieser Pflanzen (Weltmeier, 2005) zeigten, dass sich putative Zielgene sowohl im Aminosäurestoffwechsel (*ASN1* und *ProDH*) als auch in anderen Bereichen des Primärmetabolismus wie z.B. dem Lipid- oder Kohlenhydratstoffwechsel finden.

Die Expression der entsprechenden Gene sowie die Metabolitgehalte sollen auch in Mutanten der relevanten bZIP Transkriptionsfaktoren getestet werden. Da bekannt ist, dass gerade die bZIP Transkriptionsfaktoren der Gruppe S1 und C heterodimerisieren und teilweise redundante Funktionen ausüben, ist es sinnvoll dabei auch multiple Mutanten zu generieren und in die Untersuchungen mit einzubeziehen.

Parallel zu den Versuchen in transgenen Pflanzen soll auch das in Baena-Gonzales et al. (2007) gezeigte Protoplastensystem für Versuche der Energieverarmung in unserem Labor etabliert werden. Dieses ermöglicht eine schnelle Analyse vieler verschiedener Transkriptionsfaktoren und kann für die Promotoranalyse der putativen Zielgene ebenso verwendet werden wie für die Identifizierung möglicher Signalkomponenten die zur Aktivierung der bZIP Faktoren beitragen.

In diesem Zusammenhang werden vor allem die beiden Kinasen KIN10 und KIN11 näher untersucht werden. Ob eine direkte Interaktion zwischen ihnen und den bZIP Faktoren besteht, ist bisher noch weitestgehend unklar. Phosphorylierungsmutanten der bZIPs in denen mögliche Phosphorylierungsmotive der SnRK1-Kinasen KIN10 und KIN11 ausgetauscht werden, könnten hier erste Hinweise auf eine Bedeutung der Kinasen für die Aktivierung der bZIP Transkriptionsfaktoren liefern.

3 Material

3.1 Organismen

3.1.1 Bakterien

Stamm	Eigenschaften	Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	recA1 relA1 thi-1 Δ lacU 169 80 (lacZ Δ M15) hsdR17 (r _k m _k +)	Hanahan, 1983
<i>Escherichia coli</i> DB3.1	F- 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	Bernard et al., 1993
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101	pMP90RK, Rif ^r , Gm ^r	Koncz und Schell, 1986

3.1.2 Pflanzen

Kultivar	Eigenschaften	Herkunft
Columbia Col-0 N1092	Wildtyp	Kultursorte
<i>atbzip1</i> (SALK_059343)	AtbZIP1 Knock Out	NASC Stock Center
<i>atbzip53</i> (SALK_069883)	AtbZIP53 Knock Down	NASC Stock Center
<i>atbzip9</i> (SALK_093416)	AtbZIP9 Knock Out	NASC Stock Center
<i>atbzip63</i> (SALK_066531)	AtbZIP63 Knock Down	NASC Stock Center
<i>bzip10</i> (SALK_106031)	AtbZIP10 Knock Out	NASC Stock Center
<i>bzip25</i> (SALK_119931)	AtbZIP25 Knock Out	NASC Stock Center
<i>atbzip1 atbzip53</i>	s.o.	Dietrich, 2006
<i>atbzip1 atbzip53 atbzip10 atbzip25</i>	s.o.	Diese Arbeit
<i>atbzip1 atbzip53 atbzip9 atbzip63</i>	s.o.	Diese Arbeit
Prom35S:AtbZIP1 L.5	AtbZIP1 Überexpression ohne HA-Tag	Weltmeier,2005
Prom35S:AtbZIP1 L.C.2	AtbZIP1 Überexpression mit HA-Tag, pAlligator2, samenspezifisches GFP	Weltmeier,2005
Prom35S:AtbZIP53 10.1	AtbZIP53 Überexpression ohne HA-Tag	Weltmeier,2005
Prom35S:AtbZIP53 (verschieden Linien, verlieren alle ihre gute Überexpression in der nächsten Generation)	AtbZIP53 Überexpression mit HA-Tag, pAlligator2, samenspezifisches GFP	Weltmeier,2005

3.2 Nukleinsäuren

3.2.1 Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pHBT GUS NCO	pUC ori, 35S Promotor, NcoI Schnittstelle, Amp ^R	Corinna Thurow (unveröffentlicht)
pROK219-NAN	pUC19-Derivat, 35S-Minimalpromotor, NAN-Reporter, nos, Amp ^R	Kirby und Kavanagh (2002)
pHBTL-ΔGFP	pHBTL-sGFP-Derivat (Sheen, unveröffentlicht); Entfernung des <i>sGFP</i> Gens durch NcoI/NotI-Verdau, Klenow ‚fill in‘ und Religation, pUC ori, Amp ^R , 35S-Promotor	Heinekamp et al. (2002)
pBT10	pUC ori, 35S-Minimalpromotor, <i>GUS</i> -Reporter, Amp ^R	Sprenger-Haussels und Weisshaar, 2000
pBT10-Asn1-GUS	pUC ori, 1630bp des Asn1 Promotors, <i>GUS</i> -Reporter, Amp ^R	Diese Arbeit
pBT10-ProDH-GUS	pUC ori, 1500bp des ProDH Promotors, <i>GUS</i> -Reporter, Amp ^R	Diese Arbeit
pBKS-LEA76-GUS	LEA76-Promotor, BamHI/NcoI Schnittstelle, <i>GUS</i> -Reporter, Amp ^R	Jesus Vincente-Carbajosa (unveröffentlicht)
pDON201	pUC ori, Km ^R , attL1, Cm ^R , ccdB, attL2	Invitrogen, 2001
pDON201-bZIPx (x=1, 2, 11, 44, 53, 9, 10, 25, 63)	pUC ori, Km ^R , attL1, bZIPx, ccdB, attL2	Weltmeier, Smeekens, Vincente-Carbajosa (unveröffentlicht)
pHBTL- HAGW	3x HA- tag, pUC ori, Amp ^R , attR1, ccdB, Cm ^R , attR2	Ehlert, 2004
pHBTL-HA-bZIPx (x=1, 2, 11, 44, 53, 9, 10, 25, 63)	3x HA- tag, pUC ori, Amp ^R , attR1, bZIPx, attR2	Ehlert, 2004
pHBTL-HA-Kin10	3x HA- tag, pUC ori, Amp ^R , attR1, KIN10, attR2	Laura Hartmann (unveröffentlicht)
pHBTL-HA-Kin11	3x HA- tag, pUC ori, Amp ^R , attR1, KIN11, attR2	Laura Hartmann (unveröffentlicht)
pHBTL-HA-bZIP1 Ala	3x HA- tag, pUC ori, Amp ^R , attR1, bZIP1Ala, attR2	Lendner, 2009
pHBTL-HA-bZIP53 Ala	3x HA- tag, pUC ori, Amp ^R , attR1, bZIP53Ala, attR2	Lendner, 2009
pHBTL-HA-bZIP63 Ala (Ser 19, 59, 261, 300)	3x HA- tag, pUC ori, Amp ^R , attR1, bZIP63Ala, attR2	Christina Chaban (unveröffentlicht)
pGEM- T	Kloniervektor, lacZα, amp ^R	Promega, 1999
pGEM-T-Lox1	pGEM-T-Vektor mit Lox1 Fragment (ca. 1100 kb)	Gärtner, 2003
pGEM-T-Lox2	pGEM-T-Vektor mit Lox2 Fragment (ca. 1200kb)	Gärtner, 2003

3.2.2 Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	Zweck	Nr. in Oligo-bank
SAG103 for	AGCTCGAGTGCTGGGATG	qPCR	890
SAG103 rev	CGGATTCACAGATCCTTCCT	qPCR	891
CAB for	TCAATCTTTTGAATTCGAGTGAGA	qPCR	1050
CAB rev	TCCACCACAAACACAAACCTAC	qPCR	1051
YLS3 for	GACATCACTAAGTGCCCTGCT	qPCR	1048
YLS3 rev	ACTGTTTCGTTTCAGACCTTTAGC	qPCR	1049
Asn1 for	TTCTTGAGCTTTCTCGCAGAT	qPCR	882
Asn1 rev	CCGTTCTGATATAAGCCACTCC	qPCR	883
ProDH for	CGCCAGTCCACGACACAATTCA	qPCR	664
ProDH rev	CGAATCAGCGTTATGTGTTGCG	qPCR	665
Asparaginase for	TTCCGATCAGCATTACGC	qPCR	904
Asparaginase rev	CAATGTCCTTTCCCGTCAAC	qPCR	905
BCAT2	QuantiTect® Primer QT00854875	qPCR	-
GDH2 qPCR for	ACAGATCCAGATGCTGATGAGA	qPCR	884
GDH2 qPCR rev	TCTGCACCCACTCGAAGTAA	qPCR	885
Real HA for	TTCTTTGGGTGGTTCTAGCC	qPCR	186
Real HA rev	ATAGTCCGGGACGTCATAGG	qPCR	187
bZIP1 for	TCAGCGTTAAACTCGTCGTAGCAA	qPCR	589
bZIP1 rev	AACGCGGGTCTTAGATCGGAGAAG	qPCR	590
bZIP53 for	TGGGGTTCGTTGCAAATGCAAACAA	qPCR	591
bZIP53 rev	CCGTGGCGTACCTCGGATCATTAT	qPCR	592
bZIP9 for	CGAAAAGGTCCAGCCGGAAACAAT	qPCR	649
bZIP9 rev	TCGACCTCATGAACCGGGATTACA	qPCR	650
bZIP10 for	TTTTTCGGCCATGCTGAATCGTTC	qPCR	647
bZIP10 rev	TTACTCCAAGCGCCAACCCGTA	qPCR	648
bZIP25 for	AGGAGGATGCTCTCAAACCGAGAA	qPCR	645
bZIP25 rev	CGGCTCTTAATTGGCCTACCTGTG	qPCR	646
bZIP63.2 for	AAAAGGGGAACCTTTCATCAAACCTCAGG	qPCR	1025
bZIP63.2 rev	CTGAGGCATATTGTGGAACATTGGGT	qPCR	1027
Ubq5 for	GACGCTTCATCTCGTCC	qPCR	874
Ubq5 rev	GTAAACGTAGGTGAGTCCA	qPCR	875
β-Amylase 1 (Bam1) for	GTTTCATCAGTGTGGTGGCAACG	qPCR	1028
Bam1 rev	ACCCACTGAGGCAGAGGAATAGTG	qPCR	1029
Bam2 for	GATTCCTCAAACGAATGCATGGTG	qPCR	1030
Bam2 rev	TCTTGTGTCCCTGGAGCCAAAC	qPCR	1031
Bam3 for	AAAGCACGGTCTCAAACCTCCAG	qPCR	1032
Bam3 rev	ACTGCAAGAGTCTCCTACGTTTCC	qPCR	1033
Bam4 for	CGGGAACAGCCGAATCTTTAGC	qPCR	1034
Bam4 rev	TGGACACCCAGAAGCATCAATTCC	qPCR	1035
Bam5 for	CCCGTTTACGTTATGCTTCC	qPCR	970
Bam5 rev	ACGTTTAAGCTGCGTTTCAAG	qPCR	971
Bam6 for	ACGAATGCATGCGAACCAAGAG	qPCR	1036

Bam6 rev	GATCTTTCCAACGGAAGCAGCTC	qPCR	1037
Bam7 for	TCCAGGTGTTGGAGAGTTTCAGTG	qPCR	1038
Bam7 rev	TGTAGGAGCCGGTGTATCTGG	qPCR	1039
Bam8 for	TGGGCAACACAATCACGGGAATC	qPCR	1040
Bam8 rev	AGGATATTTTCAGCTCACCGTCTGG	qPCR	1041
Bam9 for	CCGGTATCGGTGAGTTTCAGTG	qPCR	1042
Bam9 rev	GTGAATCCTCGTGACTTTGCTTCC	qPCR	1043
Kin10 qPCR for	TGAGTTTCAAGAGACCATGGAA	qPCR	1044
Kin10 qPCR rev	CGATGGCTAACAGGTGAAGC	qPCR	1045
Kin11 qPCR for	GCTCGTAACTTTTCCAGCAGA	qPCR	1046
Kin11 qPCR rev	TTCAGGTCTCTATGGACAACCA	qPCR	1047
Lox1 qPCR for	ACCTGCTAAACACTACACTACAGAC	qPCR	912
Lox1 qPCR rev	GTCGCTGGTGTTCATGTGGAAG	qPCR	913
Asn1Promfor	CACGTGTACGGCTCTAAAGCA	ChIP	387
Asn1Prom rev	GACCAGCTGTTCCACGTGTT	ChIP	388
ProDHProm for	CAAGTCCAGGTCCACATGTTG	ChIP	381
ProDHProm rev	CAAGGCCCTGACCATAGGA	ChIP	382
Actin7 for	CGTTTCGCTTTCCTTAGTGTTAGCT	ChIP	618
Actin7 rev	AGCGAACGGATCTAGAGACTCACCTTG	ChIP	619
Asn1 for	GTGGAATACTTGCCGTGTTAG	Northern	343
Asn1 rev	CGAAATGCTCACAGTCATCG	Northern	344
GDH2 for	GCTGCAACAAACAGAACTTCC	Northern	595
GDH2 rev	CCCTGAATCGATTTCCCGT	Northern	596
ProDH for	ATGGCAACCCGTCTTCTCCG	Northern	374
ProDH rev	TGGTCGGTCTTTGTCAGCAT	Northern	375
PepCK for	ATGGCGGAAACGGAAACGA	Northern	752
PepCK rev	TCGTACAACCTCGGCGGGAGA	Northern	753
Asp3 for	CTTCTCTTCTTCTCCGATCG	Northern	597
Asp3 rev	GTCGCTGGATCGTAGTATCGG	Northern	598
GlnS for	CATCAACCTTAACCTCTCAGACTCCA	Northern	624
GlnS rev	CTCGTAACCGCCTTCTTCCCTCATTG	Northern	625
LBa1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	T-DNA Insertion	385
Short bZIP1 cDNA #1	ATGGCAAACGCAGAGAAGACAAGTTCA	T-DNA Insertion	291
Short bZIP1 cDNA #2	TCATGTCTTAAAGGACGCCATTGGTTG	T-DNA Insertion	292
bZIP10 for	TCTTCTCCATTGACGATTTCTC	T-DNA Insertion	454
bZIP10 LP	TTGAGATGAGTTCTGGTGGTTA	T-DNA Insertion	452
bZIP10 RP	GTCCACTTGATCTTCCGAGAA	T-DNA Insertion	453
bZIP53 pGUS f	CTGCAGCTTAGGACAGCTCATCACCA	T-DNA Insertion	205
bZIP53 pGUS r	GTCGACCTCGTTGACTTTTTGACTTC	T-DNA Insertion	206
bZIP9 cDNA #1	ATGGATAATCACACAGCTAAAGA	T-DNA Insertion	267
bZIP9 cDNA #2	AGAGTCATGGCCAGATGTCTGAG	T-DNA Insertion	268

pbZIP63 f	CGTAGCTCGGTCATTGTGTCGG	T-DNA Insertion	367
cbZIP63 rev2	TCTCCGTCGTCTGCAGCGGC	T-DNA Insertion	368
bZIP25	ATGCACATCGTCTTCTCTGTCG	T-DNA Insertion	670
bZIP25	TGCCTTGTTTCTTTCTTCTCAG	T-DNA Insertion	671
Oligo dT	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	cDNA- Synthese	-
Random nonamer	NNNNNNNNN	cDNA- Synthese	-
Uni24	ACGACGTTGTAAAACGACGGCCAG	Sequenzierung	-
Rev	TTCACACAGGAAACAGCTATGAC	Sequenzierung	-
pE-HA LB	CGTCCCGGACTATGCAGATA	Sequenzierung	842
pE-HA RB	CGTATGGATAACCCCATCA	Sequenzierung	843
SeqL1	TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC	Sequenzierung	201
SeqL2	GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC	Sequenzierung	202
pBT10 for	CAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAA	Sequenzierung	910
Asn1PromXbaI for	AAAAAAAAAATCTAGACGTCTCAAGTAT TGATAAAATAATAAT	Klonierung pBT10GUS (1630bp)	-
Asn1Prom NcoI rev	AAAAAAAAAACCATGGGTTTTTTTTTTG AAGAAAGTGAAAAGATCACGAAGAA	Klonierung pBT10GUS (1630bp)	-
ProDHProm PstI for	AAAAAAAAAACTGCAGACTTGCACTAA AGACTAAACAGT	Klonierung pBT10GUS (1500bp)	-
ProDHProm NcoI rev	AAAAAAAAAACCATGGAAAATTCAAAG ATTTTGTTTTTGAAAACGAAAACAAA	Klonierung pBT10GUS (1500bp)	-

Die Schmelztemperatur der Primer wird mit Hilfe folgender Formel (Bolton und McCarthy, 1962) berechnet:

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

T_m = Schmelztemperatur,

n = Anzahl der Basen

3.2.3 Hybridisierungssonden

Sonde	Eigenschaften	Referenz
ProDH	Fragment aus PCR mit Primern ProDH for und ProDH rev auf cDNA	Weltmeier, 2005
Asn1	Fragment aus PCR mit Primern Asn1 for und Asn1 rev auf cDNA	Weltmeier, 2005
GDH2	Fragment aus PCR mit Primern GDH2 for und GDH2 rev auf cDNA	Diese Arbeit
GlnS	Fragment aus PCR mit Primern GlnS for und GlnS rev auf cDNA	Diese Arbeit
Asp3	Fragment aus PCR mit Primern Asp3 for und Asp3 rev auf cDNA	Diese Arbeit
PepCK	Fragment aus PCR mit Primern PepCK for und PepCK rev auf cDNA	Weltmeier, 2005
Lox1	Fragment (ca. 1100 bp) aus PCR mit Primern uni und rev auf Plasmid pGEM-T-Lox1	Diese Arbeit
Lox2	Fragment (ca. 1200 bp) aus PCR mit Primern uni und rev auf Plasmid pGEM-T-Lox2	Diese Arbeit

3.3 Größenstandards

3.3.1 DNA-Größenstandard

Als Fragmentlängenstandard wurden bei der Gelelektrophorese der Generuler DNA Ladder Mix von Fermentas als Größenmarker verwendet.

3.3.2 Protein-Größenstandard

Als Größenstandard bei SDS-Gelen wurde der Page Ruler-Prestained Protein Ladder von Fermentas verwendet.

3.4 Antikörper

Bezeichnung	Spezifität	Eigenschaft	Verdünnung	Hersteller
α HA IgG	HA-Epitoptag (YPYDVPDYA)	polyklonal aus Kaninchen	1 : 666	Santa Cruz
α HA IgG ChIPgrade	HA-Epitoptag (YPYDVPDYA)	polyklonal aus Kaninchen	1 μ g für 8 -10 μ g Chromatin	abcam
anti rabbit IgG	Kaninchen-Immunoglobulin	polyklonal, Peroxidase gekoppelt	1 : 10000	Amersham

3.5 Nährmedien und Zusätze

3.5.1 Bakterienmedien

DYT	16g/l Trypton 10g/l Hefeextrakt 5g/l NaCl autoklavieren
LB (Sambrook et al., 1989)	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl pH 7,4 mit NaOH autoklavieren
YEB (Sambrook et al., 1989)	10 g/l Beefextrakt 2 g/l Hefeextrakt 5 g/l Pepton 5 g/l Saccharose 2 mM MgSO ₄ pH 7,0 mit NaOH einstellen autoklavieren

3.5.2 Pflanzenmedien

2 MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962)	4,4 g/l Murashige und Skoog Medium 20 g/l Saccharose pH 5,7 mit KOH autoklavieren
-----------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------

3.5.3 Medienzusätze

3.5.3.1 Antibiotika

Substanz	Endkonzentration	Stammlösung
Ampicilin (Amp)	100 µg/ml	100 mg/ml in H ₂ O
Kanamycin (Kan)	50 µg/ml	50 mg/ml in H ₂ O
Gentamicin (Gent)	10 – 25 µg/ml	25 mg/ml in H ₂ O
Carbenicillin (Carb)	100 µg/ml	100 mg/ml in H ₂ O
Rifampicin (Rif)	100 µg/ml	20 mg/ml in Methanol

3.5.3.2 Agar

Festmedien für Bakterien enthalten zusätzlich 12 g/l Kobe-Agar, Festmedien für Pflanzen 7,4 g/l Select-Agar. Der Agar wird nach dem Einstellen des pH-Wertes aber vor dem Autoklavieren zugegeben.

3.5.3.3 Sonstige Zusätze

Substanz	Endkonzentration	Stammlösung
x-Gal	50 µl pro Platte	20 mg/ml in DMF
IPTG	50 µl pro Platte	100 mM in H ₂ O

3.6 Lösungen und Puffer

Soweit nicht anders beschrieben werden alle Lösungen und Puffer mit ultra pure H₂O angesetzt und anschließend autoklaviert (15min, 2bar, 121°C).

35% Percoll (ChIP):	35 % Percoll 0,5 M Hexylenglycol 50 mM PIPES-KOH pH7,2 10 mM MgCl ₂ 1 % Triton X-100 Mit H ₂ O auf 50ml auffüllen Vor Gebrauch 5 mM β-Mercaptoethanol dazu
Church (Northern):	7 % SDS 250 mM NaPhosphat-Puffer (pH 7,0) 1 mM EDTA
Crosslinkingpuffer (ChIP):	50mM Kaliumphosphatpuffer pH 5,8 1 % Formaldehyd
CTAB (DNA-Extraktion):	2 % CTAB 100 mM Tris HCl pH8,0 20 mM EDTA pH8,0 1,4 M NaCl Vor Gebrauch 2 % β-Mercaptoethanol dazu
DEPC-H₂O (RNA-Extraktion):	1l H ₂ O 1ml DEPC kräftig schütteln, ü.N. unterm Abzug ausdampfen autoklavieren
Elution Buffer (ChIP):	0,1 M Glycin pH 2,5 mit HCl 500 mM NaCl 0,05 % Tween20

Enzymlösung (Protos):	1,25 % Cellulase R-10 (0,625 g auf 50 ml) 0,3 % Macerozyme R-10 (0,15 g auf 50 ml) 0,4 M Mannitol (26,6 ml von 0,75 M auf 50 ml) 20 mM KCl (2 ml von 0,5 M auf 50 ml) 20 mM MES (2 ml von 0,5 M auf 50 ml) 10 mM CaCl ₂ (0,5 ml von 1 M auf 50 ml) steril filtrieren und bei 4°C lagern
Estradiol (Estradiol-Induktion):	10 mM Estradiol (0,027 g/ 10 ml) in DMSO
Extraktionspuffer (ChIP):	1 M Hexylenglycol 50 mM PIPES-KOH pH 7,2 10 mM MgCl ₂ Mit H ₂ O auf 100ml auffüllen Vor Gebrauch 5mM β-Mercaptoethanol dazu
Fällungspuffer (RNA-Extraktion):	1,2 M NaCl 0,8 M tri-Natrium-Citrat
Färbelösung für Proteine auf Nitrocellulosemembranen:	0,02 % Ponceau S 3 % Trichloressigsäure
Glycinlösung (ChIP):	50 mM Kaliumphosphatpuffer 0,3 M Glycin
Gradientenpuffer (ChIP):	0,5 M Hexylenglycol 50 mM PIPES-KOH pH7,2 10 mM MgCl ₂ 1 % Triton X-100 Mit H ₂ O auf 50 ml auffüllen Vor Gebrauch 5 mM β-Mercaptoethanol dazu
GUS-Extraktionspuffer mit β-Mercaptoethanol (Protos):	50 mM Na-Phosphatpuffer 10 mM EDTA 0,1% (v/v) Triton X100 0,1% (v/v) Sarkosyl pH einstellen auf 7,0; 7,2 oder 7,5 0,05% (v/v) β-Mercaptoethanol (frisch zugeben)
GUS-Stop-Puffer (Protos):	200 mM Na ₂ CO ₃ (21,2 g/l)
Harnstoffextraktionspuffer:	4M Harnstoff 16,6 % Glycerin (100%) 5 % β-Mercaptoethanol 5 % SDS Ein paar Krümel Bromphenolblau
Laufpuffer 1x (SDS-PAGE):	25 mM Tris 190 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS

Ladepuffer für Agarosegele (OX):	10 ml TBE 10 ml Glycerin (87 %) 0,2 % Bromphenolblau 0,2 % Orange G 0,2 % Xylencyanol
Lugol'sche Lösung (Stärkenachweis):	2 g/l I ₂ 10 g/l KI
MEN-Puffer 10x (RNA-Gel):	200 mM MOPS 50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA pH 7,0 mit NaOH
MMg (Protos):	0,4 M Mannitol (26,6 ml von 0,75 M auf 50 ml) 15 mM MgCl ₂ (1,5 ml von 0,5 M auf 50 ml) 4 mM MES (0,4 ml von 0,5 M auf 50 ml) steril filtrieren
MUG-Gebrauchslösung (Protos):	4 mM MUG (4-Methylumbelliferyl-β-D-Glucoronid) in GUS-Extraktionspuffer pH 7,5 mit β-Mercaptoethanol
MUN-Gebrauchslösung (Protos):	1 mM MUN (2'-(4-methylumbelliferyl)-α-D-N-acetyl- neuraminic acid) in GUS-Extraktionspuffer pH 7,0 mit β-Mercaptoethanol
NAN-Stop-Puffer (Protos):	330 mM Na ₂ CO ₃ (35 g/l)
PEG-Lösung (Protos):	20 g PEG 4000 14,16 ml H ₂ O 13,3 ml 0,75M Mannitol 5 ml 1M CaCl ₂ steril filtrieren
RipaF (ChIP):	50 mM Hepes/NaOH pH7,4 140 mM NaCl 1 mM EDTA 1 % Triton X-100 0,1 % DOC 0,1 % SDS
RipaF -SDS (ChIP):	50 mM Hepes/NaOH pH7,4 1 mM EDTA 1% Triton X-100 0,1% DOC
RNA-Probenpuffer (2,5x):	20 % MEN 8 % Glycerin 56,7 % Formamid 5 % Formaldehyd 0,001 % Bromphenolblau 0,1 % Ethidiumbromid 4 mM EDTA pH 7,5

Sammelgel (SDS-PAGE):	0,83 ml 30 % Acrylamid /BIS-Mix (19:1) 0,63 ml 1 M Tris/ HCL pH 6,8 0,05 ml 10 % SDS 0,05 ml 10 % APS 0,005 ml TEMED 3,4 ml H ₂ O
SonicBuffer –SDS (ChIP):	10 mM Tris/HCl pH 7,4
SonicBuffer 0,25%SDS (ChIP):	10 mM Tris/HCl pH 7,4 0,25 % SDS
SonicBuffer 0,5%SDS (ChIP):	10 mM Tris/HCl pH 7,4 0,5 % SDS
Stripp-Lösung (Northern):	0,1 % SDS
SSC 20 x (Northern):	2 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat pH 7,0 mit HCl
TAE 20 x (Northern):	0,8 M Tris 2,3 % (v/v) Essigsäure 20 mM EDTA
TBS (Western):	50 mM Tris 150 mM NaCl pH 7,6 mit HCl
TBST (Western):	TBS 0,1 % Tween20
Trenngel 12% (SDS-PAGE):	8 ml 30 % Acrylamid/ BIS-Mix (19:1) 5 ml 1,5M Tris/ HCL pH 8,8 0,2 ml 10 % SDS 0,2 ml 10 % APS 0,008 ml TEMED 6,6 ml H ₂ O
Transferpuffer (Western):	192 mM Glycin 25 mM Tris 20 % (v/v) Methanol 0,01 % (w/v) SDS
Trizolpuffer (RNA-Extraktion):	380 ml/l Phenol mit 0,1 M Citrat-Puffer gesättigt 0,8 M Guanidiniumthiocyanat 0,4 M Ammoniumthiocyanat 33,4 ml/l Na-Acetat (3 M pH 5,2 mit Essigsäure) 5 % Glycerin

W5 (Protos): 154 mM NaCl (4,5 g/ 500 ml)
 125 mM CaCl₂(2H₂O) (9,19 g/ 500 ml)
 5 mM KCl (5 ml von 0,5 M auf 500 ml)
 2 mM MES (2 ml von 0,5 M auf 500 ml)
 autoklavieren

WI (Protos): 0,5 M Mannitol (33,3 ml von 0,75 M auf 50 ml)
 4 mM MES (2 ml von 0,5 M auf 50 ml)
 20 mM KCl (0,4 ml von 0,5 M auf 50 ml)
 steril filtrieren

3.7 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	3870 ELV	Tuttnauer
Automatische Pipetten	2, 20, 200,1000	Gilson
Bioimager (Phosphoimager)	BAS-1000	Fuji
Digitalkamera	Coolpix	Nikon
Digitalkamera	C4742-98	Hamamatsu
Eismaschine	AF-20	Scotman
Gefriertruhe -80°C	C54285	New Brunswick Scientific
Geldokumentationsanlage		MWG Biotech
Gelelektrophoresekammer (Agarose)		Werkstatt der Universität Göttingen
Heizblock		Boeckel Scientific
Heizrührer	RCT basic	IKA Labortechnik
Hybridisierungssofen	Hy-St-1	Bachhofer
Hybridisierungswasserbad	Belly Dancer	Sorvall
Inkubationsschrank		WTC Binder, Memmert
Intelli-Mixer	RM-2L	ELMI
Klimaschrank		Percival Scientific
Kühlschränke		Liebherr
Kühlzentrifuge	Sorvall RC 5B Plus	DuPont
Multi-Well Plate Reader	CytoFluorII, Series4000	Perspective Biosystems
Netzgeräte	E 323	Benedikt Heinemann
Netzgeräte	EC 250-90 EC 105	Apparatus Corporation
PCR-Gerät, MiniCycler™	PTC-150	MJ Research, USA
pH-Meter	HI 9321	Hanna Instruments
Photometer	Unikon 720 LC	Kontron
Polyacrylamid-Gelkammer		AGS
RealTime PCR	Mini Opticon	BioRad
RNA-/ DNA-Calculator	GenQuant II	Pharmacia
Scanner		Epson
Schüttler	3005	GFL
Schwingmühlen	MM 301	Retsch
Semi-Dry-Blot-Apparatur		Werkstatt der Universität Bielefeld
Sequenziergerät	ABI 3100	Perkin-Elmer Corporation
Sterilbank	Microflow	Nunc

Szintillationsmessgerät		Raytest Isotopenmessgeräte
Tischzentrifuge	5414	Eppendorf
Tischzentrifuge, gekühlt	5403	Eppendorf
Ultrazentrifuge	Centrikon T-1065	Kontron
Rotoren f. Ultrazentrifuge	TFT 30.58; TFT 65.13	Kontron
Ultraschall	Labsonic M	Sartorius
UV-Transilluminator	FLX-20 M	Vilber Lourmat
Vortex	L46	Labinco BV, Niederlande
Waage, Feinwaage	SPO51, SAC62,	Scaltec Sartorius
Wasseraufbereitungsanlage	Option 4, Maxima	ELGA
Wasserbäder	1086	GFL
Zentrifuge, Ausschwingrotor	Universal 16 A	Hettich

3.8 Verbrauchsmittel

Produkt	Hersteller
Alufolie	Roth
Fließpapier	Whatman
Gläser	Weck
Glasmaterialien	Brand, Schott
Haushaltsfolie	Tip
Immobilon-P, PVDF-Transfer-Membranen	Millipore
Kunststoff-Einwegmaterial (Spitzen, Pipetten, Reaktionsgefäße, Spritzen, Petrischalen usw.)	Eppendorf, Greiner, Sarstedt
Microtiterplatten	Nunc, Roth
Nylon-Membran Hybond™-N	Amersham Life Science
Parafilm N	American National Can
Röntgenfilme	Kodak
Stahl-Netz 0,063 mm (für Protoplasten-Trafo)	Pressel

3.9 Chemikalien

Produkt	Hersteller
Agar (Bacteriological) Kobe I	Roth
Agar (für Pflanzen Anzucht) Select Agar	Invitrogen
Agarose SeaKem LE	Biozym
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Biometra
Ampicillin	AGS
Bromphenolblau-Natriumsalz	Roth
Chloroform	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
dNTPs	Roth, MBI Fermentas
EDTA 25mM (für DNase Verdau)	Fermentas
EDTA	AppliChem
Ethanol absolut	Merck

Ethidiumbromidlösung 1%	Roth
Fluorescein (Fluorescein Calibration Dye)	BioRad
Formaldehyd	Roth
Formamid	Fluka
Glycerin (87 %)	Roth
Harnstoff	Roth
IPTG	BioTech Trade
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	AppliChem
Mannitol	Roth
Milchpulver	Glücksklee
MUG (4-methylumbelliferyl β -D-glucuronide)	Sigma
MUN (2'-(4-methylumbelliferyl)- α -D-N-acetyl-neuraminic acid)	Biosynth
Murashige & Skoog-Medium	Duchefa
Natriumhypochlorid	Roth
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth
Organische Lösungsmittel (Alkohole etc.)	Merck, Roth
Pepton	Roth
Percoll	Pharmacia
Phenol	AppliChem
PIPES	Roth
Polyethylenglycol (PEG) 4000	Fluka
Ponceau rot	Sigma
Protein A Sepharose beads (für CHIP-IP)	Sigma Aldrich
Rifampicin	Duchefa
Röntgenfilm Entwickler LX24	Kodak
Röntgenfilm Fixierer AL4	Kodak
Saccharose	Roth
Salzsäure	Merck
Select Agar	GIBCO
Sephadex G-50	Pharmacia
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Silwet L77	Lehle Seeds
Syber Green	früher Cambrex, jetzt Lonza
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamidin)	Roth
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Roth
Triton X-100	Roth
Tween	Sigma
Verschiedene Salze	Roth
X-Gal	BioTech Trade
β -Mercaptoethanol	Roth

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

3.10 Radiochemikalien

Es wurde [α -³²P]-dATP mit der spezifischen Aktivität von 800 Ci/mmol verwendet.

3.11 Enzyme

Enzym	Hersteller
Advantage-Polymerase-Mix	BD Clontech
Bio-Taq-DNA-Polymerase	BioLine
Cellulase „Onozuka R-10“	Serva
DNaseI, RNase frei	Fermentas
H Minus M-MuIV Reverse Transkriptase	Fermentas
Immolase-DNA-Polymerase	BioLine
Klenow-DNA-Polymerase (exo-)	MBI Fermentas
Macerocym R-10	Sigma
Proteinase K	Roth
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas
RNase A (DNase-frei)	Sigma; Qiagen
T4 DNA-Ligase	MBI Fermentas
Taq DNA Polymerase	Haustaq, eigene Herstellung

3.12 Kits

Kit	Hersteller
BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.1	Perkin-Elmer
Enhanced Chemiluminescence Plus Kit (ECL ⁺)	Amersham
Megaprime DNA labeling system Kits	Amersham Pharmacia
NucleoBond® MaxiKit	Macherey-Nagel
Nucleospin® Extract	Macherey Nagel
Nucleospin® Plasmid	Macherey Nagel
pGEM®-T Vector Systems	Promega
StarchAssayKit	BioVision
RNeasy® Plant Mini Kit	Qiagen

4 Methoden

4.1 Bakterienanzucht, Lagerung und Transformation

4.1.1 Anzucht von *Escherichia coli*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgt entweder in LB- oder DYT-Flüssigmedium oder auf LB-Platten über Nacht bei 37°C mit einem geeigneten Antibiotikum zur Selektion (Sambrook *et al.*, 1989).

4.1.2 Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens*

Die Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens* erfolgt entweder auf YEB-Festmedium oder in YEB-Flüssigmedium (Sambrook *et al.*, 1989) im Schüttler bei 30°C, mit geeigneten Antibiotika zur Selektion.

4.1.3 Lagerung der Bakterien

Die Bakterien können auf den Platten bei 4°C mittelfristig gelagert werden. Für längere Lagerung müssen Gefrierkulturen angelegt werden.

Anlage einer Gefrierkultur:

- 750 µl einer frischen ü. N.-Kultur mit 750 µl 87% Glycerin versetzen
- kräftig vortexen
- schockgefrieren in Flüssigstickstoff
- Lagerung bei -80°C

4.1.4 Herstellung kompetenter *Escherichia coli*

Für die Herstellung kompetenter Zellen nach einer modifizierten Methode von Inoue *et al.* (1990) werden Bakterien des *E. coli*-Stammes DH5α verwendet.

- 0,8 ml einer Übernachtskultur in 40 ml LB-Medium überimpfen
- Anzucht der Kultur bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5
- Je 10 ml der Kultur in Greiner-Röhrchen überführen
- 5 Min., 6000g, 4°C zentrifugieren
- Pellet in 5 ml 50 mM CaCl₂ (4°C) resuspendieren
- 30 Minuten auf Eis inkubieren

- 5 Min., 6000g, 4°C zentrifugieren
- Zellen in 2 ml 50 mM CaCl₂ (4°C) und 0,4 ml 87% Glycerin aufnehmen
- Aliquotieren (je 200 µl) in Eppendorfgefäßen
- In flüssigem Stickstoff schockgefrieren
- Die Aufbewahrung erfolgt bis zur weiteren Verwendung bei -80°C.

4.1.5 Transformation von *Escherichia coli*

Kompetente *E. coli*-Zellen sind in der Lage, DNA aus dem Umgebungsmedium aufzunehmen. Mit Hilfe der nachfolgenden Methode werden *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA transformiert (Hanahan, 1983).

- Die kompetenten Zellen auf Eis auftauen
- Zugabe der Plasmid-DNA (200–300 ng)
- Inkubation für 30 Minuten bis mehrere Stunden auf Eis (Anheftung der DNA an die Zellen)
- Hitzeschock der Zellen für 2 Minuten bei 42°C (Aufnahme der DNA)
- Zugabe von 0,8 ml LB-Medium
- Regeneration der Zellen bei 37°C für 30 Minuten auf dem Schüttler
- Transformationsansatz auf LB-Selektionsmedium ausplattieren

4.1.6 Herstellung kompetenter *Agrobacterium tumefaciens*

Für die Herstellung kompetenter Zellen werden Agrobakterien des Stammes LBA 4404 verwendet.

- 5 ml einer Agrobakterienflüssigkultur abzentrifugieren (5 min, 5000rpm, RT)
- Dreimal durch Resuspendieren und erneutes Abzentrifugieren in sterilem Wasser waschen
- Das Pellet in 500 µl sterilem Wasser aufnehmen und in 100 µl Aliquots einfrieren

4.1.7 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Durch Erzeugen kurzer Spannungspulse wird die Membran kompetenter Bakterienzellen permeabilisiert. Dadurch wird die Aufnahme von freier DNA aus dem Medium in die Zelle ermöglicht.

- Elektroporationsküvette mit H₂O und 70% EtOH waschen
- Küvette unter der Sterilbank trocknen
- Kompetente *Agrobakterien* auf Eis auftauen
- Zugabe der zu transformierenden DNA (50-100 ng) zu den kompetenten Zellen

- Transformationsansatz in sterile Elektroporationsküvetten (0,2 mm) überführen
- Die Elektroporation erfolgt am GenePulser mit 2,5 kV, 25 μ F, 400 k Ω
- Transformationsansatz in ein Eppendorfggefäß überführt und mit 2 ml LB- oder SOC-Medium auffüllen
- Regeneration der Agrobakterien erfolgt für 2 Stunden bei 28°C
- danach den Ansatz auf YEB-Selektionsmedium mit entsprechenden Antibiotika ausplattieren

4.2 Pflanzenanzucht und Transformation

4.2.1 Anzucht von *Arabidopsis thaliana* auf Erde

Vor der Aussaat wird die Erde zweimal im Abstand von zwei Tagen für 30 Minuten bei 90°C autoklaviert, damit Pilze und Pilzsporen abgetötet werden. Die Samen werden nach dem Auslegen zwei bis vier Tage im Dunkeln bei 4°C stratifiziert, um eine gleichmäßigere und bessere Keimung zu erreichen. Die Kultivierung der Pflanzen findet in einer Klimakammer unter Langtagbedingungen (16 Stunden Licht, 8 Stunden Dunkel) statt.

4.2.2 Oberflächensterilisation und sterile Anzucht von *Arabidopsis thaliana* auf MS-Platten

Für eine sterile Anzucht der *Arabidopsis* Samen muss zuvor eine Oberflächensterilisation durchgeführt werden, um Kontaminationen auf den Platten zu vermeiden (Clough und Bent, 1998).

- Einige Samen in ein Eppendorfggefäß füllen (Schichtdicke bis höchstens 1cm)
- Becherglas mit 100 ml 12%iger Natriumhypochloritlösung in einen Exsikkator stellen
- Eppendorfggefäße in einem Kunststoffständer auf das Becherglas stellen
- ml 37% HCl zu der Hypochloritlösung gegeben und den Exsikkator schnell verschließen
- Nach 4 Stunden leichtem Vakuum den Exsikkator unter der Sterilbank öffnen
- Kurz ausdampfen lassen
- Die sterilisierten Samen auf den vorbereiteten MS-Platten verteilen
- Die Platten anschließend mit Parafilm abdichten und für zwei bis vier Tage bei 4°C stratifizieren

4.2.3 Dunkelinduzierte Seneszenz

Je 8 bis 10 Pflanzen werden pro Topf auf Erde angezogen. Nach ca. 3 Wochen werden sie aus dem normalen Klimaschrank in einen abgedunkelten Klimaschrank überführt, der dann möglichst nicht mehr geöffnet wird. Proben werden zwischen 0 und 6 Tage nach Beginn der Dunkelheit genommen, indem die Rosetten oberhalb der Erde abgeschnitten und sofort in flüssigem Stickstoff weggefroren werden. Für Timecourse-Experimente über mehrere Tage werden die Proben immer gegen 17.00 genommen. Für kurze Timecourse-Experimente werden die Proben über 2 Tage alle 4 Stunden, beginnend mit der Lichtphase morgens um 8.00 genommen.

4.2.4 „Flower-dip“ Transformation

Ein klassischer Weg zur Transformation von Pflanzen ist der Agrobakterien-vermittelte Gentransfer. *Agrobacterium tumefaciens* hat die Fähigkeit einen durch zwei Border-Sequenzen definierten Abschnitt des so genannten Ti-Plasmids in eine Pflanzenzelle zu transportieren und dort an einer zufälligen Stelle eines Pflanzen-Chromosoms einzufügen (Herrera-Estrella et al., 1992).

Das Ti-Plasmid wurde speziell für die gezielte Integration von Genen in das pflanzliche Genom modifiziert. So werden z.B. die für den Transfer notwendigen Funktionen auf zwei Plasmide aufgeteilt. Die zu übertragenden DNA-Sequenzen lassen sich mit molekularbiologischen Methoden zwischen die Border-Sequenzen inserieren. *Agrobacterium tumefaciens* ist so zu einem hervorragenden Hilfsmittel geworden, um Pflanzen gezielt zu transformieren.

Für die Agrobakterien-vermittelte Transformation von *Arabidopsis thaliana* wurde eine sehr einfache Methode entwickelt (Clough und Bent, 1998). Pflanzen, die gerade begonnen haben zu blühen, werden in Medium mit den entsprechenden Agrobakterien und einem Benetzungsmittel getaucht. Dabei scheinen sich entwickelnde Eizellen das bevorzugte Ziel produktiver Transformationen zu sein (Bent, 2000). Aus diesen Zellen entstehen hemizygote Samen. Für die Transformation werden pro Topf (6 cm Durchmesser) bis zu 20 Samen ausgesät. Gesunde und kräftige Pflanzen erhöhen die Transformationsrate. Durch das Abschneiden der ersten Blütenstände lässt sich die Bildung vieler sekundärer Blütenstände anregen, was die Ausbeute an transgenen Samen erhöhen kann.

- 25 ml Vorkultur ansetzen mit YEB + entsprechende Antibiotika (10 µl Carbenicilin, 125 µl Rifampecin, 15 µl Gentamycin und 25 µl Kanamycin), 28°C
- 400 ml YEB + entsprechende Antibiotika (160 µl Carbenicilin, 2 ml Rifampecin, 240 µl Gentamycin und 400 µl Kanamycin) am nächsten Tag mit der Vorkultur animpfen und bis zu einer OD600 von ~ 2,0 bei 28°C wachsen lassen
- Agrobakterien 10 Minuten bei 5000 rpm abzentrifugieren
- Bakterien in einer frisch angesetzten 5% igen Saccharoselösung mit 0,02% Silwet resuspendieren, Bakteriendichte auf eine OD600 von ~ 0,8 einstellen

- 500 ml Bakteriensuspension in ein Becherglas geben und Pflanzen für einige Sekunden bis zur Rosette in die Agrobakterien-Lösung tauchen
- anschließend zurück in die Klimakammer stellen und 1-2 Tage mit einer Haube abdecken

Die Pflanzen werden bis zur Samenreife (2-3 Wochen) weiterkultiviert. Die Blütenstände lässt man trocknen. Die trockenen Pflanzen werden dann vorsichtig mit den Fingern zerrieben um die Schötchen aufzubrechen, und die Samen durch sieben grob von den übrigen Pflanzenteilen getrennt. Sie können anschließend trocken gelagert werden.

4.2.5 Selektion auf Basta®-Resistenz

Die Samen werden zunächst wie gewohnt auf Erde ausgesät und kultiviert. Wenn die Pflanzen 2-4 vegetative Blätter gebildet haben werden sie mit 1 mM Basta® besprüht (etwa 1 ml/Topf). Basta® bzw. Phosphinothricin (auch Glufosinat = L-Homoalanin-4-yl-(methyl)-phosphinsäure) wirkt als Struktur analogon 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 zu einer letalen Konzentration in der Pflanze an und führt zusammen mit dem Glutaminmangel zum raschen Absterben der behandelten Pflanzen. Pflanzen, die als Resistenzmarker das bar-Gen tragen, sind unempfindlich gegenüber Phosphinothricin (White *et al.*, 1990). Nach 2-3 Tagen sind die nicht resistenten Pflanzen abgestorben. Um auszuschließen, dass nicht resistente Pflanzen überleben, werden die Pflanzen noch einmal nach 2-3 Tagen mit Basta® besprüht.

4.2.6 Selektion auf Hygromycin-Resistenz

Transgene Samen, die das Hygromycin-Resistenzgen als Selektionsmarker enthalten, werden steril auf 2MS-Medium mit geeigneten Antibiotika angezogen.

- Samen nicht zu dicht auf die Platten streuen
- Die Platten für 2-3 Tage zum Stratifizieren bei 4°C im Dunkeln lassen
- 6 Stunden bei RT im Licht (Klimakammer)
- 2 Tage bei RT in Dunkelheit (in Alufolie eingewickelt in Klimakammer, die Keimlinge mit Hygromycin-Resistenz strecken sich jetzt)
- 2-3 Tage bei Dauerlicht und RT

Hygromycin-resistente Pflanzen lassen sich leicht von den nicht resistenten unterscheiden, da sie deutlich grüner sind und sich innerhalb der 2 Tage Dunkelheit stark strecken und so die anderen Keimlinge deutlich überragen. Diese positiven Pflanzen können in Erde umgetopft und weitergezogen werden.

4.2.7 Kreuzen von *Arabidopsis thaliana* Pflanzen

Um multiple Mutanten z.B. der bZIP Transkriptionsfaktoren herzustellen werden Einzel- bzw. Doppelmutanten miteinander gekreuzt:

- Von der Mutterpflanze alle bereits bestehenden Schoten und alle Blüten bei denen schon die Blütenblätter zu sehen sind abschneiden (nur 1-2 ungeöffnete Blüten pro Pflanze bleiben)
- Von diesen die Kelch-, Blüten- und Staubblätter unter dem Binokular abpräparieren; der Fruchtknoten bleibt als einziges übrig
- Von der Vaterpflanze ein Staubblatt mit reifen Pollenkörnern abnehmen und damit den freipräparierten Fruchtknoten bestäuben
- Heranwachsende Schote enthält heterozygote Doppel-/Mehrfachmutanten
- Test der Doppel-/Mehrfachmutanten auf homozygote Pflanzen in der F2 Generation über PCR mit genspezifischen und T-DNA-spezifischen Primern

4.2.8 *Arabidopsis thaliana*-Protoplasten-Transformation

Arabidopsis Mesophyllprotoplasten sind ein sehr nützliches Werkzeug, um transiente Genexpressionsstudien durchführen zu können (Yoo et al. 2007). Auch verschiedenste Stressbedingungen wie z.B. Dunkelheit, DCMU oder Salz sowie der Einfluss verschiedener Hormone (z.B. ABA oder Auxin) auf die Genexpression unterschiedlicher Reportergene kann in diesem System einfach und schnell getestet werden.

4.2.8.1 *Arabidopsis thaliana*-Protoplasten-Gewinnung

- Von 3 bis 4 Wochen alten, auf Erde angezogenen Pflanzen ohne Blütenansätze werden Blätter entnommen und auf der Blattunterseite fein mit einem Skalpell eingeritzt
- Mit dieser Seite werden die Blätter auf 10 ml Enzymlösung (enthält Cellulase und Macerozym) in eine Petrischale gelegt, ohne dass Blasen darunter sind
- Der Zellwandverdau erfolgt über Nacht im Klimaschrank
- Vorsichtiges Schwenken führt zum Ausfall der Protoplasten in die Lösung
- Ein vorher geformtes Metallnetz (0,063 mm) wird in ein frisches Greiner eingesetzt, mit W5-Puffer benetzt und anschließend vorsichtig die Protoplastensuspension hindurch gegossen
- 2 Minuten bei 100g bei RT zentrifugieren; Beschleunigen und Abbremsen erfolgt langsam, damit die Protoplasten intakt bleiben
- Überstand mit abgeschnittener blauer Spitze entfernen
- Vorsichtig mit gekühlter W5-Lösung auf 10 ml auffüllen

- Durch leichtes Schwenken vorsichtig resuspendieren
- 1 Minute bei 100g bei RT zentrifugieren; langsam beschleunigen und abbremsen
- Überstand mit abgeschnittener blauer Spitze entfernen
- Vorsichtig mit gekühlter W5-Lösung auf 10 ml auffüllen
- Durch leichtes Schwenken vorsichtig resuspendieren
- Für 5 Stunden auf Eis stellen

4.2.8.2 *Arabidopsis thaliana*-Protoplasten-PEG-Transformation

- Überstand mit abgeschnittener blauer Spitze entfernen
- Protoplasten in MMg-Lösung durch leichtes Schwenken resuspendieren
- In 2 ml Eppendorfgefäßen wird 20 µl DNA (20 µg) vorgelegt
- Eppendorfgefäß schräg halten und 200 µl Protoplasten-Lösung mit abgeschnittener blauer Spitze hinzufügen
- Vorsichtig 3-4 mal invertieren
- 220 µl PEG-Lösung hinzufügen
- 12-14 mal vorsichtig invertieren
- 25 min bei RT inkubieren
- 800 µl W5-Lösung hinzugeben und schwenken
- 1 Minute bei 100g bei RT zentrifugieren (langsames Beschleunigen und Abbremsen)
- mit abgeschnittener blauer Spitze 1 ml des Überstands entfernen
- 1 Minute bei 100g bei RT zentrifugieren (langsamen Beschleunigen und Abbremsen)
- mit einer Insulin-Spritze den Rest vom Überstand abnehmen
- 250 µl WI-Lösung zugeben und dadurch vorsichtig die Protoplasten resuspendieren
- Inkubation über Nacht unter geeigneten Bedingungen (z.B. im Klimaschrank mit 21°C bei Dauerlicht bzw. Dauerdunkel (in Alufolie eingewickelt) oder mit 20 µM DCMU im WI-Puffer)

4.2.8.3 *Arabidopsis thaliana*-Protoplasten-Ernte

- Überstand mit Insulin-Spritze entfernen
- Protoplasten in Eppendorfgefäß in Flüssigstickstoff schockgefrieren

Mit den Ansätzen kann sofort danach weiter gearbeitet werden. Sie können aber auch für einige Tage bei -20°C gelagert werden. Je nach Ansatz würde sich jetzt ein GUS-Test oder eine Western Analyse anschließen.

4.2.8.4 Messung der β -Glucuronidase (GUS)-Aktivität

Die β -Glucuronidase (GUS) ist das Genprodukt des *GUS*-Reportergens. Das GUS-Enzym ist in der Lage β -Glucuronide in D-Glucuronsäuren und einen aglyconischen Rest zu spalten. Setzt man das künstliche Substrat 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid (4-MUG) ein, so erhält man nach der Hydrolyse das fluoreszierende Molekül Methylumbelliferon (MU). Durch die Stärke der Fluoreszenz in den Ansätzen lässt sich die umgesetzte Menge an MUG quantifizieren und die Aktivität des GUS-Enzyms bestimmen. Die Anregung des fluoreszierenden Produktes MU erfolgt bei 360nm, die Emission bei 460nm.

- Gesamtzellextrakte in 70 μ l GUS-Extraktionspuffer mit β -Mercaptoethanol aufnehmen
- Je 2 gleiche Protoplastenansätze in einem Reaktionsgefäß vereinigen (um die Varianz zwischen den einzelnen Protoplasten Transformationen zu verringern)
- 100 μ l der Protoplastensuspension in ein flaches Well der Mikrotiterplatte überführen
- 100 μ l MUG-Gebrauchslösung zugeben und mischen
- 10 min bei 37°C inkubieren
- 100 μ l des Reaktionsansatzes in ein neues Well überführen und die Reaktion mit 100 μ l GUS-Stopp-Puffer abstoppen (t_0)
- restlichen Reaktionsansatz weitere 60 min bei 37°C inkubieren
- mit 100 μ l GUS-Stopp-Puffer abstoppen (t_{60})

Die Quantifizierung der Fluoreszenz erfolgt im CytoFluor II Plate Reader. Die GUS-Aktivität wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Relative GUS-Aktivität [pmol/min]} = \frac{\Delta F / 10}{t}$$

ΔF = Differenz der Fluoreszenz $t_{60} - t_0$

10 Fluoreszenzeinheiten entsprechen 1 pmol MUG-Umsatz.

$t = 60$ min

4.2.8.5 Messung der NAN-Aktivität und NAN-Abgleich

Das *NAN*-Gen ist das Kodon-optimierte Derivat des *nanH*-Gens. *NanH* ist ein *Clostridium perfringens* Gen, welches für die sog. „kleine“ zytoplasmatische Sialidase codiert. Eine Kodonoptimierung zur Anhebung des GC-Gehalts war nötig, damit eine Expression in Pflanzen möglich ist.

Sialidasen katalysieren die Abspaltung von terminalen N-Acylneuramin-Resten von Glycoproteinen, Glycolipiden und Polysacchariden. Zu den Substraten von *NAN* gehören u.a. 2'-(4-methylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminic acid (MUN), 2-o-(p-nitrophenyl)- α -D-N-acetylneuraminic acid (pNP-N) und 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- α -

D-N-acetylneuraminic acid (X-NeuNAc) (Kirby and Kavanagh, 2002). In der Regel wird MUN als Substrat verwendet, hierbei entsteht wie bei GUS als fluoreszierendes Produkt MU.

Die Anregung erfolgt wie beim GUS-Test bei 360nm, die Emission bei 460nm. Das NAN-Reportergen kann also unter genau den gleichen Bedingungen wie *GUS* verwendet werden. Diese Eigenschaft ermöglicht den Einsatz von *NAN* als Abgleich-Reportergen für *GUS*.

- Eine geeignete Verdünnung der Protoplastensuspension mit GUS-Extraktionspuffer herstellen (z.B. 1:2 oder 1:10)
- 10 µl der verdünnten Protoplastensuspension in ein rundes Well (aufgrund des geringen Gesamtvolumens sammelt es sich so besser) einer Mikrotiterplatte überführen
- 10 µl MUN-Gebrauchslösung zugeben und mischen
- 10 min bei 37°C inkubieren
- 3,3 µl des Reaktionsansatzes in ein neues Well (flacher Boden) überführen und mit 200 µl NAN-Stopp-Puffer abstoppen (t_0)
- den restlichen Reaktionsansatz weitere 60 min bei 37°C inkubieren
- 3,3 µl des Reaktionsansatzes in ein neues Well (flacher Boden) überführen und mit 200 µl NAN-Stopp-Puffer abstoppen (t_{60})

Die Quantifizierung der Fluoreszenz erfolgt wie auch für den GUS-Test im CytoFluor II Plate Reader. Die NAN-Aktivität wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{NAN-Aktivität [pmol/min]} = \frac{\Delta F}{10 \cdot t}$$

ΔF = Differenz der Fluoreszenz $t_{60} - t_0$

10 Fluoreszenzeinheiten entsprechen 1 pmol MUN-Umsatz.

$t = 60\text{min}$

NAN-Abgleich:

Um Unterschiede in den Mengen des *GUS*-Reportergens, die während des Versuchsablaufs z.B. durch Pipettierungenauigkeiten entstehen, heraus rechnen zu können, wird die GUS-Aktivität mit der NAN-Aktivität abgeglichen.

Dazu teilt man einfach die berechneten GUS-Aktivitätswerte durch die NAN-Aktivitätswerte.

4.3 Extraktion genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*

Diese Methode ist relativ schnell und die extrahierte DNA nicht sehr sauber, aber ausreichend für eine PCR, die damit durchgeführt werden soll. Sie beruht ähnlich wie die RNA-Extraktion darauf, dass sich die DNA besser in der hydrophilen, wässrigen

Phase löst, während Chlorophyll und andere Bestandteile besser in der hydrophoben Chloroform-Phase gelöst werden.

- Einige Blätter in ein 2 ml Eppendorfgefäß füllen und in flüssigem N₂ wegfrieren
- Pflanzenmaterial aufmörsern
- 200 µl CTAB dazugeben
- Inkubation für 15 Minuten bei 65°C
- Gleiches Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) dazu und gut mischen
- 10 Minuten bei RT und 13.000g abzentrifugieren
- Obere wässrige Phase in neues Eppendorfgefäß überführen
- Gleiches Volumen Isopropanol (eiskalt) dazu geben, mischen durch invertieren
- 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- 10 Minuten bei RT und 10.000g abzentrifugieren
- Überstand vorsichtig verwerfen
- Pellet mit 300 µl 70 % Ethanol waschen
- Ethanol entfernen
- Pellet für 30 Sekunden bei 90°C trocknen
- Pellet in 50 µl Wasser lösen

4.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR = Polymerase Chain Reaction) ist eine Methode, um DNA-Fragmente *in vitro* zu amplifizieren. Die Technik wurde zuerst von (Mullis und Faloona, 1987) beschrieben. Grundlage ist die Fähigkeit der DNA-Polymerase, einzelsträngige DNA zu einem Doppelstrang aufzupolymerisieren, wenn ein kurzer doppelsträngiger Startbereich vorliegt. Deshalb sind zwei Oligonukleotid-Primer erforderlich, die komplementär zu Bereichen der zu amplifizierenden DNA sind, und die als Startpunkt für die Tochterstrang-Synthese dienen. Die beiden Primer begrenzen so auch das zu amplifizierende Fragment. Sie werden im Überschuss zugegeben. Zunächst wird die doppelsträngige DNA durch Erhitzen in Einzelstränge aufgetrennt. Beim anschließenden Abkühlen können sich die Primer an die DNA anlagern (Annealing). Es folgt dann die Aufpolymerisierung durch die DNA-Polymerase bei mittlerer Temperatur. Durch Verwendung der Taq-Polymerase bleibt die Aktivität des Enzyms über den Hitzeschritt erhalten. Die zyklische Wiederholung der Schritte führt zur Anreicherung des gewünschten Fragmentes.

Beispiel für einen Reaktionsansatz:

- 2,5 µl 10x PCR-Puffer + MgCl₂ (MBI)
- 0,25 µl dNTPs (je 10 mM)
- 0,25 µl Enhancer
- 1 µl Primer 1 (10 µM)

- 1 µl Primer 2 (10 µM)
- 0,5 µl Taq DNA-Polymerase
- 2 µl DNA-Template
- 17 µl H₂O

Das verwendete PCR-Programm hängt von der Schmelztemperatur der Primer und dem verwendeten Template ab und muss für jede PCR individuell erstellt werden.

4.4.1 Mutagenese-PCR

Die Mutagenese-PCR ist eine spezielle Form der Polymerase-Kettenreaktion, bei der während der Amplifizierung Basen ausgetauscht werden. Im Unterschied zur klassischen PCR begrenzen hierbei die Primer nicht das gewünschte DNA-Fragment, sondern binden beide (Sense und Antisense Primer) an der Stelle, an der eine oder mehrere Basen ausgetauscht werden sollen. Die Basenabfolge der Primer entspricht dabei der gewünschten Mutation, ist also in diesen Bereichen nicht komplementär zur Matrize. Damit sie dennoch stabil und spezifisch an die DNA binden, sind sie entsprechend länger als Primer der klassischen PCR. Bei der Synthese des komplementären Strangs wird das Plasmid vollständig abgelesen und amplifiziert.

Die Mutagenese-PCR erfolgt nach der Anleitung des QuickChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene. Die Erstellung der Primer erfolgt über ein im Internet verfügbares Programm: <http://www.stratagene.com/qcprimerdesign>.

Beispiel für einen Reaktionsansatz:

- 5 µl 10x Reaktionspuffer
- 50 ng dsDNA (Template)
- 125 ng Oligonukleotid-Primer 1 (sense)
- 125 ng Oligonukleotid-Primer 2 (antisense)
- 1 µl dNTP-Mix
- mit H₂O auf 50 µl auffüllen
- zuletzt 1 µl *Pfu*-DNA-Polymerase (2.5U)

Im Thermocycler wird folgendes Programm benutzt:

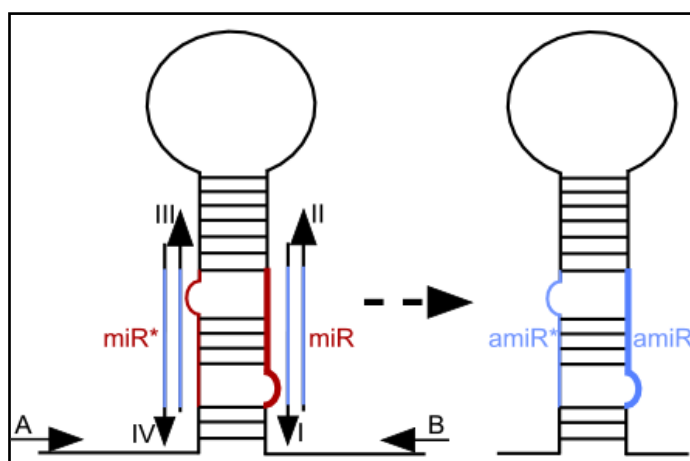
- 95°C 30 Sekunden initiale Denaturierung
- 95°C 30 Sekunden Denaturierung
- 55°C 1 Minute Annealing
- 68°C 1 Minuten pro kb des Plasmids Elongation
- Schritte 2-4 17 mal wiederholen
- Lagerung bei 4°C

Um mit dem PCR-Produkt weiter arbeiten zu können, muss zunächst die methylierte Template-DNA ohne Mutation mindestens 1 h bei 37°C durch *DpnI* verdaut werden. *DpnI* greift dabei die Sequenz 5'-Gm⁶ATC-3' an.

4.5 Klonierung von amiRNA-Konstrukten

Der artificial microRNA designer WMD2 (<http://wmd.weigelworld.org/cgi-bin/mirnatools.pl>) liefert vier Oligonukleotid Sequenzen (I bis IV), die benötigt werden, um die artificial microRNA in den miR319a Vorgänger durch Mutagenese hereinzubringen.

Als Ausgangsmaterial für die PCR wird das Plasmid pRS300 benötigt, das den miR319a Vorgänger im pBSK (kloniert über *SmaI* Schnittstelle) enthält.



- I: microRNA forward
- II: microRNA reverse
- III: microRNA* forward
- IV: microRNA* reverse

Der Vorläufer, der die amiRNA enthält wird mit Hilfe von überlappender PCR generiert. In der ersten Runde werden die Fragmente (a), (b) und (c) amplifiziert (s. Tabelle unten), die dann anschließend in der Reaktion (d) verbunden werden.

	forward Oligo	reverse Oligo	Template
(a)	A	IV	pRS300
(b)	III	II	pRS300
(c)	I	B	pRS300
(d)	A	B	(a)+(b)+(c)

Die Oligonukleotide A und B basieren auf der Sequenz des Ausgangsplasmids. Sie liegen außerhalb der multiple cloning site des pBSK um größere PCR Produkte zu bekommen. Um die amiRNA gateway-kompatible zu machen wurden zusätzlich noch links und rechts die gateway-sites angehängt.

amiRNA-GW Primer A : 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT
CTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAC-3'
amiRNA-GW Primer B: 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT
CGCGGATAACAATTCACACAGGAAACAG-3'

Für die PCR Reaktionen (a) – (c) wird folgender Mastermix angesetzt:

- 5 µl 10xPCR Puffer (mit Mg²⁺)
- 5 µl dNTPs (2 mM)
- 2 µl jedes Primers (10 µM)
- 2 µl Plasmid DNA (1:100)
- 0.5 µl Pfu Polymerase
- 33.5 µl Wasser

Das PCR-Programm:

- 95°C 2 Min
 - 95°C 30 Sek
 - 50°C 30 Sek
 - 72°C 40 Sek
 - 72°C 7 Min
- } 32 Zyklen

Das PCR-Produkt wird auf einem 2%igem Gel aufgetrennt, Banden werden ausgeschnitten, eine Gelextraktion durchgeführt (doppelte Menge NT-Puffer wegen der 2% igen Agarose) und in 25 µl Wasser eluiert.

Für die PCR Reaktion (d) wird folgender Mastermix angesetzt:

- 5 µl 10xPCR Puffer (mit Mg²⁺)
- 5 µl dNTPs (2mM)
- 2 µl Primer A (10 µM)
- 2 µl Primer B (10 µM)
- 1 µl PCR (a) + 1 µl PCR (b) + 1 µl PCR (c)
- 0.5 µl Pfu
- 33 µl Wasser

Das PCR-Programm:

- 95°C 2 Min
 - 95°C 3 Sek
 - 50°C 3 Sek
 - 72°C 1,5 Min
 - 72°C 7 Min
- } 32 Zyklen

Das PCR-Produkt wird auf 1%igem Gel aufgetrennt, die Banden ausgeschnitten, eine Gelextraktion durchgeführt und in 25µl Wasser eluiert.

Das fertige amiRNA-Konstrukt aus Reaktion (d) kann mittels BP-Reaktion in beliebige Donor-Vektoren (z.B. pDON201) gebracht werden.

Da konstitutive Knock-Outs oder amiRNA-Ansätze für die Kinasen Kin10 und Kin11 letal sind, wurden die amiRNA-Konstrukte von diesen beiden Kinasen aus dem pDON201 anschließend mittels LR-Reaktion in den Estradiol-induzierbaren Vektor pMDC7 gebracht und anschließend in *Arabidopsis* Pflanzen (Col-0) mittels FloralDip transformiert. Die Selektion erfolgt mit Hilfe von Hygromycin.

4.5.1 Estradiol-Induktion

Für die Estradiol-Induktion der induzierbaren amiRNA Pflanzen wurde jeweils ein großes Blatt pro Pflanze geerntet und für 24 h in einem 2 ml Eppendorfgefäß mit 1,5 ml 5 µM Estradiol in PBS pH 7,4 inkubiert. Die Estradiol-Stocklösung (10 ml 10 mM Estradiol (0,027 g) in DMSO) sollte immer frisch angesetzt werden.

Anschließend wird die Flüssigkeit abgenommen, das Blatt abgetupft und in flüssigem Stickstoff weggefroren. Da Estradiol sehr giftig ist, den Flüssigabfall speziell entsorgen.

4.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA erfolgte photometrisch am GeneQuant II (Pharmacia). Dabei wird die Absorption von Licht durch wässrige Lösungen von RNA und DNA bei 260 nm gemessen. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht eine OD_{260} von 1,0 einer Nukleinsäurekonzentration von 50 µg/ml dsDNA bzw. 40 µg/ml RNA. Um den Reinheitsgrad der Nukleinsäuren zu ermitteln wird auch die Absorption von Proteinen bei 280 nm gemessen. Der Quotient der beiden Werte OD_{260}/OD_{280} stellt ein Maß für den Reinheitsgrad dar. Der Reinheitsgrad sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen. Zur Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA wurden 1:50 Verdünnungen gegen H_2O gemessen.

Alternativ kann die DNA-Konzentration auch an einem anderen Gerät, dem Nanovue, gemessen werden. Hier werden 2 µl der unverdünnten Probe auf die Detektionsfläche des Gerätes pipettiert und das Gerät gibt einem dann die Konzentration sowie die Reinheit der DNA- oder RNA-Probe aus.

Eine dritte Alternative ist das Abschätzen der DNA-Konzentration nach Auftrennung der Probe in einem Agarosegel und Anfärbung mit Ethidiumbromid im Vergleich zu DNA bekannter Konzentration (z.B. dem Marker).

4.7 Restriktionsspaltung von DNA

Restriktionsendonukleasen (Desoxyribonukleasen) vom Typ II spalten Phosphodiester-Bindungen doppelsträngiger DNA an spezifischen Basensequenzen (Smith und Wilcox, 1970). Es gibt eine große Anzahl verschiedener Restriktionsendonukleasen, die jeweils bestimmte Erkennungssequenzen haben (Roberts, 1985). Je nach Enzym entstehen glatte DNA-Enden („blunt ends“) oder 5'- bzw. 3'-überhängende Enden („sticky ends“). Die zur Restriktionsspaltung eingesetzte DNA (ca. 0,5-2 µg Plasmid-DNA) sollte frei von Kontaminationen wie hohen Salzkonzentrationen, EDTA oder organischen Lösungsmitteln sein, um die Enzymaktivität nicht zu mindern. Die Reaktionen finden für 2-16 Stunden bei den für jedes Enzym optimalen Temperatur- und Pufferbedingungen (Spaltungspuffer von MBI oder Boehringer) statt. Es werden Enzymmengen von mindestens 1 Unit (U) Restriktionsenzym pro µg DNA eingesetzt. Weil die Enzymlösungen Glycerin enthalten, wird nicht mehr Restriktionsenzym als höchstens 10 % des Endvolumens zugesetzt, da Glycerinkonzentrationen von mehr als 5 % die Spezifität herabsetzen. Die meisten Restriktionsenzyme können durch eine Hitzebehandlung für 10 Minuten bei 65°C inaktiviert werden. Die Kontrolle der Spaltung erfolgt durch Agarosegelelektrophorese mit einem Aliquot des Ansatzes. Restriktionsspaltungen können zur Klonanalyse eingesetzt werden. Außerdem sind sie die Grundlage der Klonierungen (Cohen et al., 1973).

4.8 Agarosegelelektrophorese von DNA-Molekülen

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese werden DNA-Moleküle nach ihrer Größe aufgetrennt (McDonell et al., 1977; Southern, 1979). DNA ist aufgrund des Zucker-Phosphat-Rückgrats negativ geladen. Im elektrischen Feld wandert sie somit zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist umso größer, je kleiner die DNA-Moleküle sind. Als Gelmatrix dient Agarose, ein gelierfähiges Polysaccharid, welches aus sich abwechselnden Einheiten von β -1,3-verknüpfter D-Galaktopyranose und α -1,4-verknüpfter 3,6-Anhydro-L-Galaktopyranose besteht. Der Trennbereich ist abhängig von der Agarosekonzentration, da sie die Porengröße beeinflusst. Je höher die Agarosekonzentration, desto kleiner die Poren, desto besser werden kleine Moleküle aufgetrennt. Zur Auftrennung großer Fragmente wird ein 0,7%iges Gel benutzt. Kleine Fragmente, wie PCR-Produkte, werden in Gelen aufgetrennt, die 1% Agarose enthalten. Ethidiumbromid (3,8-Diamino-6-ethyl-5-phenylphenantridiumbromid) dient zum Anfärben der DNA. Es bindet an die DNA, indem es zwischen die Basenpaare interkaliert. Der Komplex aus DNA und Ethidiumbromid fluoresziert unter UV-Licht und wird damit auf dem Transilluminator sichtbar.

4.9 DNA-Elution aus Agarosegelen

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wird das Nucleospin[®] Extract Kit von Macherey-Nagel verwendet. Die Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

4.10 Ligation

Ligation bezeichnet den Vorgang, bei dem zwei DNA-Stränge mit glatten Enden oder komplementären überhängenden Enden über Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen den 3'-OH-Gruppen und den 5'-Phosphatgruppen an den jeweiligen Enden verbunden werden. Dieser Vorgang wird durch die T4-DNA-Ligase katalysiert. In Anwesenheit von ATP wird das Enzym durch Adenylierung aktiviert, wobei Pyrophosphat abgespalten wird. Das AMP wird auf das 5'-Ende eines DNA-Strangs übertragen. Durch die daraus resultierende Aktivierung des 5'-Phosphoratoms wird an diesem ein nucleophiler Angriff durch die 3'-OH-Gruppe des anderen DNA-Strangs möglich. Die Stränge werden geschlossen und AMP freigesetzt.

Da die Taq-Polymerase keine Fragmente mit glatten Enden produziert, sondern einen Überhang von einer Base schafft, wobei es sich in den meisten Fällen um ein Adenosin handelt (Clark, 1988), lassen sich Taq-amplifizierte PCR-Produkte gut in Vektoren mit Thymin-Überhang klonieren. Ein solcher Vektor ist pGEM[®]-T von Promega oder auch der hauseigen hergestellte psk-T Vektor.

Mit Hilfe entsprechender Schnittstellen und Restriktionsenzyme lassen sich aber auch alle Fragmente mit anderen Überhängen oder glatten Enden in beliebige andere Vektoren bringen.

- Vektor (ca. 50 ng) und Fragment (>50 ng) mit 1 µl T4-DNA-Ligasepuffer und 1 µl T4-DNA Ligase in Gesamtvolumen von 10 µl in Eppendorfgefäß pipettieren
- Über Nacht bei 4°C ligieren
- Die Reaktion durch 15 minütige Inkubation bei 60°C abstoppen

4.11 Blau-Weiß-Selektion

Für die Blau-Weiß-Selektion muss die Klonierungsstelle im Vektor innerhalb des *lacZ*-Gens liegen. *LacZ* codiert für die ersten 146 aminoterminalen Aminosäuren (α -Peptid) der β -Galaktosidase. Sie können zusammen mit einem inaktiven Enzym, dem die Aminosäuren 11-41 fehlen, eine funktionierende β -Galaktosidase bilden (α -Komplementation). Das aktive Enzym hydrolysiert das Substrat X-Gal, das daraufhin durch Luftoxidation eine blaue Färbung zeigt. Bakterienstämme mit dem inaktiven Enzym können durch Aufnahme eines Plasmids, das das *lacZ*-Gen trägt, nach Induktion mit IPTG X-Gal umsetzen. Wird die Sequenz des *lacZ*-Gens jedoch durch den Einbau von fremder DNA in das Plasmid unterbrochen, so bleibt die Bakterienkolonie weiß.

Dieses Verfahren erleichtert die Selektion der Kolonien mit rekombinanten Plasmiden. Die Platten, auf denen eine Blau-Weiß-Selektion durchgeführt wird, werden mit 50 μ l X-Gal-Lösung (20 mg/ml) und 50 μ l IPTG-Lösung (0,1 M) beschichtet. Animpfen und Inkubation finden wie gewohnt statt.

4.12 Gateway-Rekombination

Bei Gateway-Klonierungen werden DNA-Segmente über ortsspezifische Rekombination zwischen verschiedenen Plasmiden transferiert (Gateway® Technology – The Gateway Manual). 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 enthalten. Bei Gateway-Klonierungen werden zwei Reaktionen verwendet. Das DNA-Segment kann aus dem PCR-Produkt in der BP-Reaktion in einen Eingangs-Vektor rekombiniert werden. Von dort aus kann es in der 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 transferieren.

4.12.1 BP-Reaktion

Die BP-Reaktion dient dazu, den DNA-Abschnitt zwischen den *attB*-sites in einen Donor-Vektor mit *attP*-sites zu transferieren. Dabei entsteht ein Eingangsplasmid mit *attL*-sites.



- 50-150 ng *attB*-PCR-Produkt (oder linearisierter Ziel-Vektor) in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß geben
- 150 ng Eingangs-Vektor (z.B. pDON201) zugeben
- Mit H₂O auf 8 μ l auffüllen
- 2 μ l BP Clonase Enzym Mix (enthält bereits den Puffer) zugeben
- ü.N. bei 25°C inkubieren
- 1 μ l Proteinase K zugeben und 10 Minuten bei 37°C inkubieren
- 5 μ l des Ansatzes in 100 μ l chemisch kompetente DH5 α -*E.coli* Zellen transformieren

4.12.2 LR-Reaktion

Die LR-Reaktion dient dazu, die DNA zwischen den *attL*-sites eines Eingangsplasmids in einen Ziel-Vektor mit *attR*-sites zu transferieren. Sie läuft am effizientesten ab, wenn beide Vektoren linearisiert werden.



- 300 ng Eingangsvektor in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß geben
- 300 ng Ziel-Vektor zugeben
- Mit H₂O auf 8 µl auffüllen
- 2 µl LR Clonase Enzym Mix (enthält bereits den Puffer) zugeben
- ü.N. bei 25°C inkubieren
- 1 µl Proteinase K zugeben und 10 Minuten bei 37°C inkubieren
- 5 µl des Ansatzes in 100 µl chemisch kompetente DH5α-*E.coli* Zellen transformieren

4.13 Colony-Screen mittels PCR

Um potenziell positive Klone aus der Blau-Weiß Selektion (weiße Kolonien) noch in einer PCR zu verifizieren oder auch Kolonien von Platten ohne Blau-Weiß Selektion zu testen, können die Plasmide mit Hilfe einer Schnelllyse mittels Kochen isoliert werden.

- 10 µl H₂O in ein PCR-Gefäß geben
- Kolonie mit sterilem Zahnstocher picken und auf eine Masterplatte überimpfen
- Den restlichen Teil der am Zahnstocher befindlichen Zellen in den 10 µl H₂O resuspendieren
- 10 Minuten bei 95°C (Zellen lysieren, DNasen denaturieren), dann auf Eis
- Entsprechenden Mastermix für PCR zugeben
- PCR Programm starten (auf Primer abstimmen)

4.14 Plasmid-Präparation mit Hilfe von Kits

Mit Hilfe des Nucleospin® Plasmid-Kits ist es möglich, sehr schnell kleinere Mengen Plasmid-DNA aus *E.coli* Zellen (5 ml Kulturen) zu gewinnen. Die Extraktion erfolgt nach dem Protokoll des Herstellers Macherey-Nagel.

Größere DNA-Mengen z.B. für die Protoplasten-Transformation wurden mit Hilfe des NucleoBond® MaxiKits von Macherey-Nagel aus 300 ml *E.coli* Kulturen gewonnen, die mit einer 5 ml Übertagkultur angeimpft wurden. Die Extraktion erfolgte hier nach dem modifizierten Protokoll des Herstellers, indem die Säulen zweimal nacheinander zur Bindung und Elution desselben Plasmids benutzt werden.

4.15 Plasmid-Präparation durch alkalische Lyse

Eine weitere Möglichkeit sehr schnell kleinere Mengen Plasmid-DNA aus *E.coli* Zellen zu gewinnen ist eine modifizierte alkalische Lyse der Bakterien (Le Gouill et al., 1994). Die hieraus gewonnene DNA ist allerdings sehr viel unsauberer als die DNA, die mittels des Nucleospin® Plasmid-Kits gewonnen wurde und wird deshalb nur verwendet, wenn viele verschiedene Klone durch Restriktionsspaltungen getestet werden sollen.

- 1,5 ml einer *E. coli*-ü.N.-Kultur pelletieren (3 Minuten, 5000 rpm)
- Überstand verwerfen
- Die Zellen in 100 µl S1 (DNA-Maxi-Kit-Puffer) resuspendieren
- Die Lyse der Bakterien erfolgt durch Zugabe von 150 µl S2
- 7-9 mal invertieren, max. 5 Minuten stehen lassen
- Zur Neutralisation 150 µl S3 zugeben und invertieren
- Zentrifugation (10 Minuten, 13000 rpm)
- Überstand verwerfen
- Die pelletierte DNA wird mit 70 % Ethanol waschen und kurz trocknen
- Pellet in 40 µl H₂O lösen und so zur Restriktionsanalyse einsetzen

4.16 DNA-Sequenzierung

Zum Sequenzieren der DNA wird ein Verfahren benutzt, das auf der kontrollierten Unterbrechung der DNA-Synthese beruht. Diese Methode wurde von (Sanger et al., 1977) entwickelt. Einzelsträngige DNA dient als Template für die Synthese eines neuen Stranges. Es wird ein Primer zugegeben, der mit der DNA hybridisieren kann. Die DNA-Polymerase I benötigt für ihre Syntheseaktivität einen kurzen Abschnitt doppelsträngiger DNA. Zusätzlich zu den Desoxyribonukleotiden werden auch Dideoxyribonukleotide (ddNTPs) in den Reaktionsansatz gegeben. Diesen fehlt die Hydroxylgruppe am 3'-C-Atom des Zuckers. Werden die ddNTPs in den neuen DNA-Strang eingebaut, so stoppt das Kettenwachstum, da keine weitere Phosphodiesterbindung gebildet werden kann. Über die unterschiedliche Länge der neu entstandenen DNA-Stränge lässt sich die Basenabfolge nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung ermitteln. Längenunterschiede von einem Basenpaar können aufgelöst werden. Die ddNTPs sind unterschiedlich Fluoreszenzmarkiert, so dass nach einer Kapillar-Gelelektrophorese jeder DNA-Strang mit einer

Laserapparatur detektiert wird. Bei dem Cycle Sequencing wird durch zyklisches Denaturieren und anschließende Neusynthese die Menge an zu analysierender DNA erhöht. Cycle Sequencing und Aufreinigung der DNA erfolgen mit dem ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit.

In ein PCR-Gefäß werden pipettiert:

- 1,5 µl 5x T-Puffer (BDT1)
- 1 µl Terminator Ready Reaction Mix
- 3-5 pmol Primer
- 100-200 ng DNA/kb (z.B 400-800 ng für einen 4 kb Vektor)
- Mit H₂O auf 10 µl auffüllen

Im Thermocycler wird folgendes Programm benutzt:

- 95°C 1 Minute initiale Denaturierung
- 95°C 10 Sekunden Denaturierung
- 50°C 5 Sekunden Annealing (auf Primer abstimmen)
- 60°C 3 Minuten Elongation
- Schritte 2-4; 29 mal wiederholen
- Lagerung bei 4°C

Damit die DNA sequenziert werden kann, muss sie gereinigt werden. Alle Verunreinigungen, vor allem aber ungebundene Terminatoren, stören die Sequenzierung.

- Die 10 µl Sequenzieransatz in 1,5 ml Eppendorfgefäße geben
- 40 µl 70 % Ethanol (unvergällt) zugeben
- Gut mischen
- Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur
- 20 Minuten bei RT/ 13.000 rpm zentrifugieren
- Überstand vollständig abnehmen
- Pellet mit 125 µl 70 % Ethanol (unvergällt) waschen
- 10 Minuten bei RT/ 13.000 rpm zentrifugieren
- Überstand vollständig abnehmen
- Pellet 1 Minuten bei 95°C mit offenem Deckel trocknen
- Pellet in 10 µl HiDi aufnehmen; kann so direkt im Sequencer verwendet werden

4.17 RNA Extraktion mit Trizol

Die Methode basiert auf einer Phenol/Chloroform Extraktion. Da RNA sich besser in der hydrophilen, wässrigen Phase löst, während Chlorophyll und andere Bestandteile besser in der hydrophoben Chloroform-Phase gelöst werden, können sie so voneinander getrennt werden.

Die beiden Thiocyanat-Salze im Extraktionspuffer inhibieren RNasen und verhindern so eine Degradation der RNA (Chomczynski, 1993; Chomczynski und Sacchi, 1987).

- 0,2 g Blattmaterial in N₂ aufmörsern und in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführen
- 1,5 ml Trizolpuffer hinzugeben
- Gefäß auf dem Vortexer fixieren und 5 Minuten schütteln
- 300 µl Chloroform hinzugeben
- Erneut 5 Minuten schütteln
- 30 Minuten bei 4°C/ 12.000 g zentrifugieren
- Überstand (ca. 1,2 ml) in ein neues Gefäß überführen
- 420 µl Fällungspuffer und 420 µl Isopropanol zugegeben
- Invertieren und 10 Minuten bei RT inkubieren
- 15 Minuten bei 4°C/ 12.000 g abzentrifugieren
- Überstand abnehmen
- Pellet in 250 µl 70 % EtOH resuspendieren
- 10 Minuten bei 4°C/ 12.000 g abzentrifugieren
- Einige Minuten lufttrocknen
- In 50 µl H₂O lösen (Inkubation 20 min. bei RT auf dem Schüttler)

4.18 Northern Blot Analyse

Im Northern Blot Verfahren (Alwine et al., 1977; Thomas, 1980) wird die zu analysierende RNA durch eine denaturierende Agarosegelelektrophorese zunächst aufgetrennt und nach Kontrolle des Gellaufs auf dem Transilluminator durch einen Kapillarblot auf eine Nylonmembran übertragen. Durch Hybridisierung des Filters mit radioaktiv markierten einzelsträngigen DNA-Sonden ist es möglich, diejenigen RNA-Transkripte durch Autoradiographie sichtbar zu machen, die komplementär zu der eingesetzten Sonde sind.

4.18.1 Auftrennung von RNA in denaturierenden Agarosegelen

Um die elektrophoretische Größenauftrennung von RNA-Molekülen zu ermöglichen, muss die Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen stattfinden, da sonst die

Sekundärstrukturen das Laufverhalten beeinflussen würden. Die Elektrophorese findet deshalb in einem Formaldehyd-haltigen Agarosegel statt:

- 1,5 g Agarose in 112,5 ml H₂O aufkochen
- Unter Rühren auf ca. 60°C abkühlen lassen
- 15 ml 10x MEN-Puffer und 22,5 ml 37 % Formaldehyd dazu geben

Als Laufpuffer dient 1x MEN-Puffer. Die je 10 µg der RNA-Proben werden mit Wasser auf das gleiche Volumen abgeglichen und mit je 10 µl RNA-Probenpuffer (2,5x) versetzt. Die Denaturierung der Proben erfolgt bei 65°C für 10 min. Bis zum Auftragen der Proben werden diese auf Eis gehalten.

4.18.2 Kapillar Blot

Durch den Kapillar Blot wird die aufgetrennte RNA auf eine Nylonmembran übertragen.

- Zwei Lagen Fließpapier mit 10x SSC äquilibrieren und so auf einer ebenen Platte legen, dass die Enden in ein 10x SSC-Pufferreservoir tauchen
- Das RNA-Gel luftblasenfrei mit der Oberseite nach unten auf das Fließpapier legen
- Die Nylonmembran luftblasenfrei auf das Gel auflegen
- Drei Lagen Fließpapier und Papiertüchern oben drauf
- Mit einem Gewicht (ca. 500 g) gleichmäßig beschweren
- Über Nacht blotten
- RNA durch zweistündige Inkubation bei 80°C auf der Filteroberfläche fixieren

4.18.3 Herstellen einer radioaktiv markierten DNA-Sonde

Für die Herstellung radioaktiv markierter Hybridisierungssonden wird ein DNA-Fragment nach Restriktionsspaltung oder ein PCR-Produkt aus einem Agarosegel eluiert. Die Markierungsreaktion erfolgt nach der Random-Prime-Labeling-Methode (Feinberg und Vogelstein, 1983; Feinberg und Vogelstein, 1984), bei der Hexanukleotide zufälliger Sequenz an die Matrizen-DNA binden. Die gebundenen 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 erfolgt nach dem Protokoll des Herstellers, wobei jeweils 5 µl [³²P] dATP zugefügt werden. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C wird die Reaktion durch Zugabe von 60 µl H₂O gestoppt. Nicht

eingebaute Nukleotide und Primer werden durch Gelfiltration über eine Sephadex G50-Säule abgetrennt. Als Säule dient eine 1 ml Einwegspitze, die mit einem Fließpapierkügelchen verschlossen und dann mit dem Säulenmaterial beladen wird. Das Packen der Säule sowie die Elution der Sonde erfolgt jeweils durch Zentrifugation bei 1500 rpm für 5 min in der Hettichzentrifuge mit Ausschwingrotor. Die gereinigte Sonde wird in einem verschraubbaren Eppendorfgeläß aufgefangen.

4.18.4 Hybridisierung der Northern Blot Membran

Durch Hybridisierung der Membran mit radioaktiv markierten, einzelsträngigen DNA-Sonden lassen sich komplementäre RNA-Transkripte auf der Membran lokalisieren. Die Spezifität, mit der die Sonde an die RNA bindet, ist abhängig von der Salzkonzentration und der Temperatur. Bei hoher Salzkonzentration und niedriger Temperatur ist die Stabilität unspezifischer DNA-RNA-Hybride größer als in Lösungen niedriger Salzkonzentration und höherer Temperatur. Durch die Absenkung der Salzkonzentration in den Waschlösungen erhöht man die Stringenz. Die Methode ist modifiziert nach (Church und Gilbert, 1984).

- Die zu analysierende Membran 30 Minuten bei 65°C in einer Hybridisierungsröhre mit 15 ml Hybridisierungslösung (Church) inkubieren
- Die Sonden-DNA 10 Minuten bei 95°C denaturieren
- Zugabe der Sonden-DNA zu ca. 15 ml Hybridisierungslösung in die Hybridisierungsröhre
- Hybridisierung bei 65°C über Nacht im Roller
- Zur Abtrennung unspezifisch gebundener Sonden-DNA die Membran zweimal 5 Minuten mit 2x SSC / 0,1% SDS in der Röhre waschen
- Weitere 10 Minuten im Bellydancer mit 1x SSC / 0,1% SDS waschen
- Optional für weitere 15 – 30 Minuten mit 0,5x SSC / 0,1% SDS waschen

Für den Nachweis der Radioaktivität wird die Membran in Folie eingeschweißt und mit einem IP-Screen exponiert. Die Dauer der Exposition hängt von der Menge der nachweisbaren Radioaktivität ab. Sie beträgt für diese Arbeit in der Regel ein bis zwei Tage. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe des Bioimagers (BAS-1000 von Fuji). Zur Quantifizierung werden die Programme PCBAS[®]2.09 und TINA[®]2.0 der Firma Raytest verwendet. Die Normalisierung der detektierten Signale wird über den Vergleich mit der dokumentierten Ethidiumbromid-Färbung der RNA erreicht.

4.18.5 Rehybridisierung

Die auf der Filteroberfläche fixierte RNA kann nacheinander mit mehreren verschiedenen Sonden hybridisiert werden. Dazu müssen die auf dem Filter befindlichen radioaktiven Sonden aus der vorhergehenden Hybridisierung durch Denaturierung der RNA-DNA-Hybride in Waschlösungen mit geringer

Salzkonzentration bei hoher Temperatur abgelöst werden. Die Membran wird durch Zugabe kochendheier 0,1%iger SDS-Lösung für 1 Stunde bei 65°C gewaschen. Danach ist der Filter für eine erneute Hybridisierung einsetzbar.

4.19 RT-PCR mit quantitativer Real-Time-PCR

Eine Alternative zum RNA-Gel und anschließendem Northern Blot, mit der ebenfalls die Menge eines bestimmten Transkripts in einer Probe bestimmt werden kann, ist die RT-PCR mit anschließender quantitativer Real-Time-PCR. Dabei wird die vorhandene mRNA einer Probe zunächst in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, die dann in der anschließenden PCR amplifiziert wird.

4.19.1 RT-PCR

Für die Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) nutzt man die Fähigkeit der Reversen Transkriptase, an die RNA gebundene Primer in 3'-Richtung zu verlängern. In diesem Fall werden ein Oligo-dT-Primer und ein Random-Nonamer-Primer verwendet. Der Oligo-dT-Primer lagert sich spezifisch an den poly-A-Schwanz der mRNAs an, während der Random-Nonamer Primer je nach Sequenz an verschiedensten Stellen der mRNA bindet. So werden in dieser Reaktion alle mRNAs in cDNA umgeschrieben. Um Verunreinigungen durch genomische DNA vorzubeugen wird vor der cDNA-Synthese noch ein DNase-Verdau durchgeführt.

- 1 µg RNA in ein PCR-Gefäß geben
- 1 µl 10x Reaktionspuffer und 1µl DNaseI dazu geben und mit DEPC-H₂O auf 10 µl auffüllen
- 30 Minuten bei 37°C
- 1µl 25 mM EDTA dazu
- 10 Minuten bei 65°C
- 0,2 µl Oligo-dT- und 1µl Random-Nonamer-Primer dazu geben
- Bei 70°C für 10 Minuten im Thermocycler inkubieren
- Auf Eis zwischenlagern
- Mastermix für alle Proben vorbereiten, pro Probe:
 - 2 µl dNTPs
 - 4 µl RT-Puffer
 - 0,25 µl Reverse Transkriptase
- 6,25 µl des Mastermixes zu jeder Probe geben und mischen
- 70 Minuten bei 42°C im Thermocycler inkubieren
- 10 Minuten bei 70°C im Thermocycler (stoppt die Reaktion)
- Lagerung bei 4°C

Die cDNA wird anschließend 1:10 mit Wasser verdünnt und so als Template für die qPCR eingesetzt.

4.19.2 Quantitative Real-Time-PCR

Die quantitative Real-Time-PCR ist eine sehr sensitive Methode, die die Amplifikation und Quantifizierung auch kleinerer DNA-Mengen in Echtzeit ermöglicht.

Während der Real-Time-PCR wird die Fluoreszenz nach jedem Zyklus gemessen. Als Fluorophor dient hier Sybr Green. Sybr Green ist ein Farbstoff, der an doppelsträngige, nicht aber an einzelsträngige DNA bindet und dann fluoresziert. Die Zunahme der Fluoreszenz während der Reaktion repräsentiert also die zunehmende Menge an amplifizierter DNA. Je mehr Template zu Beginn der Reaktion vorhanden ist, desto weniger Zyklen werden benötigt, um ein signifikant über dem Hintergrund liegendes Fluoreszenz-Signal zu erhalten (Gibson et al., 1996). Dieser Punkt wird als C(t)-Wert definiert und liegt immer in der exponentiellen Phase der Amplifikation.

Als interner Abgleich wird der Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein zu jeder Reaktion dazugegeben.

- Master Mix ansetzen (pro Reaktion):
 - 18,45 µl H₂O
 - 2,5 µl 10x PCR-Puffer
 - 1 µl MgCl₂
 - 0,25 µl dNTPs
 - 0,625 µl Primer for (10 µM)
 - 0,625 µl Primer rev (10 µM)
 - 0,05 µl DNA Polymerase (z.B. BioTaq, Advantage Taq für ChIP)
 - 0,25 µl Sybr Green
 - 0,25 µl Fluorescein
- 24 µl Master Mix in jedes PCR-Gefäß
- 1 µl cDNA (1:10 verdünnt) zum Master Mix geben
- Gut mischen, kurz zentrifugieren
- PCR-Programm (Primer- und Polymerase-abhängig) starten

Da Sybr Green nicht zwischen unterschiedlichen doppelsträngigen DNA-Abschnitten unterscheidet, ist es wichtig als Qualitätskontrolle eine Schmelzkurve zu erstellen. Dafür wird am Ende der PCR die Temperatur langsam in 0,5°C-Schritten erhöht. Am Schmelzpunkt trennen sich die Doppelstränge auf und die Fluoreszenz sinkt rapide. Alle PCR-Produkte eines spezifischen Primerpaares sollten die gleiche Schmelztemperatur haben. Sind in der Schmelzkurve mehrere Maxima zu erkennen, kann das verschiedene Gründe wie z. B. unspezifische Bindung, Primerdimere oder Kontamination haben.

Ist tatsächlich nur ein Maximum zu erkennen, kann das Ergebnis ausgewertet werden. Dazu werden die C(t)-Werte der Proben miteinander verglichen. Die Menge des zu amplifizierenden Fragmentes sollte in jedem Zyklus verdoppelt werden. Ein

Unterschied von 3,3 Zyklen im C(t)-Wert bedeutet deshalb etwa eine 10 fache Menge an DNA in der Ausgangs-Probe.

Für die Normalisierung der Messwerte wurde zusätzlich zu jeder Probe eine Amplifikation mit Primern für das *Ubiquitin 5 (Ubi5)* Gen durchgeführt. Dieses sollte in jeder Zelle gleichmäßig expremiert werden. Die gemessenen C(t) Werte der anderen Primer Kombinationen werden deshalb mit den C(t) Werten des Ubi5 verrechnet ($\Delta C(t) = C(t) \text{ Primer } x - C(t) \text{ Ubq5}$).

Der besseren Darstellung wegen werden alle Werte als Vielfaches der WT Probe (0h) dargestellt.

4.20 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Die Chromatin-Immunopräzipitation ist eine Methode, mit der die *in vivo* Bindung von Proteinen an DNA gezeigt werden kann (Hecht *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 2001).

4.20.1 Kreuzvernetzung der DNA-Protein Komplexe

Die Kreuzvernetzung der DNA-Proteinkomplexe (Solomon *et al.*, 1988; Solomon und Varshavsky, 1985) erfolgt mit Hilfe eines formaldehydhaltigen Crosslinkingpuffers.

- Je 5 g Blattmaterial pro Linie ernten und in Nylonstrümpfe packen
- In ein Einmachglas überführen und mit Crosslinkingpuffer (+ 1% Formaldehyd) überschichten
- Vakuum anlegen bis die Blätter mit dem Puffer getränkt sind (2 x 5 Minuten)
- 20 Minuten bei Raumtemperatur ohne Vakuum inkubieren
- Puffer entfernen und durch Glycinlösung ersetzen
- 5 Minuten Vakuum
- 5 Minuten bei Raumtemperatur ohne Vakuum inkubieren
- Blätter mit eiskaltem bidestilliertem Wasser waschen
- Blätter trocken tupfen
- In flüssigem Stickstoff einfrieren und lagern

4.20.2 Isolation der Kerne

In diesem Schritt werden die Kerne von den restlichen Zellorganellen und Zelltrümmern getrennt. Die Durchführung erfolgt im Kühlraum bei 4°C.

- Blattmaterial in Stickstoff aufmörsern
- In 20 ml Extraktionspuffer aufnehmen

- Mit einem Homogenisator (Micra) auf Stufe B für etwa 4 Minuten weiter homogenisieren und anschließend durch 2 Lagen Miracloth filtrieren
- Das Volumen mit Extraktionspuffer auf 24 ml bringen
- Unter langsamen Rühren langsam 1 ml 25 % Triton tropfen
- 15 Minuten weiter rühren
- 6 ml 35 % Percoll mit den 25 ml Kernen überschichten
- Bei 2000 g (3500 rpm), soft stopp, 4°C, 30 Minuten abzentrifugieren
- Extraktionspuffer und 35 % Percoll abnehmen
- Pellet in 20 ml Gradientenpuffer resuspendieren
- Auf ein neues 6 ml 35 % Percollkissen geben
- Bei 2000 g (3500 rpm), soft stopp, 4°C, 10 Minuten abzentrifugieren
- Überstand abnehmen und die Kerne in 0,5 ml SonicBuffer (0,5 % SDS) aufnehmen
- 20 Minuten unter leichter Bewegung bei 4°C inkubieren
- 0,5 ml SonicBuffer ohne SDS dazugeben, um endgültige Konzentration von 0,25% SDS zu erreichen

4.20.3 Fragmentierung des Chromatins

Die Ultraschallbehandlung zur Fragmentierung des Chromatins findet bei Cycle 1 und Amplitude 80% für 1,5 Minuten pro Probe auf Eis statt. Anschließend wird 15 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand, der das fixierte Chromatin enthält, wird in Aliquots von 200 µl bei -80°C weggefroren.

50 µl werden aufgehoben, um die DNA-Konzentration zu bestimmen:

- Zugabe von 5 µl Proteinase K und 1 µl RNase
- 1 Stunde Inkubation bei 42°C
- Über Nacht Inkubation bei 65°C (Quervernetzung wird rückgängig gemacht)

Quantifizierung der DNA:

- 200 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) zum Aliquot dazugeben
- 30 Sekunden mischen
- 10 Minuten bei RT und 13.000 rpm abzentrifugieren
- Obere wässrige Phase in neues Eppendorfgefäß
- 200 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) dazu
- 30 Sekunden mischen
- 10 Minuten bei RT und 13.000 rpm abzentrifugieren
- 20 µl 3 M Na-Acetat, 1 µl Glykogen (10 mg/µl) und 500 µl kaltes Ethanol dazu

- Gut mischen
- 4 Stunden bei -80°C
- 45 Minuten bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugieren
- Pellet mit 900 µl 70% Ethanol waschen
- 20 Minuten bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugieren
- Pellet bei 37°C trocknen
- Pellet in 100 µl H₂O lösen
- Konzentrationsbestimmung in 1:20 Verdünnung am GeneQuant
- Kontrolle der Fragmentgröße auf 1%igem Agarosegel

4.20.4 Immunopräzipitation

Die aliquotierten Chromatin-Proteinkomplexe werden nun für die Immunopräzipitation verwendet:

- Proben auf Eis auftauen
- 10 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Mit Hilfe der zuvor bestimmten DNA-Konzentrationen die gleiche Menge DNA (12 µg) in neues Eppendorfgefäß überführen
- Mit SonicBuffer + 0,25% SDS auf 200 µl auffüllen
- 300 µl RIPA-SDS dazu
- 1 Stunde mit 5 µl Preimmunserum unter Bewegung im Intellimixer bei 4°C inkubieren
- In der Zwischenzeit 0,125 g Protein A Sepharose beads mit 1 ml RipaF aktivieren, 15 Minuten aufquellen lassen, abzentrifugieren für 3 Minuten bei 5.000 rpm, Puffer mit Insulinnadel abziehen, erneut waschen und anschließend in 500 µl RipaF aufnehmen, um eine 50 %ige Lösung zu bekommen
- Je 50 µl gewaschene Protein A beads zu den 500 µl Proben hinzugeben
- 1 Stunde bei 4°C im Intellimixer inkubieren
- 2 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Überstand mit 1 µl HA-Antikörper (ChIP grade HA-AK von abcam) mindestens 2 h bei 4°C inkubieren (vorher 50 µl als Input-Kontrolle aufbewahren)
- 50 µl gewaschene Protein A beads zugeben
- 2 h bei 4°C im Intellimixer inkubieren
- 5 Minuten 5.000 rpm zentrifugieren
- Überstand mit Insulinnadel abnehmen (aufheben für Western-Kontrolle)
- Protein A beads (mit gebundenem Antikörper und Proteinen) 4 mal mit 1 ml RIPA-SDS waschen

- mit 2 x 200 µl Glycin elution buffer eluieren (Puffer auf Protein A beads geben, vortexen, 1 Minute abzentrifugieren bei 13.000 rpm), jeweils 50 µl davon aufheben für Western Kontrolle
- restliche 150µl Überstand direkt in 150 µl 1 M Tris-HCl pH 9,7 geben (zum Neutralisieren)
- 400 µl Sonic Buffer mit 0,25% SDS zur Input-Kontrolle geben und von da an genauso wie die Probe behandeln

Der Erfolg der IP wird anschließend im Western überprüft. Dafür werden je 100 µl Überstand und Eluat mit 400 µl Aceton über Nacht gefällt und anschließend in Harnstoffextraktionspuffer aufgenommen und auf das SDS-Gel aufgetragen. 10 µl Ausgangschromatin werden ebenfalls mit Harnstoffextraktionspuffer versetzt und mit aufgetragen.

Nachdem die durch die Immunopräzipitation gewonnene DNA (auch die der Input-Kontrollen) mit einer Phenol-Chloroformfällung aufgereinigt wurde (s. Fragmentierung des Chromatins), bei der die DNA am Ende in 35 µl H₂O (bzw. 450 µl für die Input-Kontrolle) aufgenommen wird, kann sie in einer Real-Time-PCR getestet werden.

Für die Normalisierung werden neben den Primern für das potenzielle Zielgen auch Primer verwendet, die einen Teil des Actin 7 Promotors amplifizieren. Da dieser keine bekannten Motive enthält, an die bZIP Transkriptionsfaktoren binden dient er als Negativ-Kontrolle und sollte in WT und bZIP-Überexpressionspflanzen gleich stark amplifiziert werden. Die Anreicherung des Promotorfragments in den Überexpresmierern wird als ein Vielfaches des Wildtyps angegeben.

4.21 Herstellung von Proteinextrakten aus Pflanzen

Proteinextrakte können aus Blattmaterial mittels einer Extraktion mit Harnstoffextraktionspuffer gewonnen werden.

- Blattgewebe unter flüssigem Stickstoff aufmörsern
- 50-200 mg des Pulvers im gefrorenen Zustand in ein Eppendorfgefäß einwiegen
- 150 µl Harnstoffextraktionspuffer dazugeben und gut mischen
- Bei 80°C für 10 Minuten im Thermomixer inkubieren
- 10 Minuten bei RT und 13.000 rpm zentrifugieren, um Zelltrümmer und DNA abzutrennen
- Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführen
- Die Proteinextrakte bis zur weiteren Verwendung bei -20°C lagern
- Vor Auftragung in der SDS-PAGE 5 Minuten bei 65°C inkubieren
- Die Proben können direkt auf das Gel aufgetragen werden

4.22 Western Blot Analyse

4.22.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE, Laemmli, 1970) dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekularmasse. Die Polyacrylamidmatrix wird durch Polymerisation von Acrylamid mit dem Quervernetzer N,N'-Methylenbisacrylamid (BIS) hergestellt. Die Porengröße im Gel kann durch die Wahl der Acrylamidkonzentration sowie des Verhältnisses Acrylamid/BIS verändert werden. Die Polymerisation wird durch Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) durch Erzeugung freier Radikale gestartet. Als Katalysator wird N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) zugefügt. Nach Beladen der Taschen des Gels mit je 20 µl Proteinextrakt aus denaturierten Harnstoffextrakten und Bedecken der Taschen mit Laufpuffer erfolgt der Gellauf bei 140 V für etwa 2 Stunden.

4.22.2 Proteintransfer auf PVDF-Membranen

Der Transfer der im SDS-Gel aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgt mittels der „Semi-Dry-Blotting“-Methode (Kyhse-Anderson, 1984).

- Drei Lagen Fließpapier in Transferpuffer anfeuchten und auf die Blottingapparatur auflegen
- Die PVDF-Membran in Methanol aktivieren, mit Transferpuffer äquilibrieren und luftblasenfrei auf die Schicht Fließpapier legen
- Das Gel auf dem Filter positionieren
- Mit drei Lagen in Transferpuffer äquilibriertem Fließpapier bedecken

Der Elektrotransfer läuft für eine Stunde bei 1 mA/cm² Filterfläche (= 125 mA bei einem großen Gel). Nach dem Transfer wird der Filter kurz in TBS gewaschen und zwischen zwei Lagen Fließpapier getrocknet. Die Membran wird vor der Weiterbehandlung wieder mit Methanol aktiviert.

4.22.3 Immunodetektion mit dem ECL+ System

Bei der hier angewendeten indirekten Nachweismethode werden die auf der Membran immobilisierten Proteine zuerst mit einem Primärantikörper immunodetektiert. Dieser Antikörper ist spezifisch gegen ein Epitop des nachzuweisenden Proteins gerichtet. Unter Verwendung eines Peroxidase-gekoppelten zweiten Antikörpers wird der Primärantikörper erkannt. Der Nachweis erfolgt mit Hilfe des ECL⁺ Kits der Firma Amersham. Nach Inkubation des Filters mit einem Substrat-Mix kann die bei der Peroxidase-katalysierten Oxidation des Substrates Luminol entstehende Chemilumineszenz durch Exposition eines Röntgenfilms nachgewiesen werden.

- 1 Stunde Inkubation mit 5 % Milchpulver in TBST (Absättigen freier Stellen auf der Membran = Blocken)
- 2 Stunden oder länger mit 1 % Milchpulver in TBST und Primärantikörper inkubieren
- Die Membran dreimal 5 Minuten in 1x TBST mit 1 % Milchpulver waschen (zum Entfernen von nicht gebundenem Antikörper)
- 2 Stunden oder länger in TBST mit 1 % Milchpulver mit dem Sekundärantikörper inkubieren
- 5 x 5 Minuten Waschen mit 1x TBST (entfernt nichtgebundenen zweiten Antikörper)
- Das ECL-Substratmix frisch aus Lösung A und Lösung B herstellen (für eine große Membran von 17,5 x 7,5 cm 4ml Lösung A und 100 µl Lösung B)
- Die Membran mit der Proteinseite nach oben auf eine Klarsichtfolie legen und mit dem Substratmix 5 Minuten inkubieren
- Überschüssiges Substratmix entfernen
- Eine zweite Klarsichtfolie obendrauf legen

Die Detektion der Chemilumineszenzsignale erfolgt durch Exposition eines Röntgenfilms, je nach Signalstärke für wenige Sekunden bis zu einer Stunde, der dann für 1-5 Minuten entwickelt, kurz gewässert und 3 Minuten fixiert wird.

4.23 Messung des Chlorophyllgehalts

Die Messung des Gesamtchlorophyllgehalts ist eine photometrische Methode. Da Landpflanzen und damit auch *Arabidopsis* zwei verschiedene Chlorophylle besitzen, die auch ein leicht unterschiedliches Absorptionsmaximum haben (Chlorophyll a bei 665 nm und Chlorophyll b bei 650 nm), wird die Extinktion der hergestellten Rohextrakt-Lösung bei beiden Wellenlänge gemessen und anschließend verrechnet.

- Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff aufmörsern und je 100 mg in gefrorenem Zustand in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführen
- 1 ml Methanol dazugeben
- 30 Minuten bei 60°C inkubieren
- 10 Minuten bei RT und 13.000 rpm zentrifugieren
- Überstand in neues Eppendorfgefäß überführen
- Messung einer 1:20 Verdünnung am Photometer bei 650 und 665 nm (Extinktion muss < 0,5 sein)

Berechnung des Chlorophyllgehalts mit folgender Formel (Holden, 1965):

$$E(650) * 0,025 + E(665) * 0,005 = \text{mg Gesamtchlorophyll pro ml Meßlösung}$$

4.24 Stärkenachweis in *Arabidopsis*

4.24.1 Stärkefärbung von *Arabidopsis* Pflanzen

Zur Färbung von Stärke in Blättern von *Arabidopsis* Pflanzen wird die sogenannte Iodstärkereaktion benutzt. Stärke besteht im Wesentlichen aus Amylose (unverzweigte Glukoseketten) und Amylopektin (verzweigte Glukoseketten). Die unverzweigte Amylose bildet mit Iod einen blaufarbigem Komplex. Dieser kommt dadurch zustande, dass sich Polyiodidketten (I_3^- , I_5^- , I_7^- , I_9^-) in den kanalartigen Hohlraum der Amylose-Helix einlagern. Die Polyiodidketten entstehen, indem sich I_2 -Moleküle an ein in der Lösung vorhandenes Iod-Ion anlagern. In diesen Ketten sind alle sieben Valenzelektronen der Iod-Atome delokalisiert. Dadurch wird die Anregungsenergie der Valenzelektronen herabgesetzt, sodass sie im langwelligeren Bereich Licht absorbieren und blau erscheinen.

- Ganze *Arabidopsis* Rosetten werden geerntet und in Falcon-Röhrchen mit 80% Ethanol überführt
- 30 Minuten bei 75°C inkubieren und damit entfärben
- Überstand verwerfen
- Nochmal 80%igen Ethanol draufgeben und weitere 30 Minuten bei 75°C entfärben
- Lugol'sche Lösung (2 g/l I_2 und 10 g/l KI) draufgeben
- 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- Überstand verwerfen und zweimal mit H_2O spülen

4.24.2 Quantitative Messung des Stärkegehalts

Für die quantitative Bestimmung des Stärkegehalts wurde das StarchAssay Kit von Biovision verwendet. In diesem Assaysystem wird Stärke zu Glukose hydrolysiert und anschließend oxidiert. Dabei entsteht Fluoreszenz ($E_x/E_m = 535/587$ nm), die detektiert werden kann. Für die Bestimmung wurden 50 mg aufgemörsertes Pflanzenmaterial pro Probe verwendet und die lösliche Stärke nach dem Protokoll des Herstellers extrahiert. Gemessen wurden je zwei Replikate mit dem CytoFluor II Plate Reader.

4.25 Bestimmung des Aminosäuregehalts mittels HPLC

Die Bestimmung des Aminosäuregehalts erfolgt in einer Kooperation mit Klaus Harter und Bettina Stadelhofer (Universität Tübingen). Dafür wurde das aufgemörserte, in flüssigem Stickstoff eingefrorene, Pflanzenmaterial gefriergetrocknet (mit der Gefrierdrying in der Abteilung Tischner, bei -80°C ü.N.) und anschließend verschickt.

In Tübingen wurden dann die Aminosäuren folgendermaßen extrahiert:

- 5-10 mg gefriergetrocknetes Material nehmen
- 500 µl 80%iges Methanol zufügen
- 3 Minuten im Wasserbad kochen
- 3 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren
- Überstand auf Eis
- Pellet mit 500 µl 20%igem Methanol waschen
- 3 Minuten im Wasserbad kochen
- 3 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren
- Überstände vereinigen
- In der speedvac ca. 3h „trocknen“
- In 138 µl Verdünnungspuffer (0,7% Lithiumacetat und 0,6% LiCl) + 12 µl 2,5 mM Norleucin aufnehmen
- 3 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren
- durch 0,2 µm Minisart RC15 filtrieren (500 µl Eppendorfgefäße verwenden)

Die Messung erfolgte danach mittels eines HPLC-Verfahrens auf einer Kationen-Austausch-Säule mit Lithiumpuffer als Eluat (wie in Pilot et al. 2004).

4.26 Massenspektrometrische Bestimmung der Metabolitgehalte

Die Bestimmung der Metabolitgehalte erfolgte in einer Kooperation mit Wolfram Weckwerth (Universität Wien) mit Hilfe eines GC-MS Verfahrens (zur Übersicht: Halket et al., 2005; Goodacre et al., 2004; Weckwerth, 2003). Dafür wurden 100mg des aufgemörserten in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Pflanzenmaterials abgewogen und auf Trockeneis nach Wien gebracht. Dort erfolgte die Extraktion der Metabolite:

- Zugabe von 1 ml Extraktionsgemisch (Methanol, Chloroform, Wasser) zu allen Proben (auch der Leerprobe)
- Extrakt ca. 10 sek vortexen, 8 min auf Eis inkubieren und zwischendurch ab und zu nochmal vortexen
- Abzentrifugieren für 4 min. bei 14.000 g und 4°C
- Überstand in ein frisches Eppi überführen (Pellet enthält Zellreste und Proteine, Überstand Metabolite)
- Zugabe von 500 µl Millipore Wasser zur Trennung der polaren und unpolaren Phase
- Proben noch einmal vortexen
- Abzentrifugieren für 2 min. bei 14.000 g und 4°C

- Obere polare Phase auf zwei frische Eppendorfgefäße aufteilen (2 Aliquots)
- Internen Standard zufügen (25 µl Ribitol 0,02 g/l)
- In der SpeedVac ü.N. einrotieren und Eppendorfgefäße mit getrockneten Pellets bei -80°C lagern

Die extrahierten Metabolite werden anschließend in zwei Schritten derivatisiert. Im ersten Schritt findet eine Methoximierung statt. Durch diese wird die Komplexität der Zuckerisomere reduziert.

- 20 µl eines Methoximierungsgemisches (40 mg Methoxyaminhydrochlorid in 1 ml Pyridin) zur Probe gegeben (unterm Abzug arbeiten!)
- 90 min bei 30°C im Thermomixer inkubieren

Im zweiten Schritt der Derivatisierung findet eine Silylierung statt. Dabei werden Trimethylsilylgruppen (TMS Gruppen) an die Moleküle gehängt, damit diese thermisch stabiler und flüchtiger werden, was wichtig für die spätere Auftrennung in der GC-MS ist.

- 80 µl Silylierungsgemisch (1 ml MSTFA mit 30 µl Alkanmix) zugeben
- Mindestens 30 min bei 37°C auf Thermoschüttler inkubieren
- Abzentrifugieren für 2 min bei 14.000 g und RT
- 50 µl des Überstandes in GC-Vials mit Microeinsätzen überführen

Für die Bestimmung der Metabolite in den Proben wird ein „fullscan“ mit Hilfe der Gaschromatographie (GC) mit anschließender Massenspektrometrie (MS) in einem Triple Quadrupole MS durchgeführt.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Programme AMDIS und XCALIBUR.

4.27 Verwendete Computerprogramme

- MicrosoftOffice 2003; GraphPadPrism5 – Datenauswertung und -präsentation
- Genevestigator (Hruz et al., 2008) – vergleichende Expressionsanalyse von Genen in öffentlichen Transkriptomdatensätzen
- PCBAS 2.09 und TINA 2.0 (Raytest) – Bearbeitung von Northern Blots
- MyIQ (BioRad) – qPCR Auswertung
- AMDIS (NIST) und XCALIBUR (Thermo Scientific) – Auswertung der massenspektrometrischen Metabolitdaten
- VectorNTI 10.1.1 (Invitrogen) – Bearbeitung von DNA- und Proteinsequenzen
- Chromas1.55 (Technelysium, 1998) – Analyse von Sequenzierdaten
- Blast (Altschul et al., 1997; Schäffer et al., 2001) – Programme zur Suche von ähnlichen DNA- oder Proteinsequenzen

5 Ergebnisse

5.1 Eine verlängerte Dunkelphase als experimentelles Modellsystem für Studien der Energieverarmung in Pflanzen

Um Energie zu gewinnen, sind Pflanzen darauf angewiesen Photosynthese zu betreiben. Einen Teil ihrer Photosyntheseprodukte lagern sie während des Tages in Form von Stärke in den Chloroplasten ein. Während eines normalen Tag/Nacht-Zyklus erreicht die Stärkeeinlagerung ihr Maximum am Ende der Lichtphase (Abb. 5.1). Während der folgenden Nacht werden die angelegten Speicherreserven dann wieder verbraucht. Das pflanzliche System ist dabei so gut an den gegebenen Tag-/Nachtrhythmus angepasst, dass gegen Ende der Nacht die gesamten Stärkevorräte aufgebraucht sind (Abb. 5.1; Usadel et al., 2008). Verlängert man nun die Dunkelphase, so führt dies unmittelbar zu einem starken Energiemangel. Dieser synchrone Entzug der Nährstoffe während der verlängerten Nacht ist deshalb eine einfache Methode, um die Auswirkungen von Energiemangelbedingungen auf den pflanzlichen Metabolismus zu untersuchen (Lin und Wu, 2004).

Energieverarmung während der verlängerten Nacht führt letztendlich zur Ausprägung einer dunkelinduzierten Seneszenz. Während dieser kommt es zu schwerwiegenden

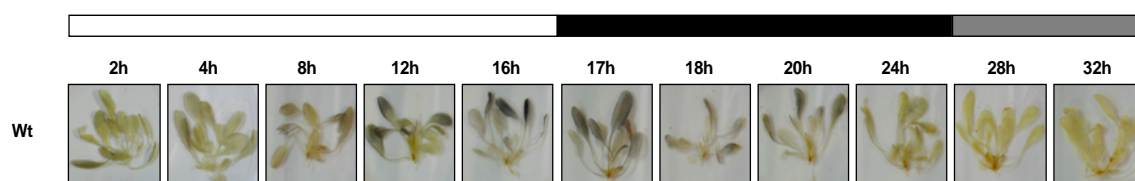


Abb. 5.1: Stärkefärbung von Arabidopsis Pflanzen während Tag, Nacht und verlängerter Dunkelphase Wildtyp Pflanzen wurden 3-4 Wochen im Langtag angezogen. Für die Stärkefärbung wurde zu den angegebenen Zeitpunkten eine Rosette oberhalb der Erde abgeschnitten. Die Pflanzen wurden anschließend mit Ethanol entfärbt und die Stärke mit Iod-Iodkalium-Lösung sichtbar gemacht. weißer Balken: normale Lichtphase (16h), schwarzer Balken: normale Nacht (8h), grauer Balken: verlängerte Nacht

Änderungen des Primärmetabolismus, unter anderem dem Abbau von Proteinen, Aminosäuren, Nukleinsäuren, der Hydrolyse von Polysacchariden und Oxidation von Fettsäuren (Smart, 1994).

Um die Versuchsbedingungen zu charakterisieren, wurden durch Seneszenz induzierte Markergene (SAG = SENESCENCE ASSOCIATED GENE) mit Hilfe von quantitativer Real-Time PCR (qPCR) untersucht. Unterschiedliche Formen der Seneszenz, wie die natürliche Seneszenz oder dunkelinduzierte Seneszenz, führen dabei zur Expression unterschiedlicher, aber überlappender Sets dieser SAGs. Während der dunkelinduzierte Seneszenz wird z.B. *SAG103* transkriptionell aktiviert (Van der Graaff et al., 2006).

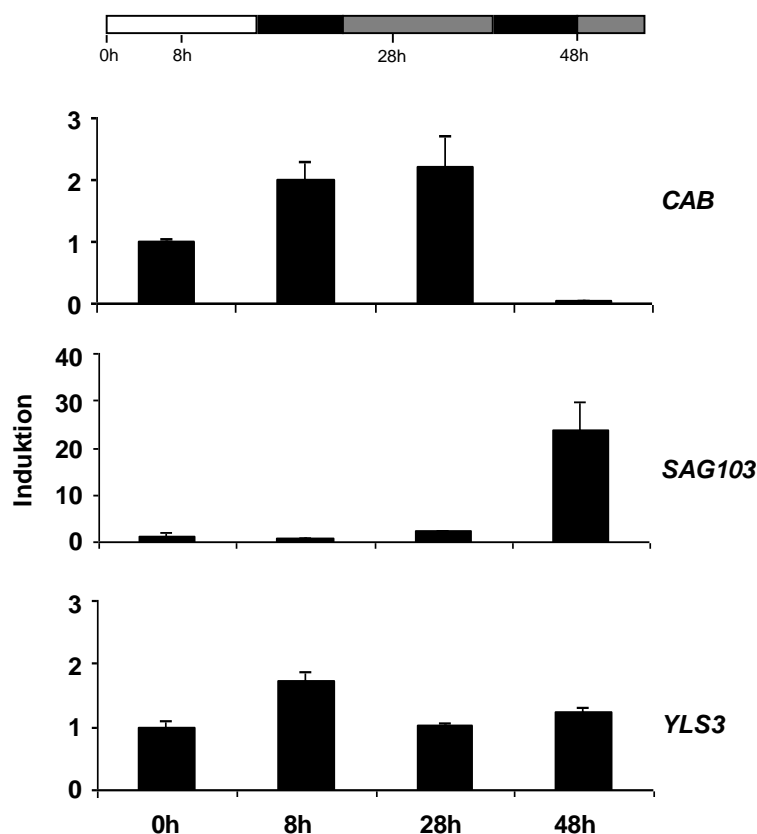


Abb. 5.2: Expression typischer Markergene für licht-/dunkelheitsabhängige Prozesse und natürliche Seneszenz während der verlängerten Nacht

Wildtyp Pflanzen wurden 3-4 Wochen im Langtag angezogen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils 8-10 Pflanzen geerntet und zusammen aufgearbeitet. Mit Hilfe der quantitativen Real-Time PCR (qPCR) wurden die oben angegebenen Gene untersucht. Dargestellt sind die relativen Werte im Vergleich zur Expression nach 0 Stunden Dunkelheit von je zwei Replikaten nach Abgleich mit dem Haushaltsgen *Ubiquitin*. Weißer Balken: normale Lichtphase (16h), schwarzer Balken: normale Nacht (8h), grauer Balken: verlängerte Nacht

Bereits nach 4 Stunden der verlängerten Nacht kommt es unter unseren Versuchsbedingungen zu einer leichten Induktion von *SAG103*, nach weiteren 12 Stunden in Dunkelheit ist die Induktion im Vergleich zum 0h-Wert bereits auf das 25fache gestiegen (Abb. 5.2). Natürliche Seneszenz induziert dieses Gen dagegen nicht. *YLS3* (*YELLOW LEAF SPECIFIC 3*), ein Markergen für die natürliche Seneszenz, wird dagegen unter den hier gewählten Versuchsbedingungen der verlängerten Dunkelphase nicht induziert. Die Transkription des lichtinduzierten Markergens *CAB* (*CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN*) wird nach 16 Stunden verlängerter Nacht stark reprimiert.

Dass innerhalb der ersten 16 Stunden der Dunkelinduktion bereits typische dunkelinduzierte Gene wie *SAG103* transkriptionell angeschaltet und typische lichtinduzierte Gene wie *CAB* transkriptionell herunter reguliert werden, zeigt, dass der Zeitraum zwischen 4 und 16 Stunden der verlängerten Nacht bereits zu weitreichenden Änderungen des Metabolismus führt.

5.2 Viele bZIP Transkriptionsfaktoren werden während der verlängerten Nacht transkriptionell induziert

Die Inkubation der Pflanzen in der verlängerten Nacht führt zu einer starken Veränderung der Genexpression, die dann letztendlich zu der Anpassung des pflanzlichen Metabolismus und zur Aktivierung typischer Prozesse der dunkelinduzierten Seneszenz, wie z.B. dem Abbau von Proteinen, Aminosäuren, Nukleinsäuren, der Hydrolyse von Polysacchariden und Oxidation von Fettsäuren führt. Einen großen Anteil daran haben die Transkriptionsfaktoren. Sie führen zu einer Aktivierung oder Reprimierung ihrer Zielgene und tragen dadurch dazu bei, dass die Pflanze schnell auf diese Energiemangelbedingungen reagieren kann. Eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren sind die basischen Leucinzipper (bZIPs). Viele von ihnen werden unter Energiemangelbedingungen während der verlängerten Nacht transkriptionell aktiviert, wie Analysen mit öffentlichen Datenbanken wie Genevestigator (Hruz et al., 2008) ergaben (Abb. 5.3).

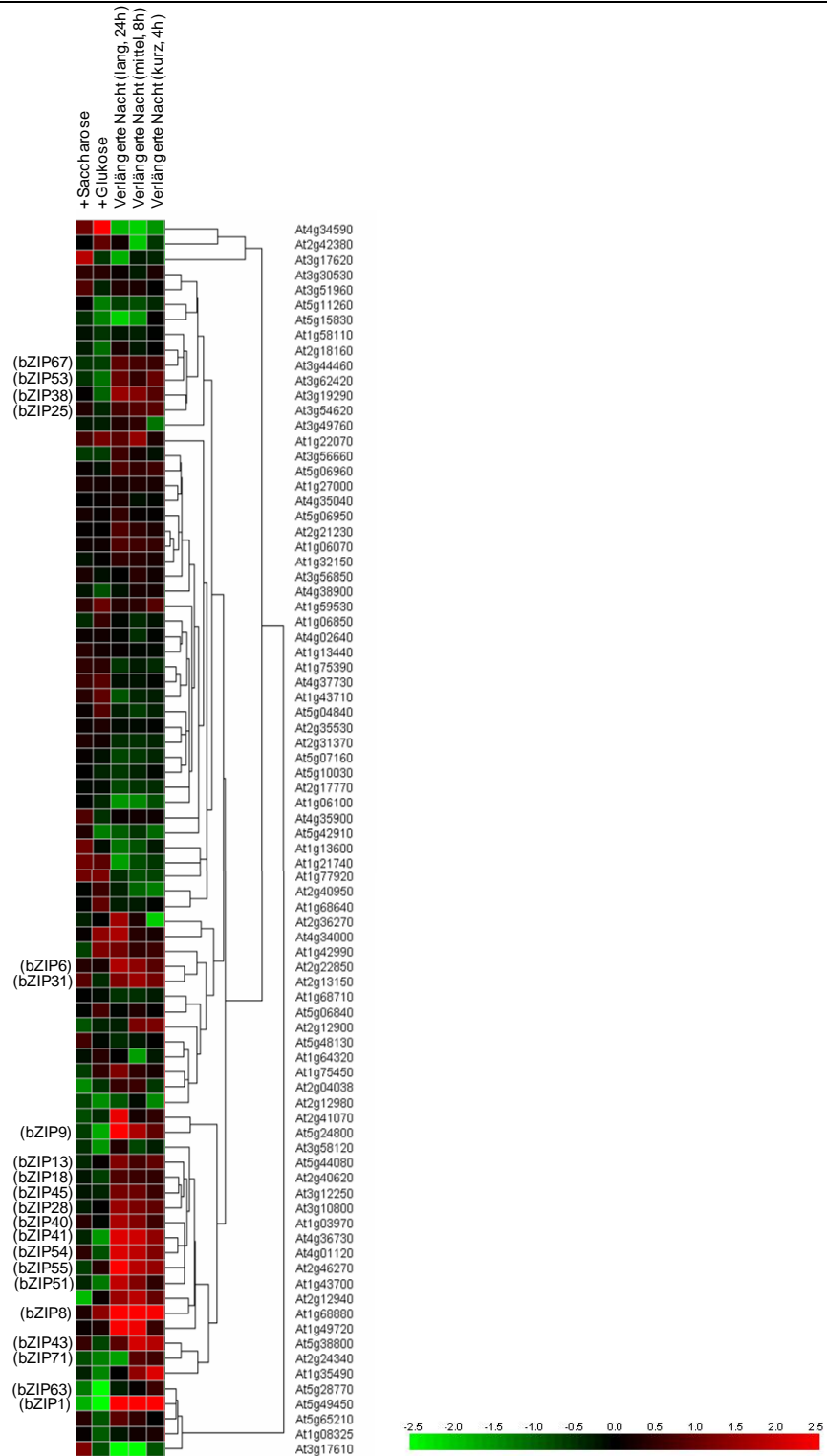


Abb. 5.3: Genevestigator Analyse (Hruz et al., 2008) der Expression aller bZIP Transkriptionsfaktoren während der verlängerten Nacht

Behandlung mit Glukose oder Saccharose sowie eine verlängerte Nacht führen zur Aktivierung (rot) bzw. Reprimierung (grün) der Transkription einer Reihe von bZIP TF. Dargestellt sind die relativen Expressionswerte unter den angegebenen Bedingungen im Vergleich zur Kontrolle, sowie die At-Nummern aller bZIP TF. Für einige ausgewählte TF wird auch der Name in der bZIP Nomenklatur (nach Jakoby et al., 2001) angegeben.

Viele der durch Dunkelheit transkriptionell aktivierten bZIPs werden durch Zugabe von Zuckern reprimiert. Dies zeigt, dass die Energiemangelbedingungen während der verlängerten Nacht zur Aktivierung dieser Gene führen und Zucker diesen Prozess wieder reprimieren kann.

5.3 *AtbZIP1* und *AtbZIP53* werden während der verlängerten Nacht transkriptionell aktiviert

Einer der während der verlängerten Nacht am stärksten aktivierten bZIP Transkriptionsfaktoren ist *AtbZIP1* (At5g49450, Abb. 5.3), ein Mitglied der Gruppe S1 der bZIP Transkriptionsfaktoren (Ehlert et al., 2006). Die Expression von *AtbZIP1* wird auch sehr stark durch Zucker reprimiert. Eine qPCR Analyse der Transkription dieser Untergruppe der bZIPs während mehrerer Tage in Dunkelheit bestätigte die Genevestigator Analyse. Hier zeigt *AtbZIP1* eine sehr starke 30fache Aktivierung während der Dunkelinduktion (Abb. 5.4). Der nächste Verwandte von *AtbZIP1*,

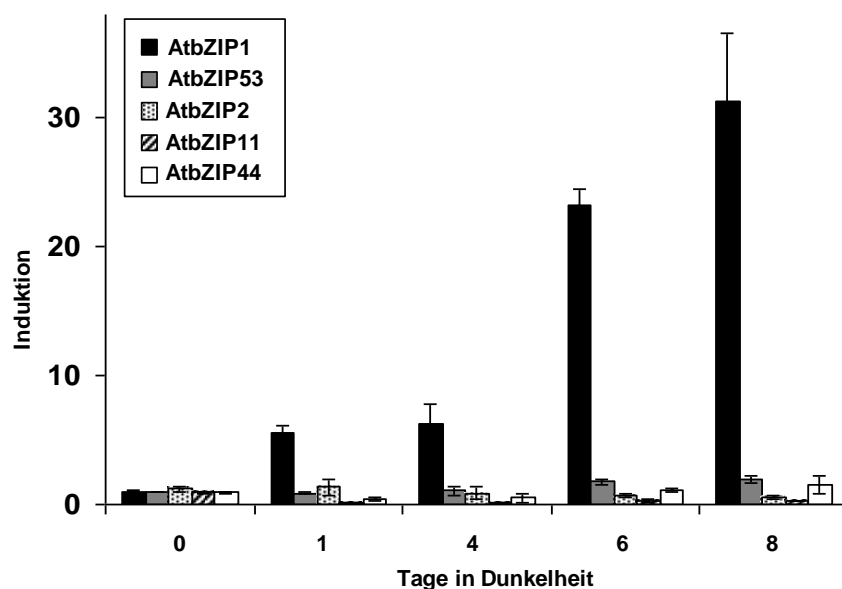


Abb. 5.4: Analyse der Expression der Gruppe S1 bZIP Transkriptionsfaktoren während der verlängerten Nacht

Wildtyp Pflanzen wurden 3-4 Wochen im Langtag angezogen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils 8-10 Pflanzen geerntet und zusammen aufgearbeitet. Mit Hilfe der qPCR wurden die oben angegebenen Gene untersucht. Angegeben sind die relativen Werte im Vergleich zur Expression nach 0 Tagen Dunkelheit von je zwei Replikaten nach Abgleich mit dem Haushaltsgen *Ubiquitin*. Der Versuch wurde mehrmals mit ähnlichem Ergebnis wiederholt.

AtbZIP53, zeigt ebenfalls eine Induktion, die allerdings sehr viel schwächer ist als die von *AtbZIP1*. *AtbZIP2*, *AtbZIP11* und *AtbZIP44* bilden innerhalb der S1 Transkriptionsfaktoren eine eigene Untergruppe. Im Gegensatz zu *AtbZIP1* und *AtbZIP53* werden sie durch Energiemangel nicht transkriptionell aktiviert. Die Transkription von *AtbZIP2* wird kaum reguliert, *AtbZIP44* zeigt nur eine sehr schwache Induktion. Die Transkription von *AtbZIP11* wird durch Energiemangel nach Dunkelheit sogar reprimiert (Abb. 5.4). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden *AtbZIP1* und *AtbZIP53* als mögliche Kandidaten für die transkriptionelle Regulation der Prozesse während der Energieverarmung in der verlängerten Nacht ausgewählt.

Um die Rolle von *AtbZIP1* und *AtbZIP53* während der verlängerten Nacht nun näher zu untersuchen wurde die Expression der beiden Gene in einem detaillierteren Experiment untersucht. Dabei wird deutlich, dass die Expression von *AtbZIP1* bereits nach 4 Stunden der verlängerten Nacht (Abb. 5.5; 28h Zeitpunkt des Gesamt-Experiments)

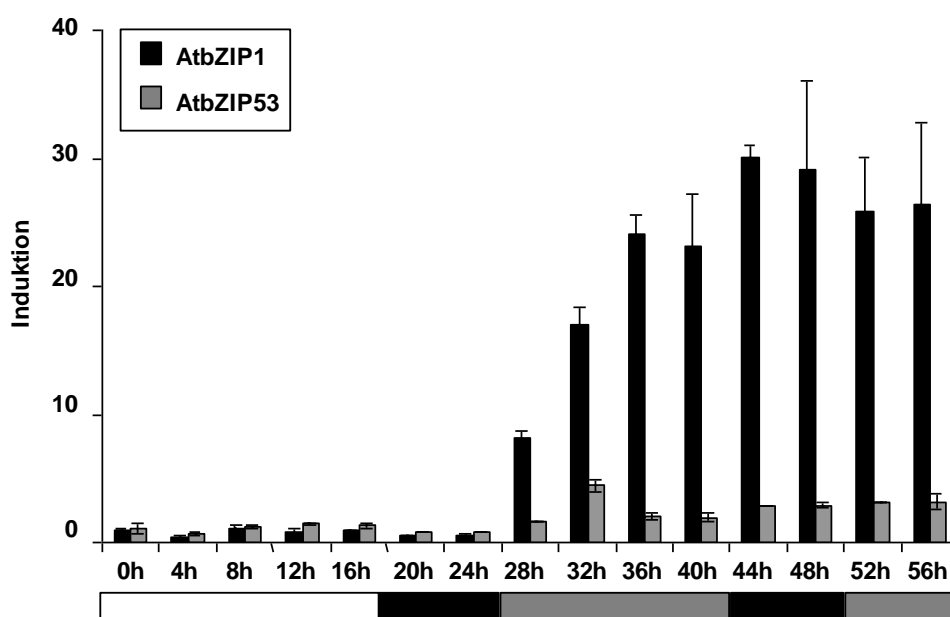


Abb. 5.5: qPCR-Analyse der Expression von *AtbZIP1* und *AtbZIP53* während der verlängerten Nacht Wildtyp Pflanzen wurden 3-4 Wochen im Langtag angezogen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils 8-10 Pflanzen geerntet und zusammen aufgearbeitet. Mit Hilfe der qPCR wurden die oben angegebenen Gene untersucht. Angegeben sind die relativen Werte im Vergleich zur Expression nach 0 Tagen Dunkelheit von je zwei Replikaten nach Abgleich mit dem Haushaltsgen *Ubiquitin*. Der Versuch wurde mehrmals mit ähnlichem Ergebnis wiederholt. weißer Balken: normale Lichtphase (16h), schwarzer Balken: normale Nacht (8h), grauer Balken: verlängerte Nacht

stark angeschaltet wird und ihr Maximum nach etwa 20 Stunden (44h Zeitpunkt) mit einer 30fachen Induktion findet. *AtbZIP53* zeigt wie im letzten Experiment eine deutlich schwächere aber reproduzierbare 3-4 fache Induktion.

Auch die Repression der Transkription von *AtbZIP1* durch Zucker, die in der Genevestigator Analyse gezeigt wurde, konnte mit Hilfe einer Northern Analyse reproduziert werden (Abb. 5.6; Weltmeier 2005). Nach einem Tag in Dunkelheit sieht man bereits die starke Akkumulation des *AtbZIP1* Transkripts (0h). Lässt man die in Hydroponik gewachsenen Pflanzen weitere 2 Tage in Dunkelheit und gibt zusätzlich Glukose oder Saccharose in das Medium, so lässt sich die dunkelinduzierte *AtbZIP1* Expression reprimieren. Zusätzliche Gabe von Orthomethyl-Glukose (3-OMG), die von der Pflanze zwar aufgenommen, aber nicht metabolisiert werden kann, führt dagegen zu keiner Repression der *AtbZIP1* Transkription. Die Expression von *AtbZIP53* unter diesen Bedingungen folgt dem gleichen Muster, ist aber etwas weniger stark ausgeprägt (Daten hier nicht gezeigt, siehe Weltmeier 2005). Dieses Experiment zeigt, dass nicht die Abwesenheit des Lichts, sondern der unter den Bedingungen der verlängerten Nacht fehlende Zucker zur transkriptionellen Aktivierung von *AtbZIP1* führt. Die zusätzliche Gabe von Zuckern kann dagegen den Effekt der Dunkelheit auf die Expression von *AtbZIP1* aufheben.

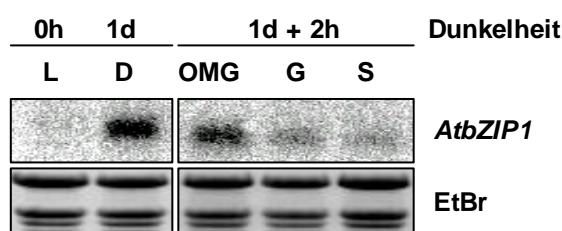


Abb. 5.6: Die dunkelinduzierte Transkription von *AtbZIP1* wird durch Zucker reprimiert
Die Pflanzen wurden auf Netzen in hydroponischer Kultur (ohne Zucker) im Kurztag angezogen. Drei Stunden nach Beginn der Lichtphase wurde die erste Probe (L) geerntet, danach wurden die Pflanzen für 24 Stunden dunkel gestellt. Nach dem Ernten einer weiteren Probe (D, 0h) wurden die Pflanzen mit Netz in Gefäße mit Hydroponikmedium mit 167mM 3-Orthomethyl-Glukose (OMG), Glukose (G) oder Saccharose (S) transferiert und dabei weiter im Dunkeln gehalten. Nach 2 Stunden wurden die Pflanzen mit Wurzeln geerntet und die RNA mit Hilfe einer Northern Analyse untersucht. Der Versuch wurde von Fridtjof Weltmeier durchgeführt. EtBr: Ethidiumbromid-Färbung der verwendeten RNA-Gele zum Nachweis der gleichmäßigen Beladung.

5.4 Die Überexpression von *AtbZIP1* bzw. *AtbZIP53* führt zu einem verfrühten Eintritt in die dunkelinduzierte Seneszenz

Um die Funktion von *AtbZIP1* und *AtbZIP53* in der dunkelinduzierten Energieverarmung während der verlängerten Nacht weiter untersuchen zu können, wurden verschiedene Überexpressions- und T-DNA-Insertions-Linien der beiden Transkriptionsfaktoren hergestellt (Weltmeier, 2005).

Während *Pro35S:AtbZIP1* Überexpremierer unter normalen Lichtbedingungen keinen sichtbaren Phänotyp haben, zeigen *Pro35S:AtbZIP53* Überexpremierer einen starken Zwergwuchs (Alonso et al., 2009). Stellt man allerdings die Überexpremierer für einige

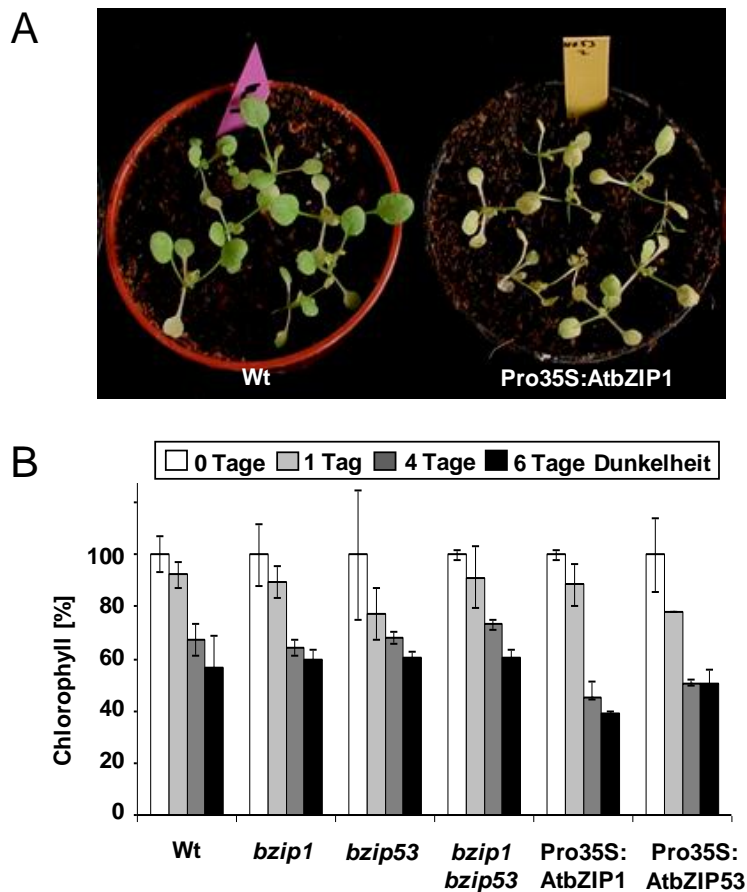


Abb. 5.7: *Pro35S:AtbZIP1* und *Pro35S:AtbZIP53* Pflanzen zeigen einen verfrühten Eintritt in die dunkelinduzierte Seneszenz

Pflanzen wurden 2-3 Wochen im Langtag angezogen und anschließend für 6 Tage dunkel gestellt. **A:** Phänotyp der *Pro35S:AtbZIP1* Pflanzen im Vergleich zum WT nach 6 Tagen Dunkelheit. **B:** Quantifizierung des Chlorophyllgehalts der Überexpremierer und Mutanten im Vergleich zum Wt nach 0, 1, 4 und 6 Tagen Dunkelinduktion. Der Null-Tage-Wert jeder Linie wurde auf 100% gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei unabhängigen Messungen. Der Versuch wurde mehrmals mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt.

Tage ins Dunkel, so zeigen beide einen verfrühten Seneszenzphänotyp, der sich durch ein schnelles Gelbfärben der Blätter bemerkbar macht. Besonders ausgeprägt ist dieser Phänotyp bei den Pro35S:AtbZIP1 Überexpremierern (Abb. 5.7 A).

Zur Quantifizierung des Phänotyps wurde der Chlorophyllgehalt in diesen Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp und auch zu den Mutanten von AtbZIP1 und AtbZIP53 nach null bis sechs Tagen in Dunkelheit gemessen (Abb. 5.7 B). Während weder in den Einzelmutanten *atbzip1* und *atbzip53* noch in der Doppelmutante *atbzip1 atbzip53* ein Unterschied zum Wildtyp zu erkennen ist, zeigen beide Überexpremierer einen im Vergleich zum Wildtyp um ca. 20 Prozent reduzierten Chlorophyllgehalt nach vier und sechs Tagen Dunkelheit. Diese Daten sprechen dafür, dass die Überexpression von AtbZIP1 und AtbZIP53 zu einer Aktivierung physiologischer Prozesse führt, die im Zusammenhang mit der dunkelinduzierten Energieverarmung während der verlängerten Nacht stehen.

5.5 Die Überexpression von AtbZIP1 bzw. AtbZIP53 führt zu einer verstärkten Expression von Genen des Primärstoffwechsels

Um herauszufinden, welche physiologischen Prozesse durch AtbZIP1 und AtbZIP53 beeinflusst werden und so möglicherweise zu einem verfrühten Eintritt der Überexpremierer in die dunkelinduzierte Seneszenz führen, können die vorhandenen Mutanten und Überexpressionslinien genutzt werden, um mögliche Zielgene mit Hilfe von genomweiten Transkriptomanalysen (Micro-Arrays) zu finden. In einem ersten Ansatz wurde die Expression von Pro35S:AtbZIP53 Pflanzen mit dem Wildtyp verglichen, in einem zweiten Ansatz dann die Expression von Pro35S:AtbZIP1 Pflanzen mit der *atbzip1 atbzip53* Doppelmutante und dem Wildtyp nach zwei Tagen in Dunkelheit (Weltmeier 2005). Viele der regulierten Gene spielen eine wichtige Rolle in einem primären Stoffwechselweg (eine Auswahl der Gene findet sich in Tabelle 5.1). So finden sich z.B. Gene aus dem Aminosäurestoffwechsel, dem Lipid- und auch dem Kohlenhydratmetabolismus, die in den Überexpressionspflanzen verstärkt expremiert werden. In der Doppelmutante wird die Expression der entsprechenden Gene dagegen meist herunter reguliert.

Tabelle 5.1: In den Überexprimierern und der Doppelmutante regulierte Gene aus Lipid-, Kohlenhydrat- und Aminosäuremetabolismus

Gegeben ist die logarithmische Signalstärke (log Ratio) aus den Quotienten von Überexprimierern bzw. Mutante und Wildtyp für ausgewählte Gene der Transkriptomanalysen (Weltmeier, 2005). Der Schwellenwert liegt bei einem p-Wert von 0,05 und einer log Ratio von mindestens 1,3 für die Überexprimierer. Die Unterschiede in der Mutante sind meist geringer. Positive Zahlen: verstärkte Expression im Vergleich zum Wt, negative Zahlen: Gene sind im Vergleich zum Wt herunter reguliert, freie Felder: Gene wurden im Vergleich zum Wt nicht signifikant unterschiedlich reguliert.

Gen	AGI code	log Ratio Pro35S: AtbZIP53 /WT	log Ratio Pro35S: AtbZIP1 /WT	log Ratio <i>atbzip1atbzip53</i> /WT
Lipidmetabolismus				
Lipoxygenase 1 (LOX1)	At1g55020	1,56	3,3	-0,7
Lipoxygenase 2 (LOX2)	At3g45140	-	2,0	-1,1
Lipase EXL6	At1g73610	-	2,2	-0,1
Esterase/Lipase/Thioesterase	At3g26840	-	2,1	-0,8
Lipase	At5g24200	1,75	-	-
Caleosin related	At1g70670	-	2,7	-0,5
Oleosin	At3g01570	1,7	-	-
Kohlenhydratmetabolismus				
β-Amylase 5 (BAM5)	At4g15210	-	4,4	2,5
Trehalose-6-Phosphat-Phosphatase (TPPG)	At4g22590	2,69	2,7	-1,0
Trehalose-6-Phosphat-Phosphatase (TPPD)	At1g35910	1,82	-	-
Aminosäurestoffwechsel				
Prolin Dehydrogenase (PRODH)	At3g30775	2,28	-	-
Prolin Dehydrogenase2 (PRODH2)	At5g38710	1,37	-	-
Branched Chain Aminoacid Transaminase (BCAT2)	At1g10070	1,63	-	-
Asparagin Synthetase (ASN1)	At3g47340	2,14	-	-
Glutamat Dehydrogenase (GDH2)	At5g07440	-	1,6	-0,36
Aspartat Aminotransferase (ASP3)	At5g11520	-	2,3	-0,19
Glutamin Synthase (GLNS)	At5g37600	-	2,3	-0,8
Asparaginase (ANS)	At3g16150	-	2,7	-0,8

5.5.1 Gene des Lipidstoffwechsels werden durch AtbZIP1 und AtbZIP53 reguliert

Unter den Genen des Lipidstoffwechsels, die in den Pro35S:AtbZIP1 und Pro35S:AtbZIP53 Pflanzen verstärkt expremiert werden, finden sich eine Reihe von Lipasen. Lipasen sind Enzyme, die von Lipiden die freien Fettsäuren abspalten. Dieser Degradationsprozess findet in der natürlichen Blattseneszenz im Zuge der Mobilisierung von Nährstoffen und deren Recycling für noch wachsende Pflanzenteile statt (Nooden et al., 1997; Buchanan-Wollaston, 1997; Quirino et al., 2000). Die verstärkte Expression dieser Gene in den Überexpremierern von AtbZIP1 und 53 passt also gut zu dem verfrühten Einsetzten der dunkelinduzierten Seneszenz in diesen Pflanzen. Ob die verstärkte Expression der Lipasen aber die Ursache des Phänotyps ist, oder ob das verfrühte Einsetzten der Seneszenz zur verfrühten und damit zum Zeitpunkt der Probennahme stärkeren Expression der Lipasen führt ist noch zu klären.

Die durch die Lipaseaktivität frei werdenden Fettsäuren wie z.B. Linolsäure können als Ausgangsmaterial für die Synthese von Jasmonsäure (JA) durch sogenannte 13-Lipoxygenasen genutzt werden (Abb. 5.8; Creelman und Mullet, 1997). In *Arabidopsis* existieren 6 verschiedene Lipoxygenasen (Feussner und Wasternack, 2002; Stenzel et al., 2003). Vier von ihnen, darunter auch die in den Arrays der Pro35S:AtbZIP1 Pflanzen verstärkt expremierte *LOX2*, gehören zu diesen 13-Lipoxygenasen und können damit den ersten Schritt zur Biosynthese von JA katalysieren.

Die Rolle der beiden 9-Lipoxygenasen, zu denen die *LOX1* gehört, die sowohl in den Arrays der Pro35S:AtbZIP1 als auch der Pro35S:AtbZIP53 Pflanzen stark expremiert wird, ist wesentlich weniger gut untersucht. Metabolite dieser Lipoxygenasen spielen möglicherweise eine Rolle in Wurzelentwicklung, Pathogen-Abwehr und Zelltod (Abb. 5.8; Melan et al., 1993; Velosillo et al., 2007).

Die verstärkte Expression der beiden Lipoxygenasen *LOX1* und *LOX2* in den Pro35S:AtbZIP1 Pflanzen, die in den Array Analysen entdeckt wurde, konnte mittels Northern Analyse reproduziert werden (Abb. 5.9).

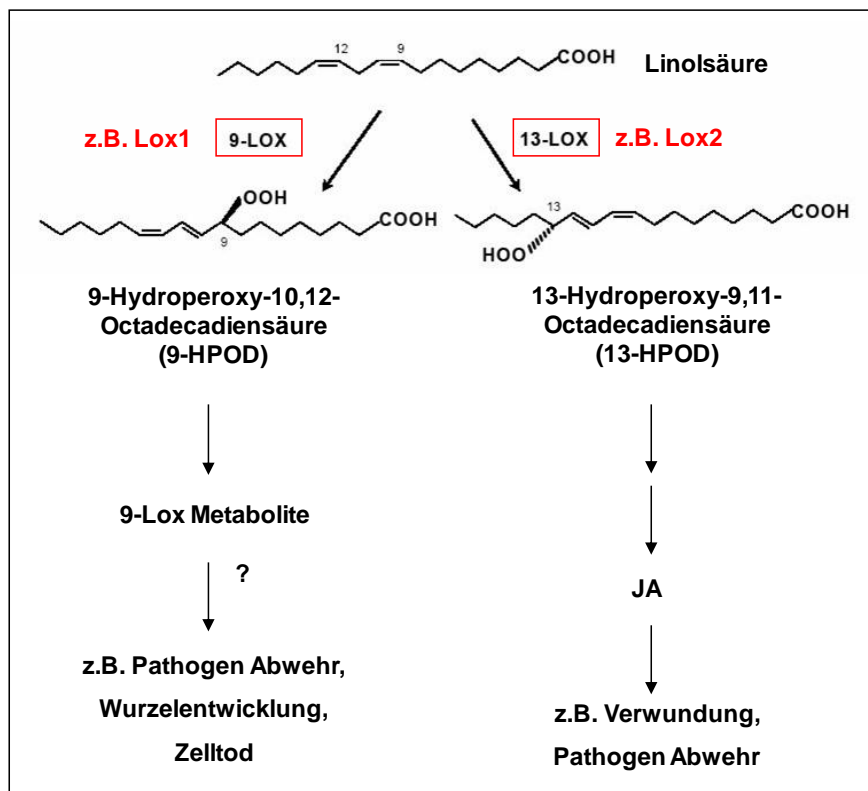


Abb. 5.8: Schema des Abbaus der Linolsäure durch 9- und 13-Lipoxygenasen

Linolsäure wird durch 9-Lipoxygenasen wie die LOX1 zu 9-HPOD abgebaut. Die daraus entstehenden Metabolite haben eine mögliche Funktion in Pathogen Abwehr, Wurzelentwicklung und Zelltod (Melan et al., 1993, Velosillo et al., 2007). Der Abbau der Linolsäure durch 13-Lipoxygenasen wie der LOX2 führt zur Bildung von 13-HPOD, das weiter zu Jasmonsäure (JA) umgewandelt werden kann. Dieses spielt u.a. eine Rolle in Pathogen Abwehr und Verwundung (Hildebrand et al., 1998; Schaller, 2001).

Die beiden Lipoxygenasen zeigen hierbei gegenläufige Expressionsmuster während der dunkelinduzierten Seneszenz. Während die *LOX1* im Wildtyp erst nach mehreren Tagen Dunkelheit deutlich transkriptionell aktiviert wird, wird die *LOX2* bereits unter normalen Langtagbedingungen expremiert und bei beginnender Dunkelheit herunter reguliert. In der *atbzip1* Mutante konnten keine signifikanten Änderungen der Expressionsstärke im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden.

Eine *lox1* Mutante wurde von E. Hornung und I. Feussner (Uni Göttingen, Abt. Biochemie der Pflanze) zur Verfügung gestellt. In dieser Mutante ist die dunkelinduzierte *LOX1* Induktion deutlich unterdrückt (Abb. 5.9).

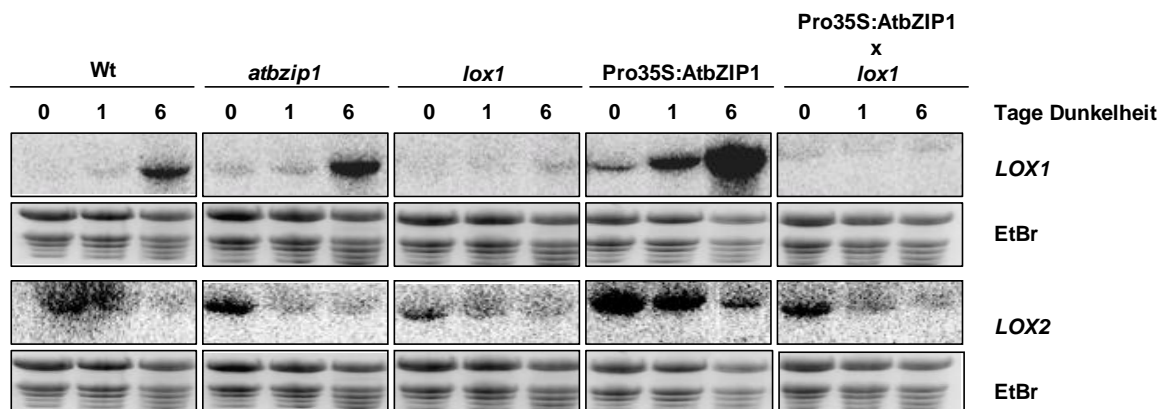


Abb. 5.9: Die Überexpression von *AtbZIP1* führt zu einer verstärkten Expression von *LOX1* und *2*. Pflanzen wurden 3-4 Wochen im Langtag angezogen. Anschließend wurden die Pflanzen dunkel gestellt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils 8-10 Pflanzen pro Linie geerntet und zusammen aufgearbeitet. Daraus wurde RNA gewonnen und im Northern mit Sonden für die oben angegebenen Gene untersucht. EtBr: Ethidiumbromid-Färbung der verwendeten RNA-Gele zum Nachweis der gleichmäßigen Beladung.

Auch in der Kreuzung aus Pro35S:AtbZIP1 Linie und *lox1* Mutante ist keinerlei *LOX1*-Expression mehr zu erkennen. Interessanterweise ist in diesen Pflanzen im Vergleich zu den Pro35S:AtbZIP1 Pflanzen auch die Expression der *LOX2* reduziert, obwohl die Expression der *LOX2* durch den Knock-Out der *LOX1* eigentlich nicht beeinträchtigt werden sollte. Möglicherweise existieren hier bisher nicht bekannte Regulationsmechanismen zwischen diesen beiden Lipoxygenasen.

Die anderen vier Lipoxygenasen aus *Arabidopsis* werden insgesamt sehr viel schwächer expremiert als *LOX1* und *LOX2*. Während *LOX3* und *LOX4* im Northern gar kein Signal lieferten, zeigte die *LOX5* ein ähnliches, wenn auch sehr viel schwächeres Expressionsmuster wie die *LOX1*, während die *LOX6* während der Dunkelinduktion ähnlich wie die *LOX2* reguliert wird (Anhang Abb. 8.1).

Phänotypisch zeigt die *lox1* Mutante keine sichtbaren Unterschiede zum Wildtyp. Auch während der verlängerten Nacht verhält sie sich wie der Wildtyp. Bemerkenswert ist allerdings der Phänotyp der Kreuzung aus AtbZIP1 Überexpremierer und *lox1* Mutante. Wenn die Pro35S:AtbZIP1 Pflanzen nach 6 Tagen Dunkelheit bereits eine deutliche Gelbfärbung der Blätter zeigen, sind die Pro35S:AtbZIP1 x *lox1* Pflanzen noch genauso grün wie Wildtyp oder *lox1* Mutante (Abb. 5.10).

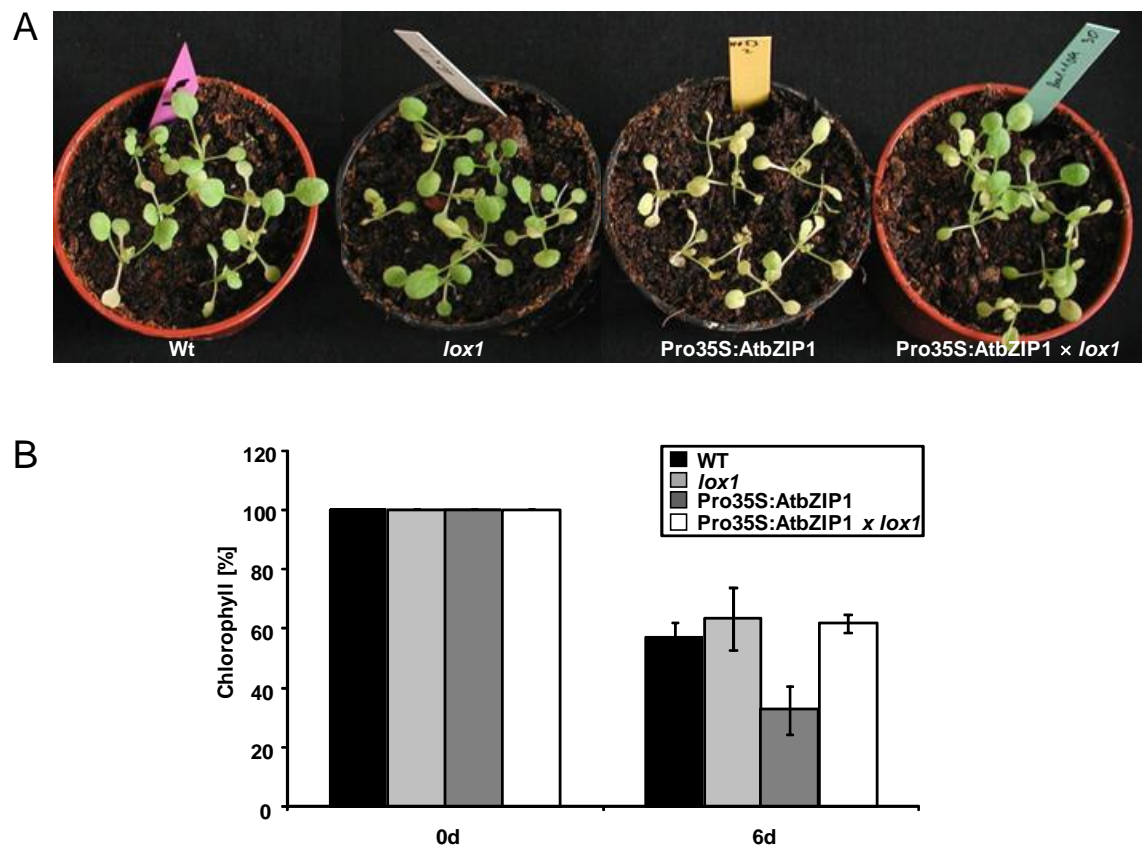


Abb. 5.10: Der dunkelinduzierte Seneszenz-Phänotyp der Pro35S:AtbZIP1 Überexpressionspflanzen ist abhängig von der Expression der LOX1

Pflanzen wurden 2-3 Wochen im Langtag angezogen und anschließend für 6 Tage dunkel gestellt. A: Phänotyp der Pro35S:AtbZIP1 Pflanzen im Vergleich zu Wildtyp, *lox1* Mutante und Pro35S:AtbZIP1 x *lox1* nach 6 Tagen Dunkelheit

B: Quantifizierung des Chlorophyllgehalts der Überexpressierer und Mutanten im Vergleich zum Wt nach 0 und 6 Tagen Dunkelinduktion. Der Null-Tage-Wert jeder Linie wurde auf 100% gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei unabhängigen Messungen. Der Versuch wurde mehrmals mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt.

Diese Beobachtung konnte auch mit Hilfe einer Chlorophyllmessung quantifiziert werden. Während die AtbZIP1 Überexpressierer nach 6 Tagen Dunkelheit nur noch 30% ihres anfänglichen Chlorophyllgehalts aufweisen, liegen Wildtyp, *lox1* und die Kreuzung aus Pro35S:AtbZIP1 und *lox1* noch bei etwa 60% des ursprünglichen Chlorophylls.

5.5.2 Der Kohlenhydratmetabolismus wird durch AtbZIP1 und AtbZIP53 beeinflusst

Nicht nur der Lipidstoffwechsel, auch Gene des Kohlenhydrathaushalts der Pflanze werden durch die Überexpression von AtbZIP1 und/oder AtbZIP53 beeinflusst. Zucker liefern der Zelle Kohlenstoff und Energie und werden während der Lichtphase durch die Photosynthese gebildet. Teile der so gewonnenen Energie werden als Reserve für die Nacht unter anderem in Form von Stärke in den Chloroplasten gespeichert. Mit Hilfe einer Iod-Iodkalium-Färbung kann man diese Stärke sichtbar machen (Abb. 5.11). Eine große Stärkemenge korreliert dabei mit einer intensiven Blaufärbung. Parallel zur Iod-Iodkalium-Färbung wurde auch ein quantitativer Stärketest mit Hilfe des Biovision StarchAssay Kits durchgeführt, in dem die Menge der löslichen Stärke enzymatisch bestimmt wurde (Abb. 5.12).

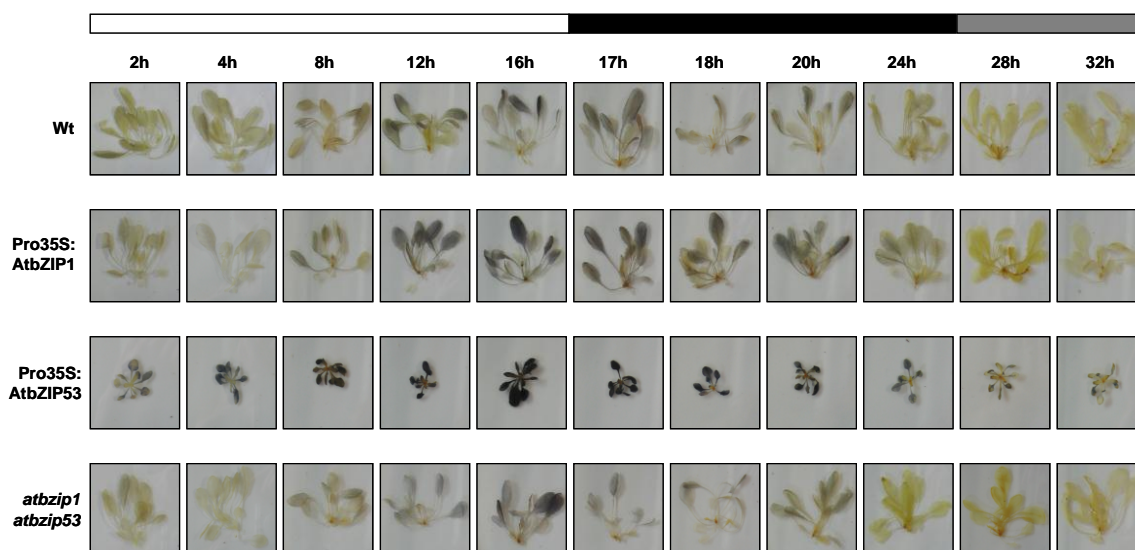


Abb. 5.11: AtbZIP53 Überexpresmierer akkumulieren große Mengen Stärke

Pflanzen wurden 3-4 Wochen im Langtag angezogen. Für die Stärkefärbung wurde zu den angegebenen Zeitpunkten eine Rosette oberhalb der Erde abgeschnitten. Die Pflanzen wurden anschließend mit Ethanol entfärbt und die Stärke mit Iod-Iodkalium-Lösung sichtbar gemacht. weißer Balken: normale Lichtphase (16h), schwarzer Balken: normale Nacht (8h), grauer Balken: verlängerte Nacht

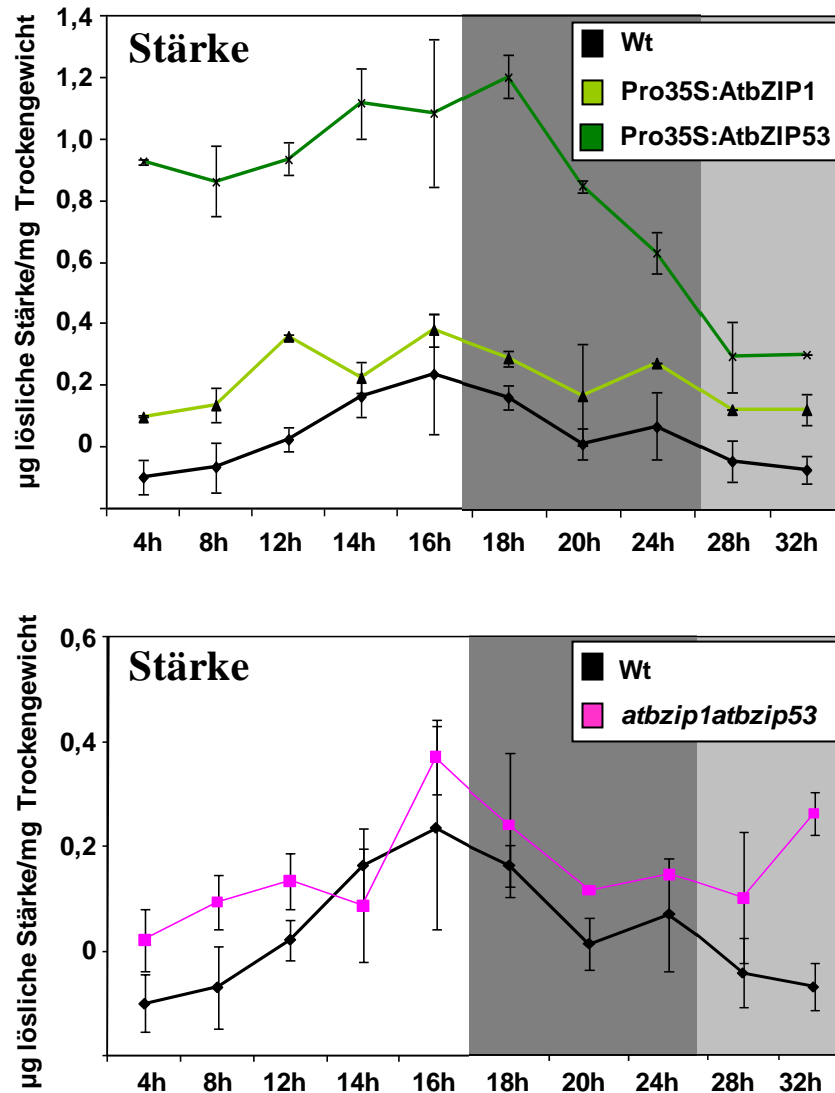


Abb. 5.12: Quantifizierung des Stärkegehaltes von *AtbZIP1* und *AtbZIP53* Überexprimierern sowie der *atbzip1 atbzip53* Doppelmutante

Die Pflanzen wurden 3-4 Wochen im Langtag angezogen. Für die Quantifizierung des Stärkegehaltes wurde alle 2-4 Stunden Proben genommen, indem von 8-10 Pflanzen die Rosette oberhalb der Erde abgeschnitten wurde. Die Pflanzen wurden anschließend aufgearbeitet und mit Hilfe des Biovision StarchAssay Kits der Gehalt der löslichen Stärke in den Pflanzen bestimmt. Gemessen wurden zwei biologische Replikate. weiß: normale Lichtphase (16h), dunkelgrau: normale Nacht (8h), hellgrau: verlängerte Nacht

In beiden Versuchen ist im Wildtyp die meiste Stärke am Ende der Lichtphase (im Langtag nach 16h Licht) zu beobachten (Abb. 5.11), die dann während der folgenden Nacht (im Langtag 8h Dunkelphase) langsam wieder abgebaut wird. *Pro35S:AtbZIP1* Pflanzen zeigen im Vergleich zum Wildtyp einen etwas höherer Stärkegehalt sowohl in der Iod-Iodkalium-Färbung als auch in der quantitativen Bestimmung der Stärke. Noch

deutlicher ist dies bei den Pro35S:AtbZIP53 Pflanzen ausgeprägt. Bei ihnen ist so viel Stärke eingelagert, dass sogar während der verlängerten Nacht (28h und 32h Zeitpunkt) noch Stärke übrig ist. Zu diesen Zeitpunkten ist bei allen anderen Pflanzen keine Stärke mehr messbar. Die Doppelmutante *atbzip1 atbzip53* zeigt zu den meisten Zeitpunkten sowohl in der Iod-Iodkalium-Färbung als auch in der quantitativen Bestimmung nur geringe Unterschiede zum Wildtyp, die meist nicht signifikant sind. Nur der 32h Zeitpunkt fällt in der quantitativen Bestimmung heraus, da hier eine recht hohe Stärkemenge in der Mutante vorliegt, obwohl zu diesem Zeitpunkt in der Stärkefärbung alle Stärke verbraucht war.

Was ist für diesen dramatischen Stärkephänotyp der Pro35S:AtbZIP53 Pflanzen verantwortlich? Eine mögliche Erklärung wäre, dass der Stärkeabbau in diesen Pflanzen nicht mehr funktioniert. Das würde möglicherweise auch erklären, warum diese Pflanzen zwergwüchsig sind. Ihnen würde während der Nacht nicht genug Energie in Form von frei werdenden Zuckern aus dem Stärkeabbau zur Verfügung stehen.

Eine Gruppe von Enzymen, die für den Stärkeabbau verantwortlich ist, ist die Familie der β -Amylasen. Sie besteht aus 9 Mitgliedern, die bisher unterschiedlich gut untersucht worden sind. Während eine erste Real-Time Analyse bei 8 der 9 β -Amylasen nur wenige Unterschiede in der Expression während des Tag-Nacht-Rhythmus zwischen Wildtyp und Pro35S:AtbZIP53 ergab (Anhang Abb. 8.2), zeigt die β -*AMYLASE 5* (*BAM5*) einen deutlichen Unterschied (Abb. 5.13). Sie wird im Wildtyp noch während der Lichtphase hochreguliert und zeigt ihr Expressionsmaximum nach 12h Licht. Anschließend sinkt die Expression wieder und während der Nacht findet nur noch eine geringe Expression statt. Dies ist ein Expressionsmuster, das für stärkeabbauende Enzyme typisch ist (Smith et al., 2004; Zeeman et al., 2007). So wird sichergestellt, dass zu Beginn der Nacht bereits genug Protein bereitgestellt wird, damit die Stärke direkt abgebaut werden kann und keine Versorgungslücke entsteht. In den Überexpressionspflanzen von AtbZIP53 wird die *BAM5* fast gar nicht expremiert (Abb. 5.13). Die Überexpression von AtbZIP1 hat dagegen keinen Einfluss auf die Expression der *BAM5* (Daten nicht gezeigt).

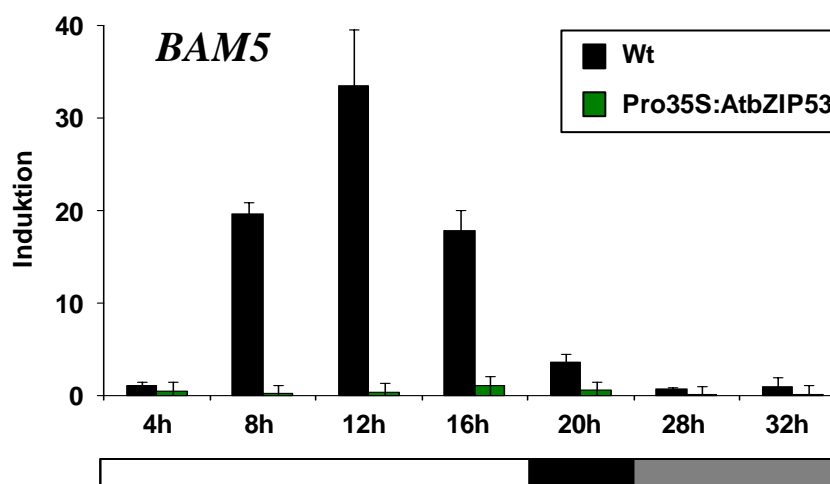


Abb. 5.13: Die β -Amylase 5 (*BAM5*) wird in den *Pro35S:AtbZIP53* Pflanzen nicht expremiert
 Wildtyp und *Pro35S:AtbZIP53* Pflanzen wurden 3-4 Wochen im Langtag angezogen und danach dunkel gestellt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils 8-10 Pflanzen geerntet und zusammen aufgearbeitet. Mit Hilfe der qPCR wurde die Expression der *BAM5* untersucht. Angegeben sind die relativen Werte im Vergleich zur Expression nach 4 Stunden von je zwei Replikaten nach Abgleich mit dem Haushaltsgen *Ubiquitin*. Der Versuch wurde mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt. weißer Balken: normale Lichtphase (16h), schwarzer Balken: normale Nacht (8h), grauer Balken: verlängerte Nacht

Wenn der Zwergwuchs der *Pro35S:AtbZIP53* Pflanzen tatsächlich auf mangelnde Energievorsorge durch ein Defizit im Stärkeabbau während der Nacht zurückzuführen wäre, dann sollten diese Pflanzen besser wachsen können, wenn sie im Dauerlicht angezogen werden. Vergleicht man nun die *AtbZIP53* Überexpressionspflanzen unter normalen Langtagsbedingungen mit Pflanzen, die im Dauerlicht angezogen wurden, so erkennt man keine großen Unterschiede. Auch die im Dauerlicht angezogenen Pflanzen zeigen immer noch einen starken Zwergwuchs (Abb. 5.14). Möglicherweise sind der Zwergwuchs und der erhöhte Stärkegehalt also nicht allein auf den verminderten Abbau der Stärke zurückzuführen, sondern auch auf eine verstärkte Stärkesynthese. Diese würde dann zu einem ständigen Mangel an frei verfügbaren Zuckern und damit zu einem Energiemangel führen, der unabhängig vom Tag-/Nachtrhythmus ist.

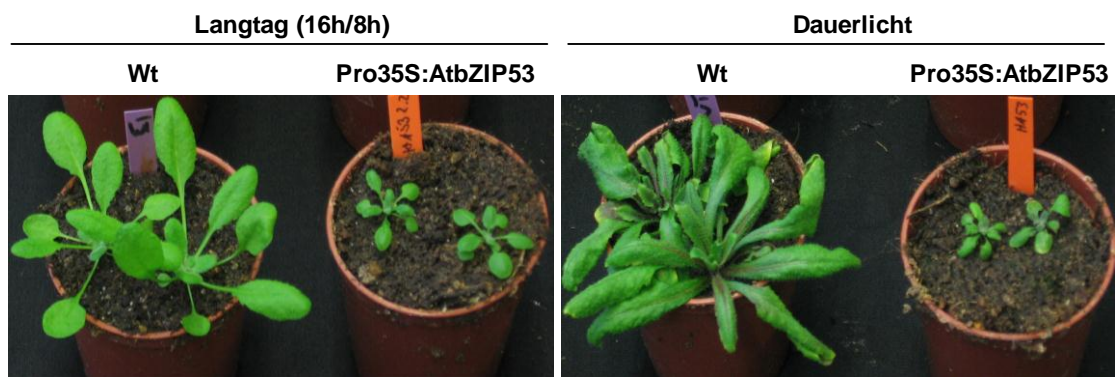


Abb. 5.14: Auch im Dauerlicht zeigen AtbZIP53 Überexpressierer einen Zwergwuchs
 Wildtyp und Pro35S:AtbZIP53 Pflanzen wurden 3-4 Wochen im Langtag (16h Licht / 8h Dunkel) bzw. im Dauerlicht angezogen und anschließend phänotypisch untersucht.

Eine Messung der Metabolite in Wildtyp, Überexpressionspflanzen und Doppelmutante in Kooperation mit W. Weckwerth (Universität Wien) mit Hilfe eines GC-MS-Verfahrens ergab allerdings, dass die Pro35S:AtbZIP53 Pflanzen hohe Mengen an freien Hexosen wie Glukose und Fruktose während des Tages und auch während der verlängerten Nacht aufweisen. Auch die Saccharosemengen sind in diesen Pflanzen stark erhöht. Lediglich Pentosen wie die Ribose sind in diesen Überexpressierern im Vergleich zum Wildtyp stark reduziert (Abb. 5.15 A). Im Wildtyp erkennt man dagegen gut den Unterschied zwischen der Lichtphase, in der viel Glukose, Fruktose und Saccharose vorhanden ist, und der verlängerten Nacht, in der die Zuckerreserven fast vollständig aufgebraucht werden. Nur die Ribose zeigt im Wildtyp kaum Schwankungen in Tag/Nachrhythmus. Ribose ist allerdings ein wichtiger Bestandteil des RNA-Rückrats und z.B. auch Teil des Energieträgers ATP und sollte deshalb möglichst immer verfügbar sein.

Die Doppelmutante zeigt wie schon bei der Stärkemessung keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp. Interessant sind aber die Pro35S:AtbZIP1 Pflanzen. Im Gegensatz zu den Pro35S:AtbZIP53 Pflanzen zeigen sie im Vergleich zum Wildtyp während des Tages reduzierte Glukose- und Fruktosemengen. Der Saccharosegehalt ist dagegen tagsüber vergleichbar mit dem im Wildtyp, nach einem Tag Dunkelheit ist sogar noch etwas mehr Saccharose vorhanden.

Der Abbau von Glukose, Fruktose und Saccharose zur Energiegewinnung erfolgt normalerweise über die Glykolyse und den anschließenden Citratzyklus. Obwohl sich

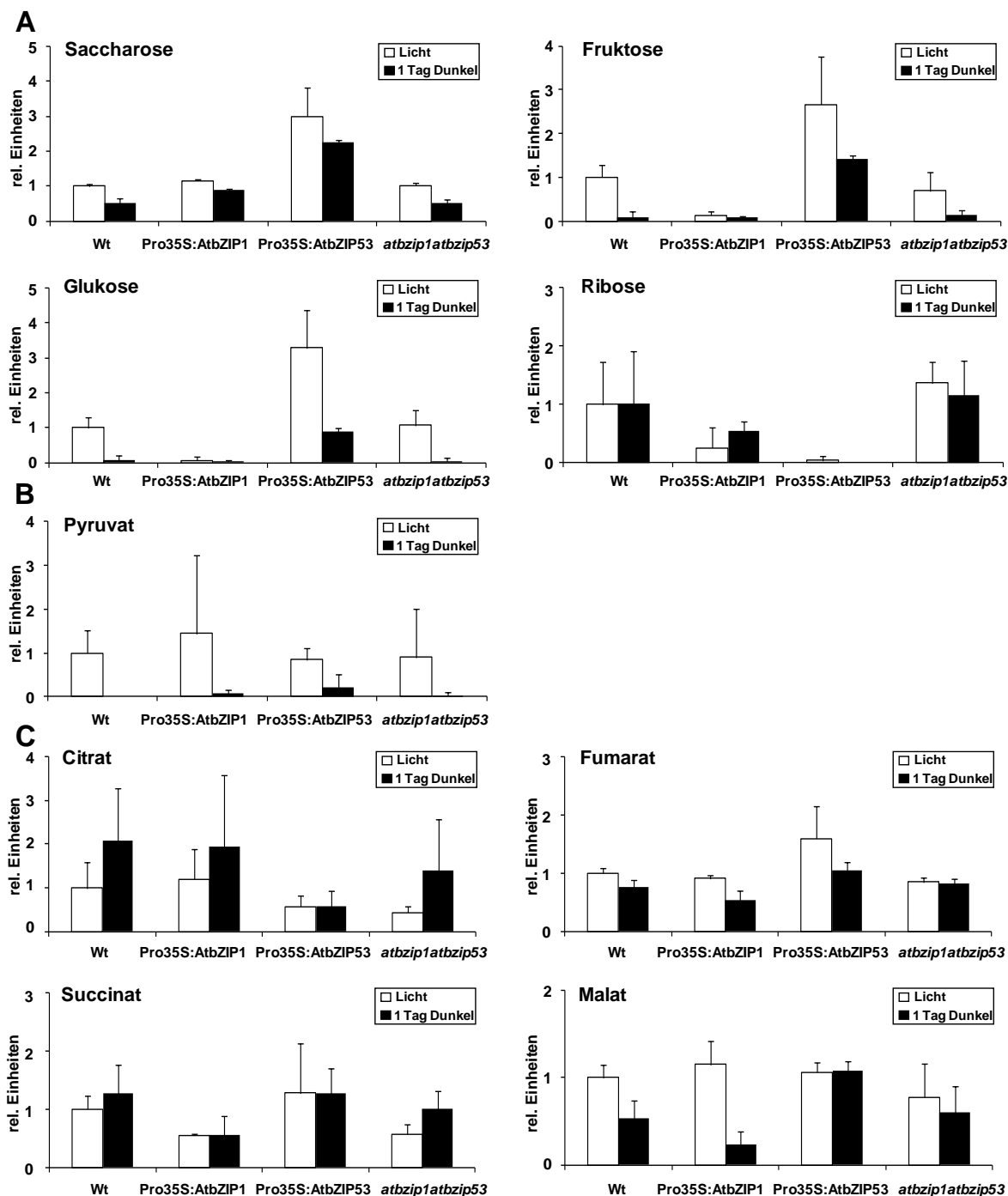


Abb. 5.15: *Pro35S:AtbZIP53* Pflanzen akkumulieren große Mengen an Glukose, Fruktose und Saccharose, während *Pro35S:AtbZIP1* Pflanzen weniger Glukose und Fruktose als der Wildtyp haben. Die Pflanzen wurden 3-4 Wochen im Langtag angezogen und entweder in der Mitte der Lichtphase gegen 17 Uhr geerntet (weiße Balken) oder am nächsten Tag um 17 Uhr nach einer ca. 8 Stunden verlängerten Nacht (schwarze Balken). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils 8-10 Pflanzen jeder Linie geerntet und zusammen aufgearbeitet. 100 mg dieses Materials wurden abgewogen und die Metabolitmengen in Kooperation mit W. Weckwerth (Universität Wien) mit Hilfe einer GC-MS bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei biologischen Replikaten.

die Menge der Zucker in den AtbZIP53 Überexpresmierern stark von der im Wildtyp und der Doppelmutante unterscheidet, bleibt die Menge an Pyruvat (Abb. 5.15 B), dem Endprodukt der Glykolyse, und von Komponenten des Citratzyklus wie Citrat, Succinat, Fumarat und Malat (Abb. 5.15 C) erstaunlich konstant. Es existieren zwar leichte Unterschiede, z.B. ist in den Pro35S:AtbZIP53 Pflanzen im Dunkeln etwas weniger Citrat, dafür etwas mehr Malat zu finden, und in Pro35S:AtbZIP1 Pflanzen im Dunkeln etwas weniger Succinat als im Wildtyp, die meisten Schwankungen sind aber nicht signifikant.

5.5.3 Die Überexpression von AtbZIP1 und AtbZIP53 führt zu einer veränderten Expression von Genen aus Aminosäureabbau und -Biosynthese

In den letzten beiden Kapiteln zeigte sich, dass es unter Energiemangelbedingungen während langanhaltender Dunkelheit zu einem Abbau von Makromolekülen wie z.B. Stärke und Lipiden kommt. Diese dienen der Pflanze als Reserve während sie keine Photosynthese betreiben kann. Aber auch Proteine und Aminosäuren dienen während dieser Zeit als Quelle für Kohlenstoff und Stickstoff, die von der Pflanze dringend benötigt werden.

Durch den Abbau der Proteine nimmt der Gehalt an freien Aminosäuren während der verlängerten Nacht stetig zu (Abb. 5.16). Der Abbau dieser freien Aminosäuren erfolgt zunächst über eine Transaminierung zu Glutamat, das durch das Enzym GLUTAMAT DEHYDROGENASE wieder in α -Ketoglutarat und Ammoniak gespalten wird. Aus diesem Grund steigt während der Dunkelinduktion auch stetig der Ammoniakgehalt in den Pflanzen an (Abb. 5.16).

In den Überexpressionspflanzen von AtbZIP1 und AtbZIP53, die einen verfrühten Eintritt in die dunkelinduzierte Seneszenz zeigen, werden typische Gene für den Abbau von Aminosäuren verstärkt expremiert (Tabelle 5.1). Dazu gehören z.B. die *PROLIN DEHYDROGENASE* (*ProDH*) und die *BRANCHED CHAIN AMINO ACID TRANSAMINASE2* (*BCAT2*). Es finden sich aber auch eine Reihe von Genen, die für den Aufbau der Aminosäure Asparagin verantwortlich sind.

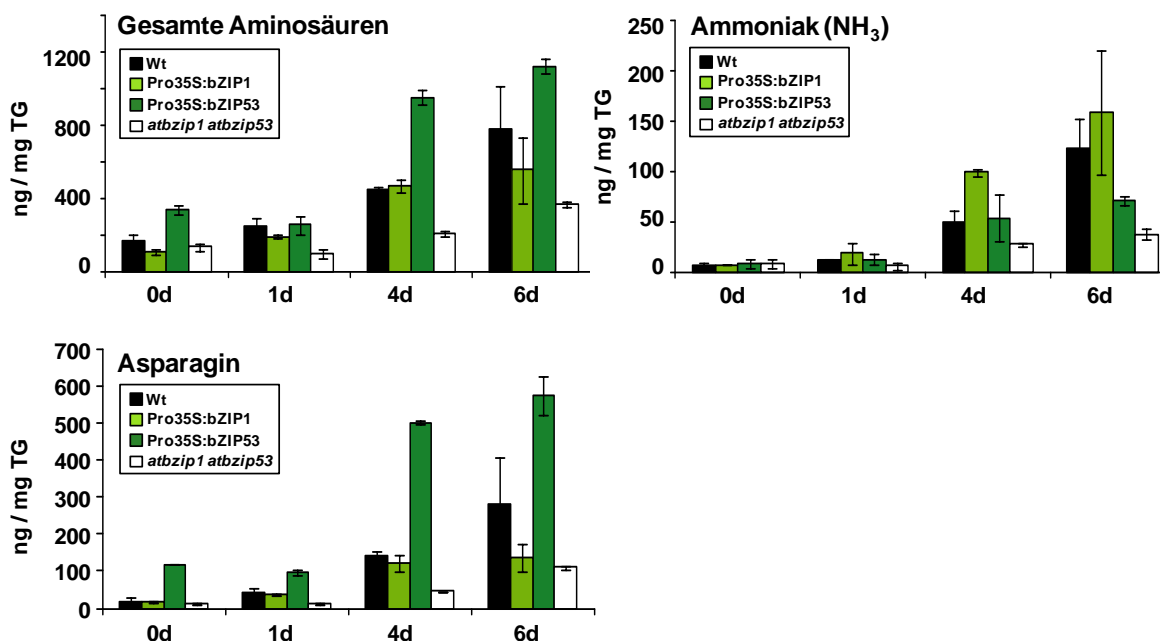


Abb. 5.16: Die Gesamtmenge an freien Aminosäuren und Ammoniak nimmt während der verlängerten Nacht zu

Die Pflanzen wurden 3-4 Wochen im Langtag angezogen und anschließend für bis zu 6 Tage dunkel gestellt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils 8-10 Pflanzen jeder Linie geerntet und zusammen aufgearbeitet. 100 mg dieses Materials wurden gefriergetrocknet und die Aminosäuremengen in Kooperation mit K. Harter und B. Stadelhofer (Universität Tübingen) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von zwei biologischen Replikaten. Der Versuch wurde ein weiteres Mal mit vergleichbaren Werten wiederholt.

Dies mag im ersten Moment verwundern, aber Asparagin dient in der Pflanze während der Dunkelheit als Transportform für Stickstoff und Kohlenstoff, und wird deshalb besonders unter diesen Bedingungen der verlängerten Nacht gebildet. Asparagin macht deshalb auch einen Großteil der gesamten freien Aminosäuren aus (Abb. 5.16; Tabelle mit Originaldaten im Anhang 8.2). Die Unterschiede in der Menge der freien Aminosäuren zwischen Überexpremierern, Doppelmutante und Wildtyp lassen sich hauptsächlich auf die unterschiedlichen Asparaginmengen in diesen Pflanzen zurückführen. Die folgenden Kapitel behandeln die Regulation dieser Gene aus Aminosäureabbau und -biosynthese.

5.5.3.1 Die verstärkte Expression der *ProDH* in den Überexpremierern führt zu einem reduzierten Prolingehalt dieser Pflanzen während der verlängerten Nacht

Die *ProDH* katalysiert den ersten Schritt des Abbaus der Aminosäure Prolin zu Glutamat (Abb. 5.17). Während der dunkelinduzierten Seneszenz kommt es zu einer Induktion der *ProDH* (Abb. 5.18). Unter diesen Bedingungen dient der Abbau von Prolin wie der Abbau anderer Aminosäuren auch als Quelle für Kohlenstoff und Stickstoff, die unter diesen Energiemangelbedingungen dringend benötigt werden (Blum und Ebercon, 1976; Ahmad und Hellebust, 1988).

Die Überexpression von *AtbZIP1* und *AtbZIP53* führt zu einem signifikanten Anstieg der *ProDH*-Expression während der gesamten sechs Tage Dunkelinduktion. Während *Pro35S:AtbZIP53* Pflanzen eine konstitutive Missexpression im Licht wie auch in Dunkelheit zeigen, führt die Überexpression von *AtbZIP1* erst nach einem oder mehreren Tagen Dunkelheit zu einer verstärkten Expression der *ProDH* (Abb. 5.18). Die Doppelmutante *atbzip1 atbzip53* zeigt eine leichte Reduktion der *ProDH* Expression, allerdings ist auch bei ihr noch eine deutliche Induktion der *ProDH* durch Dunkelheit zu erkennen.

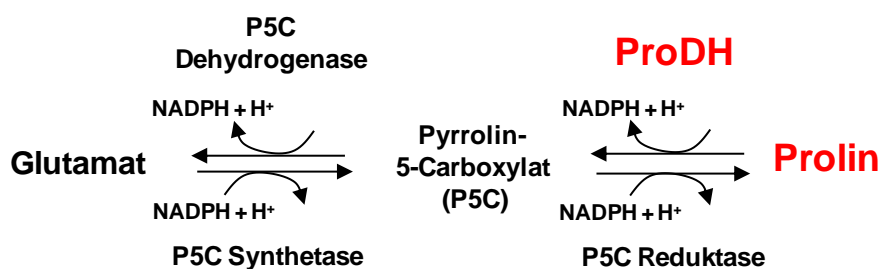


Abb. 5.17: Schema des Abbaus von Prolin zu Glutamat durch die *ProDH* und weitere Enzyme über das Zwischenprodukt Pyrrolin-5-Carboxylat (P5C) nach (Hellmann et al., 2000).

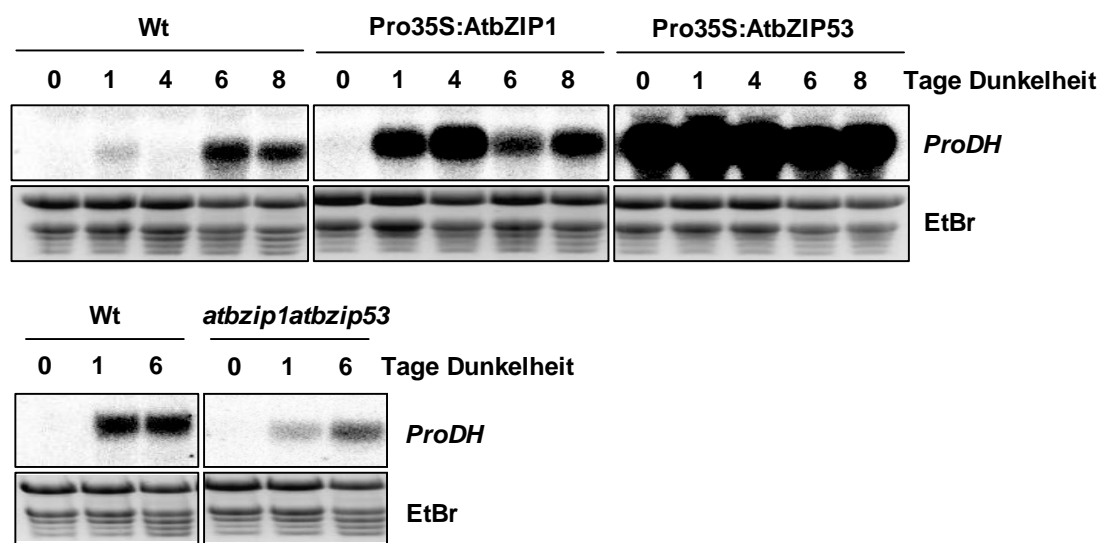


Abb. 5.18: *AtbZIP1* und *AtbZIP53* haben einen starken Einfluss auf die Expression der *ProDH* Wildtyp, Überexpremierer und Doppelmutante wurden 3-4 Wochen im Langtag angezogen. Anschließend wurden die Pflanzen dunkel gestellt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils 8-10 Pflanzen pro Linie geerntet und zusammen aufgearbeitet. Daraus wurde RNA gewonnen und mit Hilfe einer Northern Analyse untersucht. Der Versuch wurde mehrfach mit vergleichbarem Ergebnis durchgeführt. EtBr: Ethidiumbromid-Färbung der verwendeten RNA-Gele zum Nachweis der gleichmäßiger Beladung.

Um diese Ergebnisse aus den Northern Analysen noch einmal zu reproduzieren und auch eine bessere Auflösung insbesondere der physiologisch relevanten frühen Zeitpunkte der verlängerten Nacht zu bekommen, wurde der Versuch noch einmal mit kürzeren Dunkelinduktionen durchgeführt und dieses Mal mit Hilfe der qPCR die Transkriptmenge der *ProDH* bestimmt (Abb. 5.19). In dieser Analyse bestätigen sich die schon aus dem vorherigen Versuch gewonnenen Ergebnisse. Im Wildtyp sieht man, wie die *ProDH* Expression mit Einbruch der Dunkelheit stetig steigt. Die Pro35S:AtbZIP53 Pflanzen zeigen eine starke konstitutive Expression der *ProDH* im Licht, die während der Nacht stärker wird und auch während der verlängerten Nacht noch etwas gesteigert werden kann. Die AtbZIP1 Überexpremierer zeigen dagegen während der Lichtphase nur eine geringfügig stärkere *ProDH*-Expression als der Wildtyp, dies ändert sich aber mit dem Eintreten in die verlängerte Dunkelphase. Hier steigt die Transkription der *ProDH* in den Pro35S:AtbZIP1 Pflanzen deutlich stärker an. Die *atbzip1 atbzip53* Doppelmutante zeigt dagegen wie schon im Northern nur eine leichte Reduktion der *ProDH*-Expression.

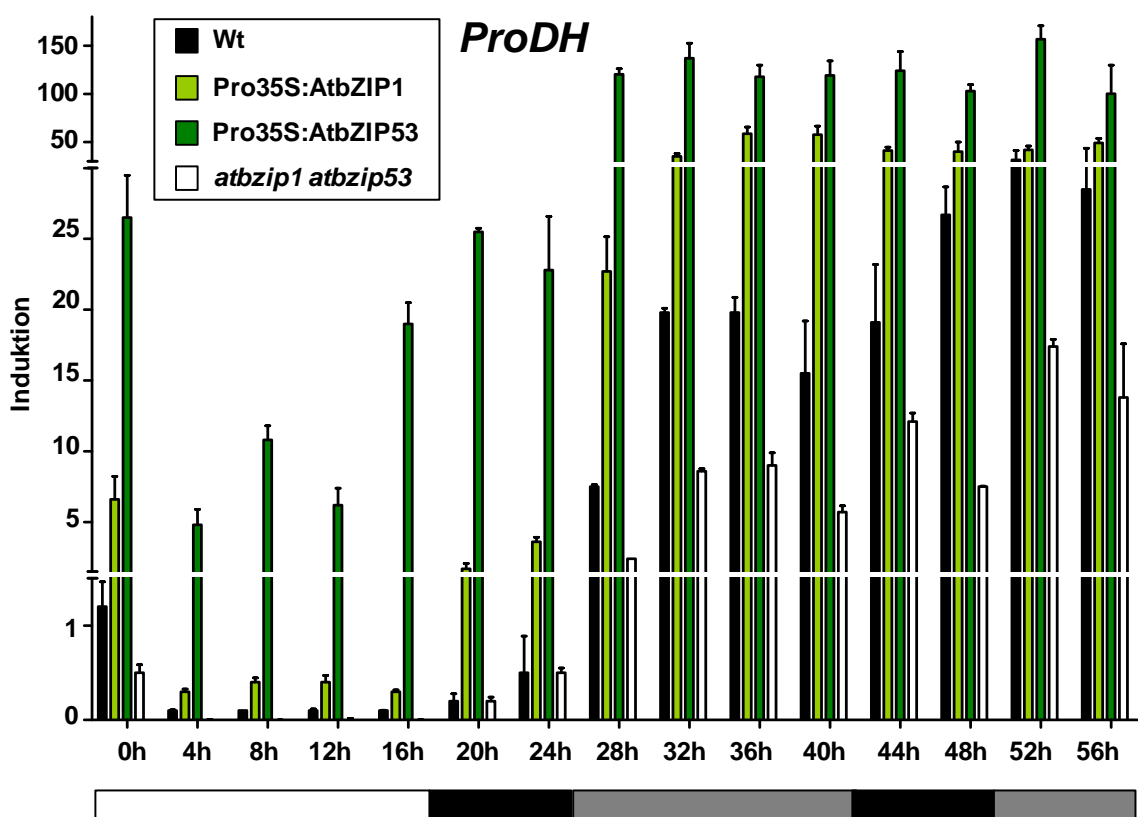


Abb. 5.19: Detaillierte qPCR-Analyse der Expression der *ProDH* während der verlängerten Nacht
 Die Pflanzen wurden 3-4 Wochen im Langtag angezogen und danach dunkel gestellt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils 8-10 Pflanzen geerntet und zusammen aufgearbeitet. Die Expression der *ProDH* wurde mit Hilfe der qPCR untersucht. Angegeben sind die relativen Werte im Vergleich zur Expression zu Beginn des Versuchs von je zwei Replikaten nach Abgleich mit dem Haushaltsgen *Ubiquitin*. Zur besseren Übersicht ist die y-Achse zweimal unterbrochen (bei 2facher und 30facher Induktion). weißer Balken: normale Lichtphase (16h), schwarzer Balken: normale Nacht (8h), grauer Balken: verlängerte Nacht.

Um zu testen ob sich die transkriptionelle Regulation der *ProDH* auch auf die Menge der Aminosäure Prolin in der Pflanze auswirkt, wurden der Aminosäuregehalt während der verlängerten Nacht bestimmt. Die deutliche Aktivierung der *ProDH* im Wildtyp während der Dunkelinduktion, die in qPCR und Northern Analyse gezeigt werden konnte, führt dazu, dass die Prolinmenge während der Dunkelinduktion deutlich abnimmt (Abb. 5.20).

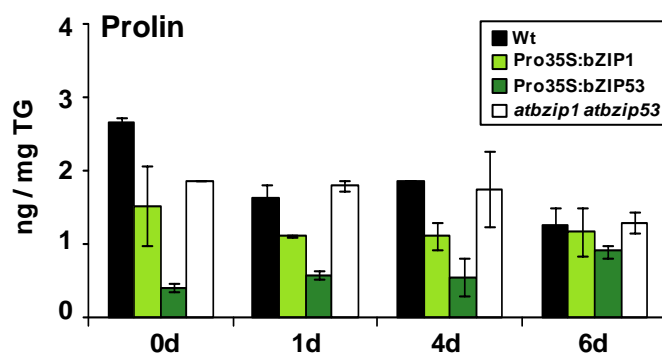


Abb. 5.20: Die Prolinmenge ist in den Überexpremierern von *AtbZIP1* und *53* deutlich reduziert. Die Pflanzen wurden 3-4 Wochen im Langtag angezogen und anschließend für bis zu 6 Tage dunkel gestellt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils 8-10 Pflanzen jeder Linie geerntet und zusammen aufgearbeitet. 100 mg dieses Materials wurden gefriergetrocknet und die Aminosäuremengen in Kooperation mit K. Harter und B. Stadelhofer (Universität Tübingen) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von zwei biologischen Replikaten. Der Versuch wurde ein weiteres Mal mit vergleichbaren Werten wiederholt.

Die starke Expression der *ProDH* in den Überexpremierern von *AtbZIP1* und *AtbZIP53* führt zu einem verstärkten Abbau von Prolin durch die *ProDH* und damit auch zu einem stark reduzierten Gehalt an Prolin in diesen Pflanzen während der gesamten verlängerten Nacht. Besonders ausgeprägt ist dies bei den *Pro35S:AtbZIP53* Pflanzen, die auch die stärkste *ProDH* Expression zeigten. Die leichte Reduktion der *ProDH*-Expression in der *atbzip1atbzip53* Doppelmutante führt dagegen nicht zu einem erhöhten Prolingehalt. Hier sind kaum Unterschiede zum Wildtyp zu erkennen.

Die Überexpremierer von *AtbZIP1* und *AtbZIP53* zeigen aber eine deutliche Veränderung der *ProDH*-Expression, die auch zu einer deutlichen Änderung des Aminosäuregehalts führt. Die Frage ist, ob *AtbZIP1* und *AtbZIP53* direkt an den Promotor der *ProDH* binden, oder ob die beobachteten Veränderungen der Expression durch indirekte Effekte hervorgerufen werden.

Kürzlich wurde für die *ProDH* mit Hilfe von ChIP Analysen gezeigt, dass sie ein direktes Zielgen von *AtbZIP53* während der Anpassung der Pflanze an hypoosmotische Stressbedingungen ist (Weltmeier et al., 2006). Der Promotor der *ProDH* enthält mehrere *cis*-Elemente, die als Bindestellen für bZIP Transkriptionsfaktoren in Frage kommen. So gibt es z.B. zwei ACTCAT-Motive (Satoh et al., 2004; Weltmeier et al., 2006) und eine C-Box (GACGTC). Für die folgende ChIP-Analyse wurden die Primer

so gewählt, dass sie einen 190 bp großen Promotorbereich amplifizieren, der beide ACTCAT-Motive enthält (Abb. 5.21 A).

Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass dieses Promotorfragment nach der Immunopräzipitation in den Pro35S:HA-AtbZIP1 Pflanzen etwa 5fach angereichert ist (Abb. 5.21 B), was eine Bindung von AtbZIP1 an der *ProDH* Promotor belegt. Diese Bindung von AtbZIP1 an den Promotor der *ProDH* ist dabei zumindest unter den gewählten Versuchsbedingungen unabhängig von Licht oder Dunkelheit. Der Vergleich von Chromatin aus Pflanzen nach 4 Tagen Inkubation in Dunkelheit mit Pflanzen aus normalen Langtagsbedingungen zeigt keinerlei Unterschiede. Der gleichmäßige Einsatz des Chromatins wurde in einer Western Analyse kontrolliert (Abb. 5.21 C).

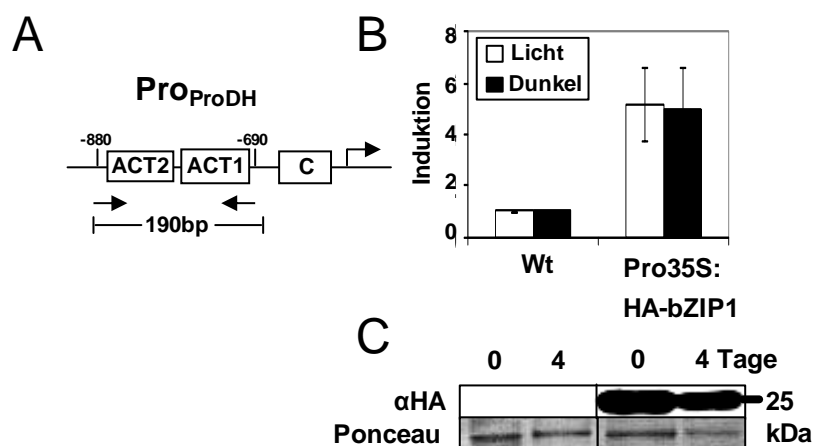


Abb. 5.21: AtbZIP1 bindet direkt an den Promotor der ProDH

A: Schema des *ProDH* Promotors mit zwei benachbarten ACTCAT Elementen und einer C-Box. Pfeile geben die Position der Primer für die Amplifikation des 190 bp großen PCR Fragmentes an

B: Pflanzen für die Immunopräzipitation wurden 3-4 Wochen im Langtag angezogen und anschließend direkt geerntet bzw. vorher für weitere 4 Tage dunkel gestellt. Nach der Immunopräzipitation mit einem ChIPgrade HA-Antikörper wurde eine qPCR der aufgereinigten DNA mit Primern durchgeführt, die das Stück des *ProDH* Promotors mit den 2 ACTCAT Elementen umfassen. Dargestellt ist die Anreicherung dieses Fragmentes im Vergleich zum Wildtyp nach Abgleich mit Inputkontrolle und einem unspezifischen *Actin*-Gen (siehe Material und Methoden). Gezeigt wird Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

C: Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung der Chromatins aus Licht und Dunkelheit wurden die Input-Kontrollen vor der Immunopräzipitation in einem Western analysiert.

5.5.3.2 Die *BCAT2* wird in den Überexpremierern von *AtbZIP1* und *AtbZIP53* verstärkt expremiert und führt zu einer Reduktion der verzweigten Aminosäuren

Die *BCAT2* ist ein weiteres Gen des Aminosäurestoffwechsels, das in den Transkriptomanalysen der Pro35S:*AtbZIP53* Pflanzen verstärkt expremiert wurde. Sie gehört zu einer Familie von sieben Enzymen, von denen sechs in *Arabidopsis* transkribiert werden (*BCAT1-6*). Die Mitglieder dieser Familie katalysieren den letzten Schritt der Synthese der verzweigt-kettigen Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin, aber auch den ersten Schritt ihrer Degradation (Abb. 5.22).

Die Bestimmung der Aminosäuregehalte ergab, dass die Mengen der verzweigt-kettigen Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin im Wildtyp kontinuierlich während der verlängerten Nacht ansteigt (Abb. 5.23). Da unter diesen Bedingungen besonders Kohlenstoff knapp ist, wird dieser starke Anstieg wahrscheinlich nicht auf eine Neusynthese dieser Aminosäuren zurückzuführen sein, sondern vielmehr auf einen Abbau von Proteinen, und damit eine Freisetzung auch dieser drei Aminosäuren. Dafür spricht auch die zunehmende Gesamtmenge an freien Aminosäuren (Abb. 5.16).

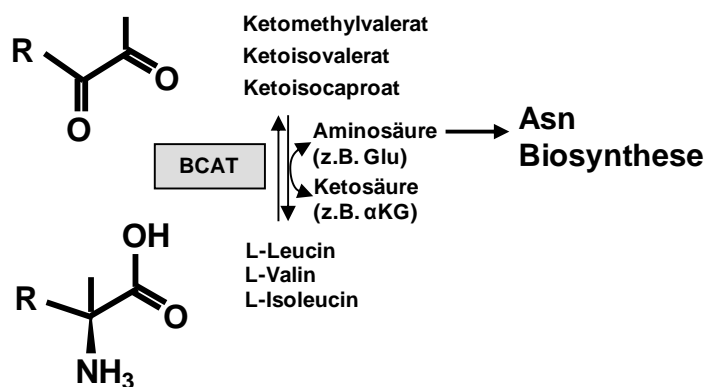


Abb. 5.22: Schema des durch die Mitglieder der BCAT-Familie katalysierten Abbaus /Aufbaus der verzweigt-kettigen Aminosäuren Leucin, Valin und Isoleucin (nach Binder et al., 2007)

Durch den Abbau von Leucin, Isoleucin oder Valin frei werdende Aminosäuren können zur Synthese von Asparagin (Asn) genutzt werden. Glu = Glutaminsäure; αKG = αKetoglutarat

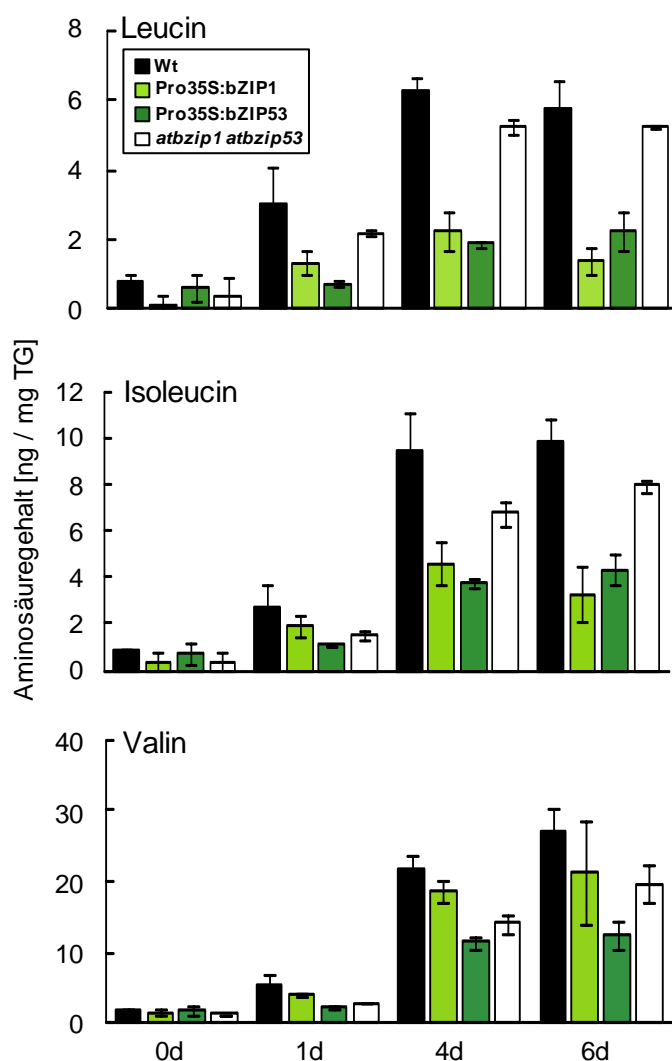


Abb. 5.23: Die Menge der verzweigtkettigen Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin ist in den Überexpremierern von *AtbZIP1* und *AtbZIP53* deutlich reduziert

Die Pflanzen wurden 3-4 Wochen im Langtag angezogen und anschließend für bis zu 6 Tage dunkel gestellt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils 8-10 Pflanzen jeder Linie geerntet und zusammen aufgearbeitet. 100 mg dieses Materials wurden gefriergetrocknet und die Aminosäuremengen in Kooperation mit K. Harter und B. Stadelhofer (Universität Tübingen) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von zwei biologischen Replikaten. Der Versuch wurde ein weiteres Mal mit vergleichbaren Werten wiederholt.

Während die Doppelmutante *atbzip1 atbzip53* keinen großer Unterschied zum Wildtyp zeigt, finden sich in beiden Überexpremierern viel geringere Mengen der drei verzweigtkettigen Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin während der gesamten Phase der Dunkelinduktion (Abb. 5.23). In diesen Pflanzen scheint also der Abbau dieser drei Aminosäuren verstärkt abzulaufen.

In der Literatur wird die *BCAT1* als zentrales Enzym beschrieben, dass in den Mitochondrien für den Abbau der verzweigt-kettigen Aminosäuren zuständig ist (Schuster und Binder, 2005). Eine Analyse der Expression der 6 *BCAT*-Gene mit der Genevestigator Software (Hruz et al., 2008) ergab, dass Dunkelheit die *BCAT1* zwar leicht induziert, die *BCAT2* wird unter diesen Bedingungen aber noch viel stärker induziert (Abb. 5.24). Sie zeigt außerdem auch eine starke Repression durch Zucker und ähnelt damit in ihrer Expression sehr stark der Expression von *AtbZIP1* (Abb. 5.3).

Eine Analyse von Wildtyppflanzen in der qPCR bestätigt die starke Aktivierung der *BCAT2* Expression während der verlängerten Nacht (Abb. 5.25). Die *atbzip1 atbzip53* Mutante unterscheidet sich nicht vom Wildtyp. Dies spiegelt die gemessenen Aminosäuremengen wieder, die sich in der Doppelmutante auch nicht vom Wildtyp unterscheiden. Bei den Überexpremierern zeigen besonders die Pro35S:AtbZIP1 Pflanzen eine starke Expression der *BCAT2*, die weit über der des Wildtyps liegt.

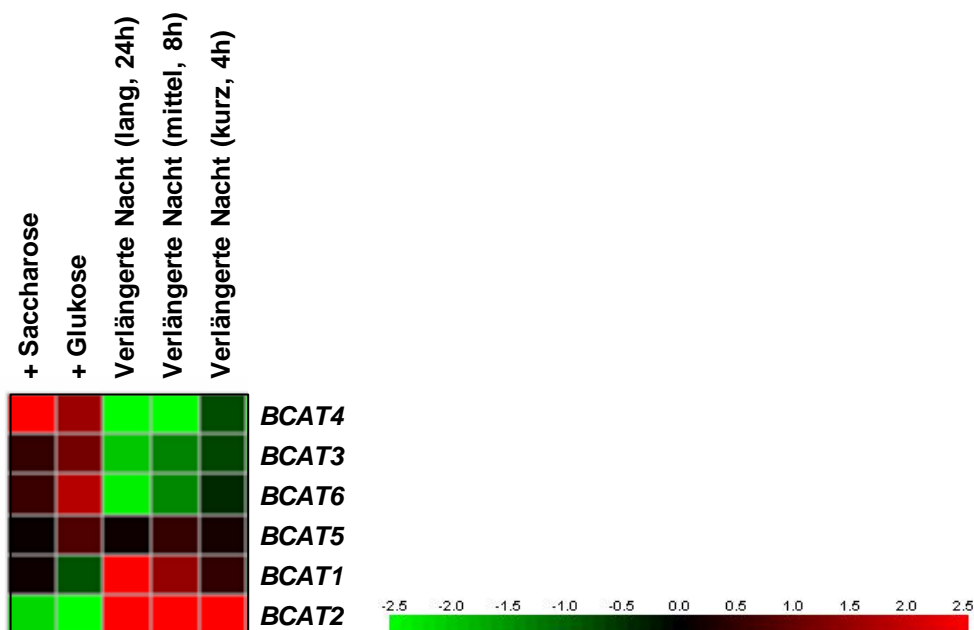


Abb. 5.24: Genevestigator Analyse (Hruz et al., 2008) der Expression der 6 *BCAT* Gene während der verlängerten Nacht

Behandlung mit Glukose oder Saccharose führt zu einer Reprimierung (grün), eine verlängerte Nacht führt dagegen zur Aktivierung (rot) der Transkription von *BCAT1* und *BCAT2*. Dargestellt sind relative Expressionswerte unter den angegebenen Bedingungen im Vergleich zur Kontrolle.

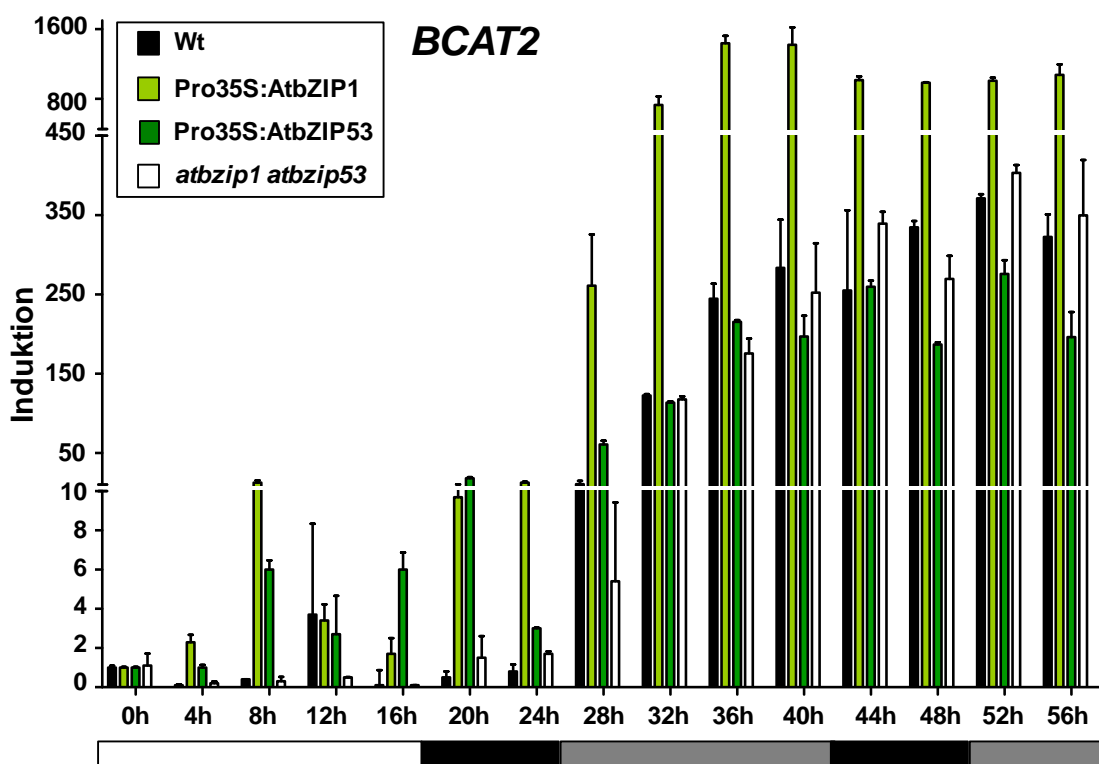


Abb. 5.25: Detaillierte qPCR-Analyse der Expression der BCAT2 während der verlängerten Nacht
 Die Pflanzen wurden 3-4 Wochen im Langtag angezogen und danach dunkel gestellt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils 8-10 Pflanzen geerntet und zusammen aufgearbeitet. Die Expression der BCAT2 wurde mit Hilfe der qPCR untersucht. Angegeben sind die relativen Werte im Vergleich zur Expression zu Beginn des Versuchs von je zwei Replikaten nach Abgleich mit dem Haushaltsgen *Ubiquitin*. Zur besseren Übersicht ist die y-Achse zweimal unterbrochen (bei 10facher und 450facher Induktion). weißer Balken: normale Lichtphase (16h), schwarzer Balken: normale Nacht (8h), grauer Balken: verlängerte Nacht

In den Pro35S:AtbZIP53 Pflanzen wird die BCAT2 vor allem während des normalen Tag-/Nacht-Rhythmus und der beginnenden verlängerten Nacht verstärkt expremiert, während der späteren Dunkelinduktion ist die Expression etwa mit der des Wildtyps vergleichbar.

Diese starke Expression der BCAT2 in den Überexpremierern führt möglicherweise zum starken Abbau der verzweigtkettigen Aminosäuren in diesen Pflanzen und führt dazu, dass die Menge dieser Aminosäuren in beiden Überexpremierern weit unter der Menge des Wildtyps liegt.

5.5.3.3 Die Überexpression von AtbZIP1 und AtbZIP53 führt zu einer verstärkten Expression der Gene der Asparagin Biosynthese während der verlängerten Nacht

Die starke Expression von *ProDH* und *BCAT2* in den Überexprimierern von AtbZIP1 und AtbZIP53 führte zu einem erhöhten Abbau der jeweiligen Aminosäuren. In den Transkriptomanalysen der beiden Überexpressionspflanzen (Weltmeier, 2005) fällt auf, dass auch ein Aminosäurebiosyntheseweg stark durch die Überexpression der beiden bZIP Transkriptionsfaktoren beeinflusst wird. Dieser führt zur Synthese der Aminosäure Asparagin (Lin und Wu, 2004). Beinahe alle Gene dieses Stoffwechselweges werden durch einen oder beide bZIP Transkriptionsfaktoren reguliert (Abb. 5.26 A, Tabelle 5.1).

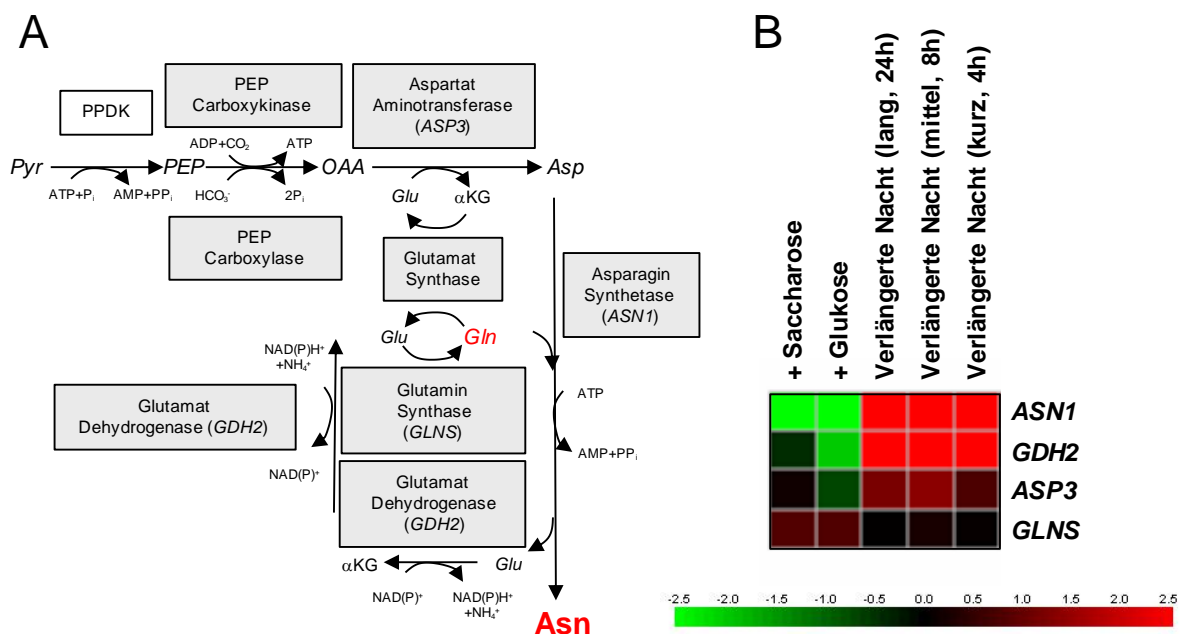


Abb. 5.26: A: Schema des Biosyntheseweges der Aminosäure Asparagin (nach Lin und Wu, 2004) und B: Genevestigator (Hruz et al., 2008) Daten der Expression der beteiligten Gene während der verlängerten Nacht

Behandlung mit Glukose oder Saccharose führt zu einer Reprimierung (grün), eine verlängerte Nacht dagegen zur Aktivierung (rot) der Transkription der meisten beteiligten Gene. Dargestellt sind relative Expressionswerte unter den angegebenen Bedingungen im Vergleich zur Kontrolle.

Untersucht man die Expression dieser Gene während der verlängerten Nacht und bei Behandlung mit Zuckern mit Hilfe der Genevestigator Software (Hruz et al., 2008), so ergibt sich ein ähnliches Bild wie für die Expression von *AtbZIP1* und *AtbZIP53* (Abb. 5.3, Abb. 5.26 B). Die Expression von drei Genen der Asparagin-Biosynthese, nämlich der *ASPARAGIN SYNTHETASE (ASN1)*, *ASPARTAT AMINOTRANSFERASE (ASP3)* und *GLUTAMAT DEHYDROGENASE (GDH2)* wird stark während der verlängerten Nacht induziert und durch Zucker reprimiert. Die Expression der *PEP CARBOXYKINASE (PEPCK)*, die den ersten Schritt des Asparagin Biosyntheseweges katalysiert, konnte mit Hilfe der Software leider nicht untersucht werden, da das Gen nicht auf den Arrays enthalten war. Die *GLUTAMIN SYNTHASE (GLNS)* zeigt dagegen ein umgekehrtes Expressionsmuster. Ihre Expression wird durch Dunkelheit reprimiert und durch Zucker aktiviert. Diese Expressionsmuster führen dazu, dass Asparagin während der Nacht als bevorzugte Transportform für Stickstoff und Kohlenstoff dient, während tagsüber vor allem Glutamin diese Aufgabe übernimmt (Lam et al., 1994). Dies liegt an dem Verhältnis von Kohlenstoff zu Stickstoff in den beiden Aminosäuren. Während Glutamin 5 Kohlenstoffatome auf 2 Stickstoffatomen enthält, benötigt Asparagin bei gleicher Anzahl Stickstoff ein Kohlenstoffatom weniger, was besonders unter Bedingungen wichtig ist, unter denen Kohlenstoff limitierend ist, wie z.B. in der Dunkelheit, wenn die Pflanze keine Photosynthese betreiben kann.

Zur Reproduktion der Daten aus der Genevestigator Analysen wurden Northern Experimente gemacht, in denen die Expression der Gene der Asparagin- und Glutaminbiosynthese während der verlängerten Nacht untersucht wurde (Abb. 5.27). Die Expression von *ASN1*, *GDH2* und *ASP3* während der Induktion durch Dunkelheit im Wildtyp stimmt mit der Expressionsanalyse aus öffentlichen Transkriptomdatensätzen (Abb. 5.26) überein und auch die Reprimierung der *GLNS* während der verlängerten Nacht konnte hier reproduziert werden. Lediglich die Expression der *PEPCK*, zu der es auch in den öffentlichen Transkriptomdatensätzen keine Daten gibt, liegt in der Northern Analyse unter der Nachweisgrenze.

Die Pro35S:AtbZIP1 Überexpresmierer zeigen unter den gleichen Bedingungen eine frühere und teilweise auch stärkere Induktion der Gene. Ausnahme ist hier wieder die *PEPCK*, die auch in den AtbZIP1 Überexpressionspflanzen nicht induziert wird.

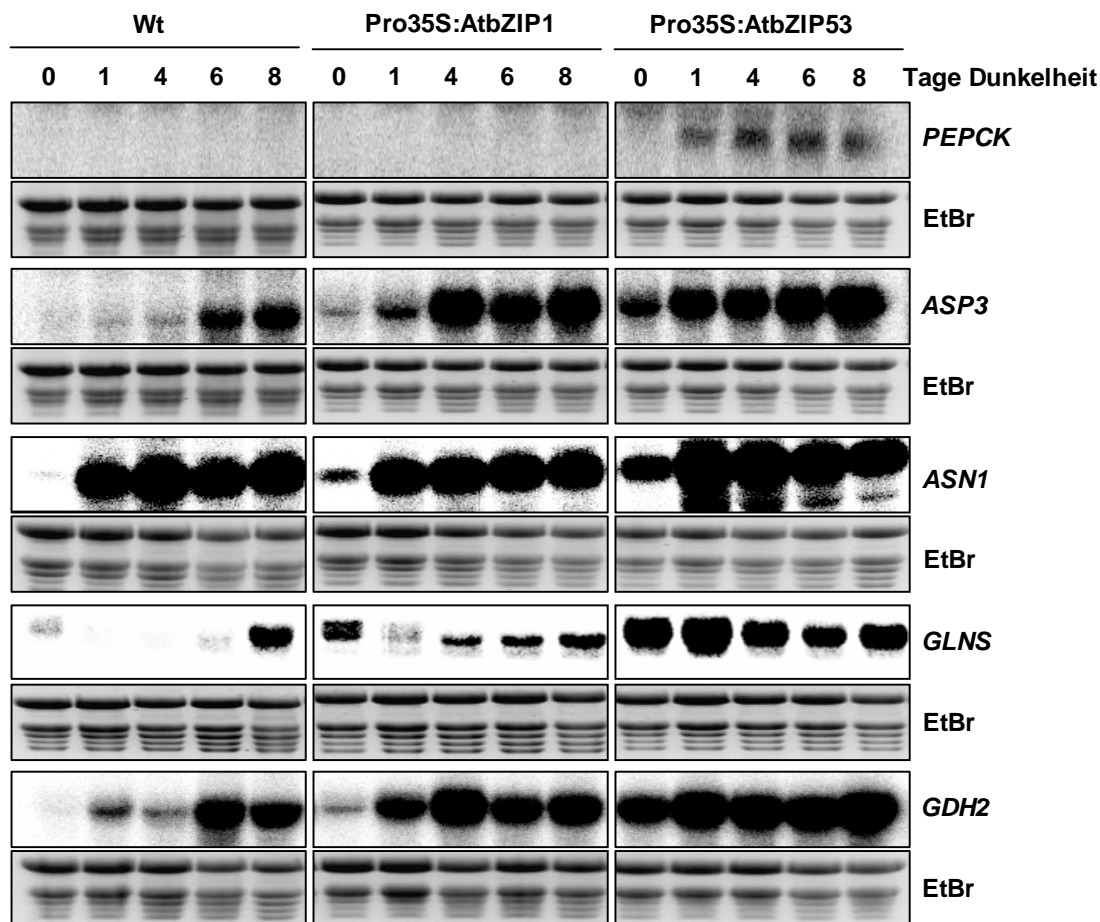


Abb. 5.27: *AtbZIP1* und *AtbZIP53* haben einen starken Einfluss auf die Expression der Gene, die zur Biosynthese von Asparagin führen

Wildtyp und Überexpressionspflanzen wurden 3-4 Wochen im Langtag angezogen. Anschließend wurden die Pflanzen dunkel gestellt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils 8-10 Pflanzen pro Linie geerntet und zusammen aufgearbeitet. Daraus wurde RNA gewonnen und im Northern mit Sonden für die oben angegebenen Gene untersucht. EtBr: Ethidiumbromid-Färbung der verwendeten RNA-Gele zum Nachweis der gleichmäßigen Beladung.

Die Pro35S:AtbZIP53 Überexpressierer zeigen dagegen eine starke konstitutive Expression fast aller getesteten Gene aus Asparagin- und Glutamin-Biosynthese während des Tages und während der verlängerten Nacht. Nur die *PEPCK* wird nicht konstitutiv expremiert, sondern erst nach Induktion durch Dunkelheit.

Da für die späteren Zeitpunkte zwischen vier und acht Tagen Dunkelheit für die Expression der *ASN1*, dem zentralen Gen des Asparagin Biosyntheseweges, keine großen Unterschiede zwischen Wildtyp und Überexpressierern mehr zu erkennen sind, wurde noch einmal ein detaillierterer Versuch durchgeführt, um insbesondere auch die

früheren Zeitpunkte der Dunkelinduktion, die physiologisch interessanter sind, näher zu untersuchen. In diesem detaillierteren Experiment (Abb. 5.28) ist zu erkennen, dass die *ASN1* im Wildtyp im Licht nicht expremiert wird, aber schon nach 4 Stunden der verlängerten Nacht (28h Zeitpunkt des Experiments) hat sich die Transkriptmenge verzwanzigfacht. Ihr Maximum erreicht sie schließlich nach 28 Stunden der verlängerten Nacht mit einer fast 120fachen Transkriptmenge verglichen mit dem Beginn des Tages. Dies spiegelt die Ergebnisse aus der Northern Analyse wieder. Die Expression der *ASN1* in den Pro35S:AtbZIP1 Überexpremierern ist während des normales Tag-/Nachtrhythmus nur unwesentlich stärker als im Wildtyp, steigt dann aber während der verlängerten Nacht deutlich stärker an.

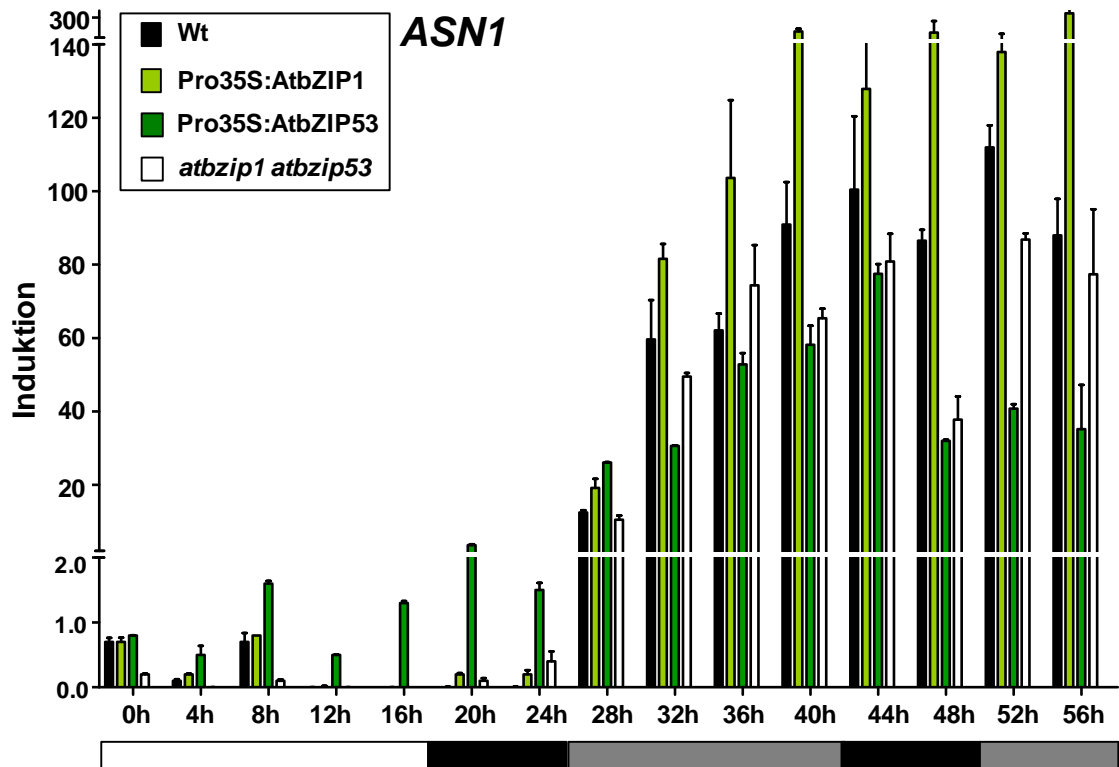


Abb. 5.28: Detaillierte qPCR-Analyse der Expression der *ASN1* während der verlängerten Nacht
Die Pflanzen wurden 3-4 Wochen im Langtag angezogen und danach dunkel gestellt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils 8-10 Pflanzen geerntet und zusammen aufgearbeitet. Die Expression der *ASN1* wurde mit Hilfe der qPCR untersucht. Angegeben sind die relativen Werte im Vergleich zur Expression zu Beginn des Versuchs von je zwei Replikaten nach Abgleich mit dem Haushaltsgen *Ubiquitin*. Zur besseren Übersicht ist die y-Achse zweimal unterbrochen (bei 2facher und 140facher Induktion). weißer Balken: normale Lichtphase (16h), schwarzer Balken: normale Nacht (8h), grauer Balken: verlängerte Nacht

Die *AtbZIP53* Überexpresmierer zeigen wie schon in der Northern Analyse eine konstitutiv stärkere Expression der *ASN1* während des normalen Tag-/Nachtwechsels, während der verlängerten Nacht ist die Expression im Gegensatz zur Northern Analyse aber eher etwas schwächer als im Wildtyp. Die Unterschiede sind allerdings nicht so groß, so dass sie möglicherweise in der wesentlich weniger sensitiveren Northern Analyse nicht zu sehen waren.

Die Doppelmutante *atbzip1 atbzip53*, die in diesem Experiment ebenfalls getestet wurde zeigte weder im Licht noch im Dunkeln große Unterschiede zum Wildtyp. Dies deutet daraufhin, dass *AtbZIP1* und *AtbZIP53* nicht die einzigen Faktoren sind, die an der Regulation der *ASN1* beteiligt sind.

Um zu testen, welche Auswirkung auf den Asparagingehalt die verstärkte Expression der Biosynthesegene dieser Aminosäure in den Überexpressionspflanzen hat, haben wir die Aminosäuremengen von Wildtyp, Überexpresmierern und der Doppelmutante während der verlängerten Nacht quantifiziert (Abb. 5.29). Es zeigt sich, dass der Asparagingehalt im Wildtyp während der verlängerten Nacht stark ansteigt. Dies lässt sich auf die transkriptionelle Aktivierung der Asparagin-Biosynthesegene während der Dunkelinduktion zurückführen.

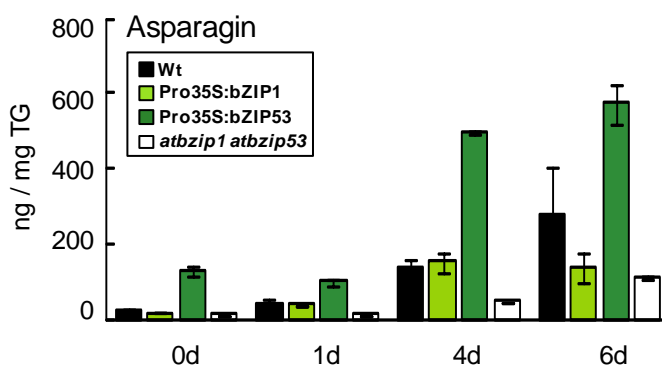


Abb. 5.29: Die Asparagingehalt ist in den Überexpresmierern von *AtbZIP53*, nicht aber von *AtbZIP1* deutlich erhöht

Die Pflanzen wurden 3-4 Wochen im Langtag angezogen und anschließend für bis zu 6 Tage dunkel gestellt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils 8-10 Pflanzen jeder Linie geerntet und zusammen aufgearbeitet. 100 mg dieses Materials wurden gefriergetrocknet und die Aminosäuremengen in Kooperation mit K. Harter und B. Stadelhofer (Universität Tübingen) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von zwei biologischen Replikaten. Der Versuch wurde ein weiteres Mal mit vergleichbaren Werten wiederholt.

In der *atbzip1 atbzip53* Doppelmutante zeigt sich im Vergleich zum Wildtyp eine leichte Reduktion der Asparaginmenge, obwohl die *ASN1* Expression in der Doppelmutante nicht sehr stark beeinträchtigt war. Für die Überexpremierer wurde eine deutliche Erhöhung des Asparagingehalts erwartet, da in diesen Pflanzen die Gene der Asparagin Biosynthese stark aktiviert werden. Dies trifft allerdings nur für die Pro35S:AtbZIP53 Pflanzen zu. Sie zeigen tatsächlich eine verstärkte Akkumulation von Asparagin während der Dunkelinduktion. Die Menge an Asparagin in den Pro35S:AtbZIP1 Pflanzen unterscheidet sich dagegen zu den meisten Zeitpunkten nicht von der im Wildtyp. Nach sechs Tagen liegt sie sogar deutlich unter der Menge des Wildtyps.

Eine mögliche Erklärung dafür, dass die Gene für die Asparagin Biosynthese in den Pro35S:AtbZIP1 Pflanzen zwar verstärkt expremiert werden, dies aber nicht zu einer Akkumulation von Asparagin in den Pflanzen führt ist, dass in diesen Pflanzen auch noch ein anderes Protein vermehrt gebildet wird, das den Abbau von Asparagin zu Aspartat katalysiert.

Bei diesem Gen könnte es sich um eine *ASPARAGINASE (ANS)* handeln (Bruneau et al., 2006). Die Transkription der *ANS* wird spezifisch in den Pro35S:AtbZIP1 Überexpremierern, nicht aber in den AtbZIP53 überexpremierenden Pflanzen nach Dunkelheit aktiviert (Abb. 5.30). Bereits nach 4 Stunden in der verlängerten Nacht ist bei ihnen eine 10fache Induktion der *ANS* zu messen, die sich im Laufe der Zeit noch auf eine fast 300fache Induktion steigert, während in Wildtyp, Doppelmutante und Pro35S:AtbZIP53 Pflanzen keinerlei Steigerung der Transkription während der verlängerten Nacht zu erkennen ist.

Die Expressionsdaten und Aminosäuremessungen der Überexpressionspflanzen sprechen dafür, dass AtbZIP1 und AtbZIP53 einen Einfluss auf die Regulation des Asparagin Biosyntheseweges haben. Ist dieser Effekt aber nun direkt, d.h. können AtbZIP1 und AtbZIP53 direkt an den Promotor der *ASN1* binden und diese so aktivieren, oder handelt es sich hier um einen indirekten Effekt?

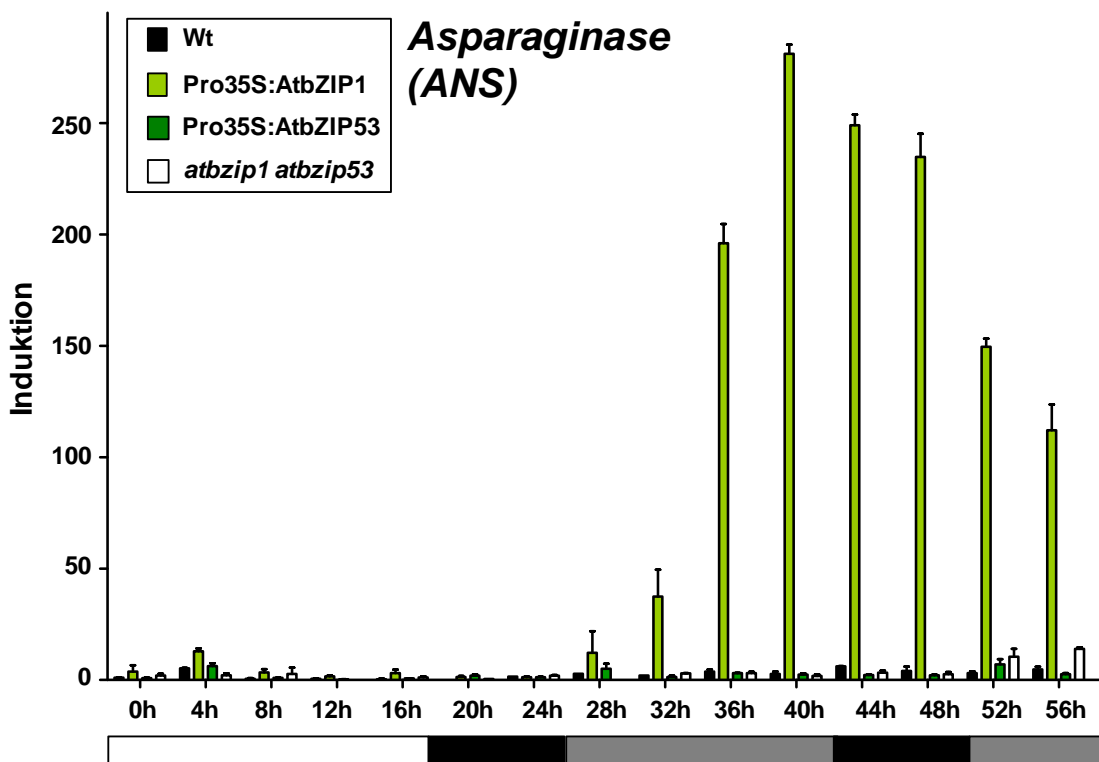


Abb. 5.30: Die *Pro35S:AtbZIP1* Pflanzen zeigen eine deutlich erhöhte Expression der Asparaginase. Die Pflanzen wurden 3-4 Wochen im Langtag angezogen und danach dunkel gestellt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils 8-10 Pflanzen geerntet und zusammen aufgearbeitet. Die Expression der ANS wurde mit Hilfe der qPCR untersucht. Angegeben sind die relativen Werte im Vergleich zur Expression zu Beginn des Versuchs von je zwei Replikaten nach Abgleich mit dem Haushaltsgen *Ubiquitin*. weißer Balken: normale Lichtphase (16h), schwarzer Balken: normale Nacht (8h), grauer Balken: verlängerte Nacht

Mögliche Bindestellen für bZIP Transkriptionsfaktoren gibt es viele im *ASN1* Promotor. In den ersten 1000bp finden sich alleine 5 ACGT Motive (Anhang Tabelle 8.1). Zwei der ACGT-Motive sind G-Boxen (CACTGG), an die eine Bindung von bZIP Faktoren bereits gezeigt werden konnte (Abb. 5.31 A; Schindler et al., 1992; Izawa et al., 1993). Um die Frage beantworten zu können, ob *AtbZIP1* oder *AtbZIP53* direkt an eines dieser Elemente aus dem *ASN1* Promotor binden, wurden ChIP Analysen durchgeführt. Für *AtbZIP53* konnte bereits demonstriert werden, dass eine direkte Bindung existiert (Weltmeier 2005). Für *AtbZIP1* soll dies in dieser Arbeit gezeigt werden. Die Primer wurden so gewählt, dass sie ein 222 bp großes Fragment amplifizieren, das beide G-Boxen des *ASN1*-Promotors enthält.

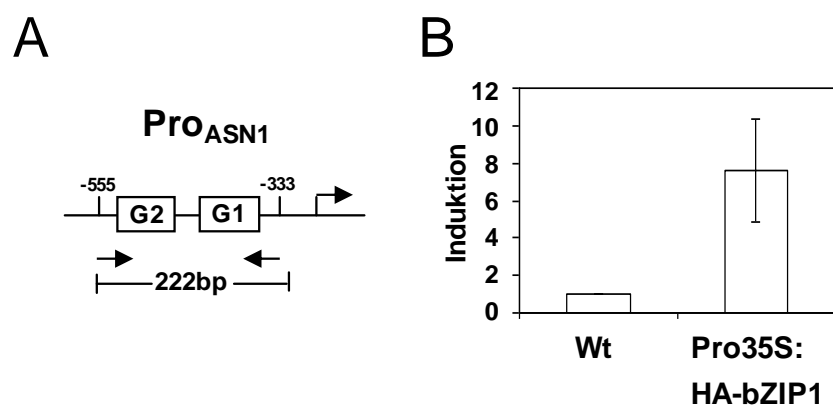


Abb. 5.31: *AtbZIP1* bindet direkt an den Promotor der *ASN1*

A: Schema des *ASN1* Promotors mit zwei benachbarten G-Boxen. Pfeile geben die Position der Primer für die Amplifikation des 222 bp großen PCR Fragments an.

B: Pflanzen für die Immunopräzipitation wurden 3-4 Wochen im Langtag angezogen und anschließend direkt geerntet. Nach der Immunopräzipitation mit einem ChIPgrade HA-Antikörper wurde eine qPCR der aufgereinigten DNA mit Primern durchgeführt, die das Fragment des *ASN1* Promotors mit den 2 G-Boxen umfassen. Dargestellt ist die Anreicherung dieses Fragments im Vergleich zum Wildtyp nach Abgleich mit Inputkontrolle und einem unspezifischen *Actin*-Gen (Wildtyp=1). Gezeigt wird Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass dieses Fragment nach der Immunopräzipitation in den Pro35S:*AtbZIP1* Pflanzen etwa 8fach angereichert ist, was eine deutliche Bindung von *AtbZIP1* an den Promotor der *ASN1* belegt (Abb. 5.31 B).

Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl *AtbZIP1*, als auch *AtbZIP53* direkt an den Promotor der *ASN1* binden und zu einer transkriptionellen Aktivierung der *ASN1* führen, was sich letztendlich auch auf die Asparaginnmengen in den Pflanzen auswirkt.

5.6 *ASN1* und *ProDH* werden auch im Protoplasten-System durch dunkelinduzierte Energieverarmung aktiviert

Das Protoplastensystem eignet sich gut, um schnell den Einfluss vieler unterschiedlicher Faktoren wie z.B. verschiedene Transkriptionsfaktoren oder verschiedene Stressbedingungen auf die Expression einzelner Gene *in vivo* zu testen.

Um herauszufinden, ob das System auch geeignet ist, um den Prozess der Energieverarmung während der verlängerten Nacht zu untersuchen wurden

Promotor:GUS Konstrukte der *ProDH* und der *ASN1* transient in *Arabidopsis* Mesophyllprotoplasten transformiert und die GUS-Expression nach Inkubation in konstantem Licht und konstantem Dunkel verglichen. Wie man in Abb. 5.32 sehen kann führt die Inkubation über Nacht im Dunkeln zu einer deutlich (3-4fachen) Aktivierung der GUS-Aktivität beider Promotor:GUS Konstrukte. Die Induktion von *ProDH* und *ASN1* durch dunkelinduzierte Energieverarmung kann also auch im Protoplastensystem reproduziert werden.

Energieverarmung kann auch andere Ursachen haben. So führt die Gabe des Photosynthese Inhibitors DCMU (3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-Dimethyl-Harnstoff) ebenfalls zu einem Mangel an Energie, da die Pflanze nicht mehr in der Lage ist Photosynthese zu betreiben. Diese Behandlung führt wie schon die Dunkelinduktion zu einer Aktivierung der beiden Promotor:GUS Konstrukte (Abb. 5.32). Um zu zeigen, dass diese Induktion durch Energieverarmung im Protoplastensystem spezifisch für *ProDH* und *ASN1* ist, wurde ein drittes Konstrukt als Kontrolle verwendet.

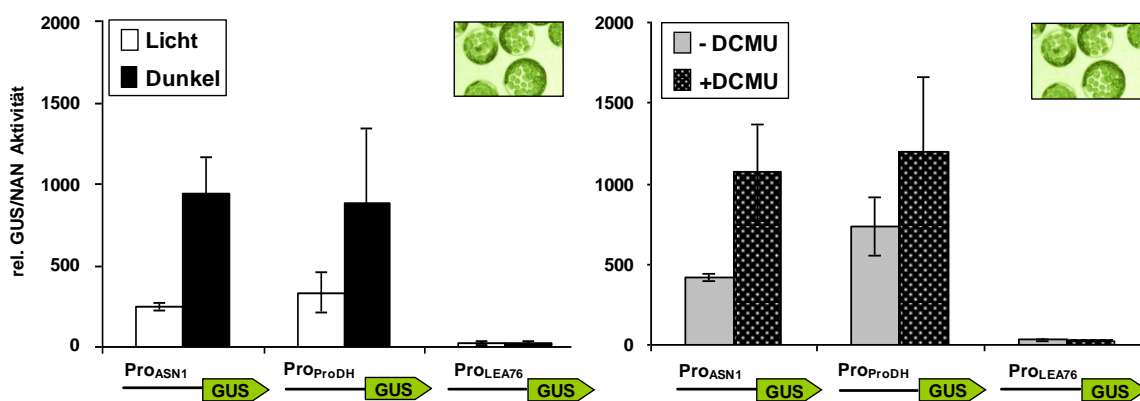


Abb. 5.32: *ASN1* und *ProDH* werden auch im Protoplastensystem durch dunkelinduzierte Energieverarmung aktiviert

Die Protoplasten wurden nach der Transformation über Nacht für 16 h in Dauerlicht (weiße Balken) oder Dauerdunkel (schwarze Balken) bzw. ohne DCMU (graue Balken) oder mit DCMU (gepunktete Balken) im WI Puffer inkubiert. Die Ansätze wurden mit je 5µg Reporterplasmid, 14µg leerem Effektorplasmid und 1µg Pro35S:NAN Vektor transformiert. Die Angaben zeigen die Mittelwerte von vier unabhängigen Transformationsansätzen. Das Experiment wurde mehrmals mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt.

Hierbei handelt es sich um den Promotor des *LEA76* (*LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT 76*) Gens, das wie *ProDH* und *ASN1* ein Zielgen von *AtbZIP53* ist, aber keine Rolle in der dunkelinduzierten Seneszenz sondern in der Samenentwicklung und Antwort auf Salzstress in der Wurzel spielt (Alonso et al., 2009). Wie erwartet zeigt dieses *ProLea76*:GUS Konstrukt keine Aktivierung nach Induktion durch Dunkelheit oder DCMU.

In stabil transformierten Pflanzen führt die Überexpression von *AtbZIP1* bzw. *AtbZIP53* zu einer verstärkten Expression von *ProDH* und *ASN1* während der verlängerten Nacht. Diese verstärkte Expression von sowohl *ProDH* als auch *ASN1* durch Überexpression von *AtbZIP53* lässt sich auch im Protoplastensystem reproduzieren. Sowohl im Licht, als auch im Dunkeln sowie nach Gabe von DCMU zeigte die Überexpression von *AtbZIP53* hier eine konstitutiv stärkere Aktivierung beider Promotor:GUS Konstrukte (Abb. 5.33 A,B). Die Überexpression von *AtbZIP1* zeigt dagegen im Protoplastensystem kaum Auswirkung auf die Aktivierung der beiden Konstrukte. Die GUS Aktivität ist hier nur geringfügig stärker als in der Kontrolle.

Um sicherzugehen, dass diese Unterschiede in der Aktivierung der Promotor:GUS Konstrukte in Protoplasten nicht auf die unterschiedlich starke Expression von *AtbZIP1* und *AtbZIP53* zurückzuführen ist, wurde eine Western Analyse durchgeführt, in der die Proteinmenge der beiden Transkriptionsfaktoren unter den getesteten Bedingungen verglichen wurde (Abb. 5.33 C). Die Proteinmenge von *AtbZIP1* ist im Vergleich zu der von *AtbZIP53* eher etwas größer. Dies kann also nicht die Unterschiede in der Aktivierung von *ProDH* und *ASN1* erklären. Da *AtbZIP1* auch in transgenen Pflanzen die Expression der beiden Gene erst während der verlängerten Nacht stark aktiviert hat, ist es möglich, dass in Protoplasten die Länge der Dunkelinduktion nicht ausreichend ist (nur über Nacht), oder andere wichtige Stimuli fehlen, die in der ganzen Pflanze vorhanden sind.

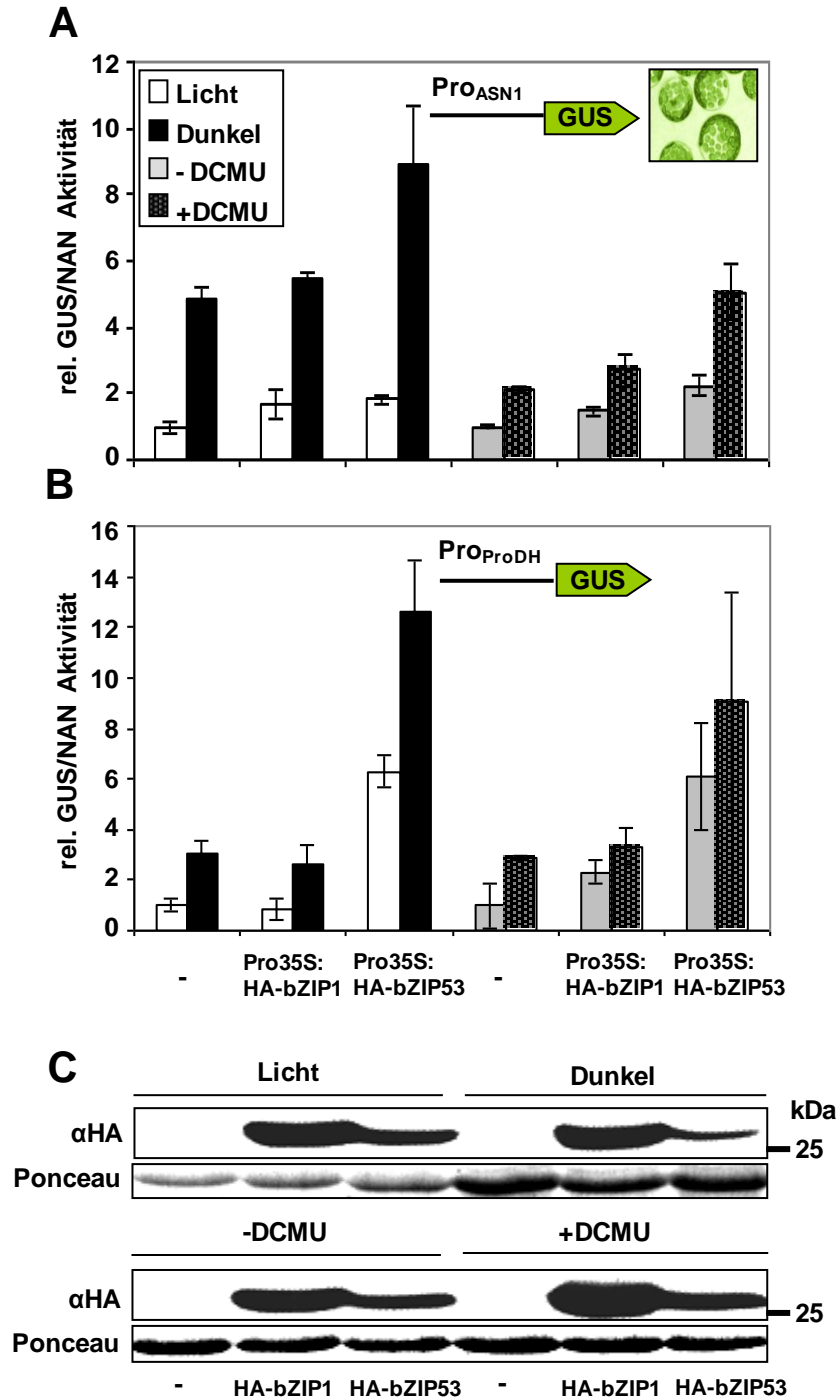


Abb. 5.33: *AtbZIP53* aktiviert auch im Protoplastensystem *ASN1* und *ProDH*, *AtbZIP1* dagegen kaum
 Die Protoplasten wurden nach der Transformation über Nacht für 16 h in A: Dauerlicht (weiße Balken) oder Dauerdunkel (schwarze Balken) bzw. B: ohne DCMU (graue Balken) oder mit DCMU (gepunktete Balken) im WI Puffer inkubiert. Die Ansätze wurden mit je 5µg Reporterplasmid, 14µg Effektorplasmid und 1µg Pro35S:NAN Vektor transformiert. Die Angaben zeigen die Mittelwerte von vier unabhängigen Transformationsansätzen. Das Experiment wurde mehrmals mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt.

C: Für den Western wurden die Protoplasten mit 40µg Effektorplasmid transformiert und jeweils 2 Transformationsansätze nach der Inkubation über Nacht in Harnstoffextraktionspuffer aufgenommen und vereinigt.

5.6.1 Auch andere bZIP Transkriptionsfaktoren können im Protoplastensystem *ProDH* und *ASN1* aktivieren

Die Ergebnisse der Expression von *ProDH* und *ASN1* nach Dunkelinduktion, die wir aus den qPCR Analysen gewonnen haben lassen sich mit dem Protoplastensystem einfach nachstellen. Jetzt kann dieses System angewendet werden, um mögliche weitere Faktoren zu finden, die einen Einfluss auf die Expression dieser Gene haben.

Kandidaten finden sich in den bZIP Transkriptionsfaktoren der Gruppen S1 und C. Die drei bZIP Faktoren *AtbZIP2*, *AtbZIP11* und *AtbZIP44* gehören wie *AtbZIP1* und *AtbZIP53* zur Gruppe S1 und sind eng miteinander verwandt. Von der Gruppe C ist bekannt, dass ihre vier Mitglieder *AtbZIP9*, *AtbZIP10*, *AtbZIP25* und *AtbZIP63* mit den fünf Transkriptionsfaktoren der Gruppe S1 Heterodimere bilden können und so möglicherweise gemeinsam die Expression ihrer Zielgene regulieren (Ehlert et al., 2006).

Im Protoplastensystem kann man nun einfach testen, ob eine transiente Überexpression dieser neun bZIP Transkriptionsfaktoren der Gruppen S1 und C zu einer Aktivierung des *ProProDH:GUS* und des *ProASN1:GUS* Konstrukts führt. Wie bereits in dem Vorexperiment gezeigt führt auch in diesem Experiment die Inkubation im Dunkeln zu einer deutlichen Steigerung der GUS-Aktivität (Abb. 5.34 A, B).

Die zusätzliche transiente Überexpression der einzelnen bZIP Faktoren hat dagegen sehr unterschiedlichen Einfluss auf die Aktivität der beiden Konstrukte. Während *AtbZIP2*, 11, 44 und 53 zu einer deutlichen Aktivierung der *ProDH* und einer schwächeren Aktivierung der *ASN1* sowohl im Licht wie auch im Dunkeln führen, hat die Überexpression von *AtbZIP1*, 9, 10, 25 und 63 nur relativ geringe Auswirkungen auf die Expression der beiden Gene. Für die *ProDH* führt von diesen fünf zuletzt genannten Faktoren lediglich die Expression von *AtbZIP10* zu einer etwas höheren GUS-Aktivität im Dunkeln und *AtbZIP63* hat eine etwas höhere Grundaktivität im Licht. Für die *ASN1* zeigt die Expression von *AtbZIP63* zumindest eine leichte Induktion im Vergleich zur Kontrolle, während *AtbZIP9*, *AtbZIP10* und *AtbZIP25* eher einen leicht negativen Effekt auf die Expression der *ASN1* im Protoplastensystem haben.

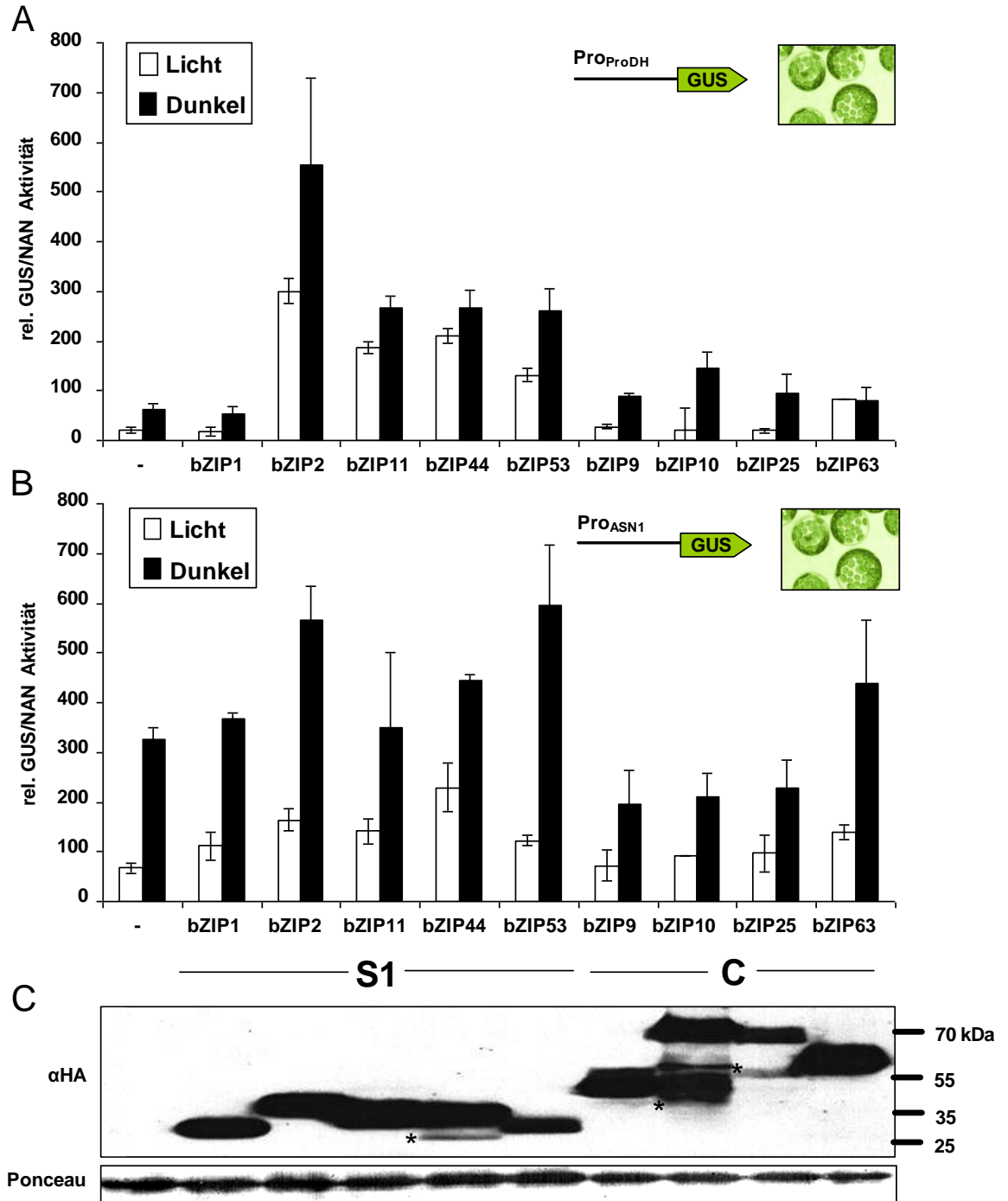


Abb. 5.34: bZIPs regulieren die Aktivität von ProDH und ASN1 im Protoplastensystem
 Die Protoplasten wurden nach der Transformation über Nacht für 16 h in Dauerlicht (weiße Balken) oder Dauerdunkel (schwarze Balken) inkubiert. Die Ansätze wurden mit je 5µg Reporterplasmid (A: ProProDH:GUS, B: ProASN1:GUS), 14µg Effektorplasmid und 1µg Pro35S:NAN Vektor transformiert. Die Angaben zeigen die Mittelwerte von vier unabhängigen Transformationsansätzen. Das Experiment wurde mehrmals mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt.

C: Für den Western wurden die Protoplasten mit 40µg Effektorplasmid transformiert und jeweils 2 Transformationsansätze nach der Inkubation über Nacht in Harnstoffextraktionspuffer aufgenommen und vereinigt. * kennzeichnet Abbauprodukte

Die gleichmäßige Expression der neun bZIP Transkriptionsfaktoren in Protoplasten wurde in einer Western Analyse überprüft (Abb. 5.34 C). Alle neun werden stark expremiert, und auch wenn für AtbZIP44 und AtbZIP25 eine leichte und für AtbZIP10 sogar mehrere sehr starke Abbauprodukte zu sehen sind, ist dennoch noch eine vergleichbare Überexpression dieser drei bZIP Faktoren gegeben.

Durch diese Protoplastenexperimente hat sich gezeigt, dass nicht nur AtbZIP53 im Protoplastensystem die Expression von *ProDH* und *ASN1* regulieren kann, sondern dass auch noch andere Faktoren dazu in der Lage sind. In wie weit dies auch Relevanz in der ganzen Pflanze während der verlängerten Nacht hat ist noch nicht geklärt. AtbZIP11 z.B. ist zwar ein starker Aktivator der *ProDH* im Protoplastensystem, seine Expression wird aber während der verlängerten Nacht herunter reguliert.

5.6.2 Eine G-Box im *ASN1* Promotor sowie zwei ACTCAT Motive und eine C-Box im *ProDH* Promotor sind notwendig für die Aktivierung der beiden Gene durch Dunkelheit

Das Protoplastensystem ist nicht nur geeignet, um den Einfluss verschiedener Stressbedingungen (wie z.B. Dunkelheit und DCMU) und Transkriptionsfaktoren (z.B. die neun bZIP Faktoren der Gruppe S1 und C) auf die Expression verschiedener Gene wie *ProDH* und *ASN1* zu testen, sondern ermöglicht auch eine genaue Analyse der Promotoren dieser Gene. Einzelne Elemente der zu untersuchenden Promotoren können hierfür mutiert werden, und die GUS-Aktivität dieser mutierten Promotor:GUS Konstrukte mit der der intakten Konstrukte verglichen werden.

Die ChIP-Experimente in Kapitel 5.5.3.3 haben gezeigt, dass in den Pro35S:AtbZIP1 Pflanzen ein 222 bp großes Fragment des *ASN1* Promotors angereichert wird. Dieses Fragment enthält zwei G-Boxen (CACGTG), für die bereits in der Literatur eine Bindung von bZIP Transkriptionsfaktoren gezeigt werden konnte (Baena-Gonzalez et al., 2007; Hanson et al., 2008).

Mutiert man die erste der beiden G-Boxen und transformiert dieses mutierte ProASN1:GUS Konstrukt in Protoplasten, so bekommt man keinerlei Dunkelinduktion

mehr und auch die Co-Transformation mit AtbZIP1 oder AtbZIP53 führt zu keiner Aktivierung des Promotors (Abb. 5.35).

Mutiert man aber die zweite G-Box im *ASN1* Promotor, so führt dies zu keiner Änderung im Vergleich zum wildtypischen *ASN1* Promotor. Dieses Konstrukt zeigt eine normale Dunkelinduktion und auch eine zusätzliche Aktivierung durch Co-Transformation mit AtbZIP53. Obwohl beide G-Box-Elemente exakt die gleiche Sequenz (CACGTG) haben führt ihre Mutation doch zu völlig unterschiedlichen Ergebnissen. Dies zeigt, dass nicht nur die Sequenzinformation allein wichtig für die Funktion ist, sondern anscheinend auch der Kontext des Promotors. Aus diesem Experiment und den zuvor durchgeführten ChIP-Experimenten kann man schließen, dass die bZIP Faktoren an die G1-Box des *ASN1* Promotors binden und so zu einer Aktivierung der Transkription der *ASN1* führen.

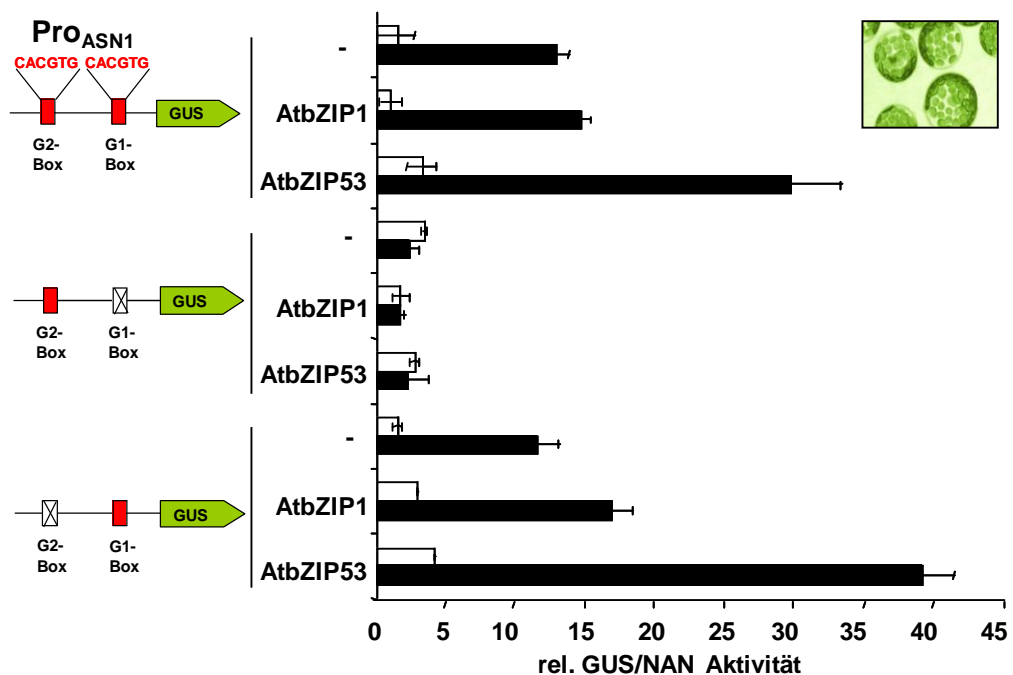


Abb. 5.35: Die dunkelinduzierte Aktivierung der *ASN1* hängt von der G1-Box ab

Die Protoplasten wurden nach der Transformation über Nacht für 16 h in Dauerlicht (weiße Balken) oder Dauerdunkel (schwarze Balken) inkubiert. Die Ansätze wurden mit je 5 µg Reporterplasmid, 14 µg Effektorplasmid und 1 µg Pro35S:NAN Vektor transformiert. Die Angaben zeigen die Mittelwerte von vier unabhängigen Transformationsansätzen. Das Experiment wurde mehrmals mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt. Rote Kästchen zeigen G-Boxen im Promotor, mutierte Boxen werden durch eine weiße Box mit Kreuz dargestellt. Dieser Versuch wurde von Andrea Ehlert durchgeführt.

Für die *ProDH* wurden ebenfalls ChIP Experimente durchgeführt (beschrieben in Kapitel 5.5.3.1). In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass ein 190 bp großes Fragment des *ProDH* Promotors in den Überexpressionspflanzen von AtbZIP1 nach der Immunopräzipitation angereichert wurde. Dieses Fragment enthält zwei ACTCAT Motive als mögliche Bindestellen für die bZIP Transkriptionsfaktoren.

Untersucht man ProProDH:GUS Konstrukte in Protoplasten, in denen jeweils nur eines dieser beiden Motive mutiert ist, so ist die GUS-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp-Promotor nur leicht reduziert. Es ist aber immer noch eine deutliche Induktion durch Dunkelheit oder durch Co-Transformation mit AtbZIP1 oder AtbZIP53 zu erkennen (Abb. 5.36). Mutiert man aber beide ACTCAT Motive gleichzeitig, so zeigt dieses neue Konstrukt keinerlei Induktion durch Dunkelheit oder durch Co-Transformation mit den beiden bZIP Transkriptionsfaktoren mehr.

Anders als beim *ASN1* Promotor hängt die Induktion des *ProDH* Promotor also nicht von einem einzigen Motiv ab, an das die bZIP Faktoren binden können, sondern beide ACTCAT Motive sind für die Expression der *ProDH* wichtig.

Schaut man sich den *ProDH* Promotor genauer an, so findet man außer den beiden ACTCAT Motiven auch noch eine C-Box als mögliche Bindestelle für bZIP Transkriptionsfaktoren (Anhang Tabelle 8.1). Mutiert man diese C-Box, so führt das wie schon die Mutation der einzelnen ACTCAT Motive lediglich zu einer leichten Reduktion der GUS-Aktivität. Mutiert man zusätzlich zur C-Box aber noch das ACT1- oder das ACT2-Motiv, wird die GUS-Aktivität wesentlich stärker reduziert. Diese Konstrukte zeigen zwar noch eine leichte Induktion durch Dunkelheit, die Gesamtaktivität ist aber sehr gering.

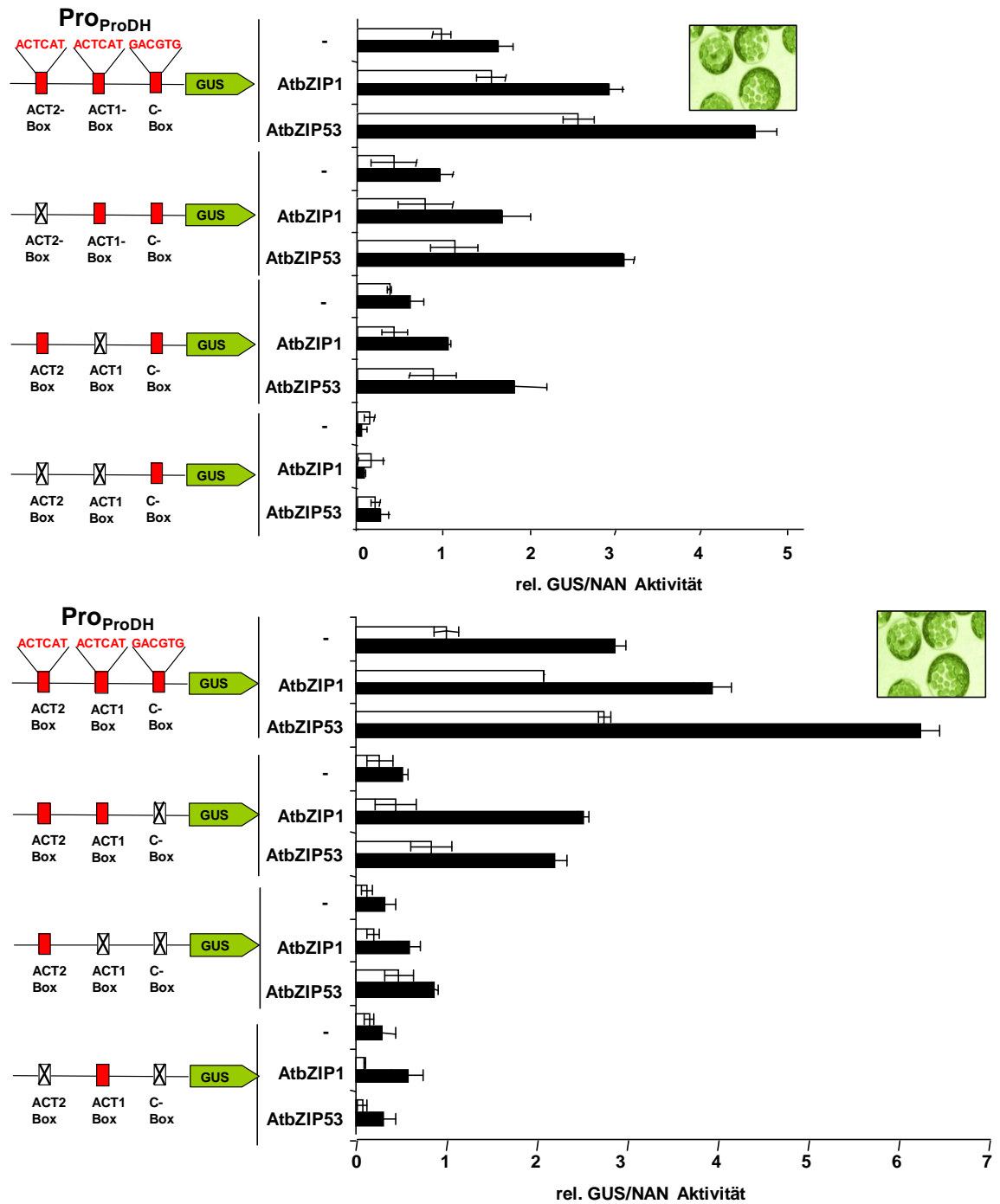


Abb. 5.36: Die Aktivierung der ProDH durch Dunkelheit hängt von zwei ACTCAT Elementen und einer C-Box ab

Die Protoplasten wurden nach der Transformation über Nacht für 16 h in Dauerlicht (weiße Balken) oder Dauerdunkel (schwarze Balken) inkubiert. Die Ansätze wurden mit je 5 µg Reporterplasmid, 14 µg Effektorplasmid und 1 µg Pro35S:NAN Vektor transformiert. Die Angaben zeigen die Mittelwerte von vier unabhängigen Transformationsansätzen. Das Experiment wurde mehrmals mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt. Rote Kästchen zeigen cis-Elemente im Promotor, mutierte Elemente werden durch eine weiß Box mit Kreuz dargestellt. Dieser Versuch wurde durchgeführt von Andrea Ehlert.

5.7 Verschiedene „loss-of-function“ Ansätze führen zu einer Reduktion der bZIP vermittelten Expression der Zielgene des Aminosäuremetabolismus

In allen bisher durchgeführten Versuchen erkennen wir deutlich, dass die Überexpression von *AtbZIP1* und *AtbZIP53* einen großen Einfluss auf verschiedene Stoffwechselwege des Primärmetabolismus hat. Die Einzelmutanten *atbzip1* und *atbzip53* sowie die Doppelmutante *atbzip1 atbzip53* zeigten aber bisher keine oder nur leichte Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp.

Schaut man sich die Abbildung der Genevestigator Analyse der bZIP Transkriptionsfaktoren während der verlängerten Nacht noch einmal an (Abb. 5.3), so kann man sehen, dass sehr viele der bZIP Faktoren unter den Bedingungen der verlängerten Nacht transkriptionell aktiviert werden.

All diese bZIP Transkriptionsfaktoren könnten möglicherweise redundante Funktionen in der Anpassung des Metabolismus während der verlängerten Nacht übernehmen, so dass eine Mutation von nur ein oder zwei dieser Faktoren, wie in der *atbzip1 atbzip53* Doppelmutante, von anderen Faktoren ausgeglichen werden kann.

5.7.1 Die Expression einer Fusion aus AtbZIP1 bzw. AtbZIP53 mit der EAR-Repressor-Domäne kann die dunkelinduzierte Aktivierung der *ProDH* verhindern

Um diese mögliche Redundanz der bZIP Transkriptionsfaktoren zu umgehen, wurden *AtbZIP1* und *AtbZIP53* mit einer EAR-Domäne (Hiratsu et al., 2003) fusioniert und transient in Protoplasten expremiert. Durch die EAR-Domäne werden die sonst als transkriptionelle Aktivatoren wirkenden bZIP Faktoren zu Repressoren und blockieren durch ihre massive Überexpression in den Protoplasten gleichzeitig die bZIP-Bindestellen des Promotors für andere endogene Transkriptionsfaktoren (Abb. 5.37 A). Die Expression von EAR-*AtbZIP1* in Protoplasten führt zu einer stark reduzierten Grundaktivität des Promotors im Licht und Dunkelheit (Abb. 5.37 B). Und auch die transiente Überexpression von EAR-*AtbZIP53* führte sowohl im Licht, als auch nach

Dunkelinduktion zu einer starken Reduktion der AtbZIP53 vermittelten *ProDH* Expression.

Die Expression der Fusionsproteine aus EAR-Domäne und bZIP Faktor wurde in einer Western Analyse kontrolliert (Abb. 5.37 C). Beide wurden sowohl im Licht als auch im Dunkeln exprimiert. Der direkte Vergleich der Expression mit der Expression der bZIP Proteine ohne EAR-Domäne ist nicht möglich, da die EAR-Konstrukte aus technischen Gründen nur zwei Wiederholungen des HA-Tags statt den normalen drei Wiederholungen haben. Dies führt zu einem schwächeren Signal im Western.

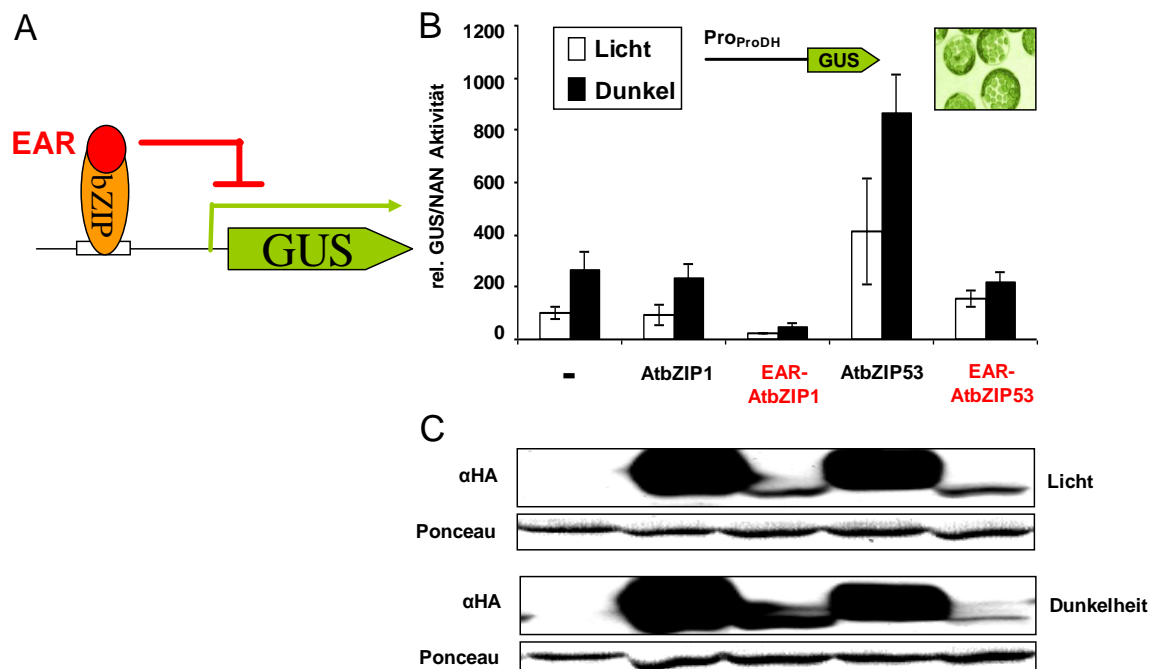


Abb. 5.37: Die Fusion von AtbZIP1 und AtbZIP53 mit der EAR-Domäne kann die Aktivierung der *ProDH* durch Dunkelheit inhibieren

A: Schema des EAR-Fusion Ansatzes. **B:** Die Protoplasten wurden nach der Transformation über Nacht für 16 h in Dauerlicht (weiß) oder Dauerdunkel (schwarz) inkubiert. Die Ansätze wurden mit je 5 µg Reporterplasmid, 14 µg Effektorplasmid und 1 µg Pro35S:NAN Vektor transformiert. Die Angaben zeigen die Mittelwerte von vier unabhängigen Transformationsansätzen. Das Experiment wurde mehrmals mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt. **C:** Für die Western Analyse wurden die Protoplasten mit 40 µg Effektorplasmid transformiert und jeweils zwei Transformationsansätze nach der Inkubation über Nacht in Harnstoffextraktionspuffer aufgenommen und vereinigt. Da die bZIPs mit EAR-Domäne in einem anderen Ausgangsvektor mit einem zweifachen statt eines dreifachen HA-tags vorliegen, kann das Signal in der Westernanalyse nicht direkt mit dem Signal der unfusionierten bZIPs verglichen werden.

Das Ergebnis der EAR-Domänen-Fusion zeigt, dass *AtbZIP1* und *AtbZIP53* an *cis*-Elemente des *ProDH* Promotors binden. Da die Doppelmutante *atbzip1 atbzip53* noch eine Induktion der *ProDH* zeigt, können möglicherweise andere redundante Faktoren die Funktion dieser beiden bZIP Transkriptionsfaktoren in der Mutante übernehmen, die im EAR-Domänen-Ansatz ihre Funktion nicht ausüben, da sie nicht an den Promotor binden können.

5.7.2 Vierfachmutanten von *AtbZIP1*, *AtbZIP53* und Mitgliedern der Gruppe C der bZIP Transkriptionsfaktoren führen zu einer deutlichen Reduktion der Expression von *ProDH*, *BCAT2* und *ASN1*

Parallel zum EAR-Domänen-Ansatz wurden Mehrfachmutanten von möglichst vielen der redundanten bZIP Transkriptionsfaktoren hergestellt. Gute zusätzliche Kandidaten zu *AtbZIP1* und *AtbZIP53* sind die vier Mitglieder der Gruppe C, von denen bekannt ist, dass sie mit den Mitgliedern der Gruppe S1, zu denen auch *AtbZIP1* und *AtbZIP53* gehören, heterodimerisieren.

Die Doppelmutante *atbzip1 atbzip53* wurde deshalb mit den Doppelmutanten *atbzip9 atbzip63* bzw. *atbzip10 atbzip25* (beide ebenfalls während dieser Dissertation hergestellt) gekreuzt. Die Vierfachmutanten (Anhang Kapitel 8.1.8) wurden mittels 3-Primer-PCR auf die Insertion der T-DNA untersucht und die homozygoten Linien für die weitere Analyse ausgewählt.

Um zu zeigen, dass die T-DNA-Insertion auch tatsächlich zu einer Reduktion des Transkripts führt, wurden mit Hilfe der qPCR die Transkriptmengen der einzelnen bZIP Faktoren in diesen Vierfachmutanten während der Dunkelinduktion bestimmt (Abb. 5.38). Deutlich ist hier wieder die transkriptionelle Aktivierung von *AtbZIP1* und *AtbZIP53* im Wildtyp während der verlängerten Nacht zu erkennen.

Während es sich bei der *atbzip1* Mutante um einen Knock-Out handelt, in dem keinerlei Transkript mehr zu detektieren ist, handelt es sich bei der *atbzip53* Mutante lediglich um einen Knock-Down. Die Insertion der T-DNA im Promotorbereich (Anhang Kapitel 8.1.8) führt nur zu einer Reduktion der Transkriptmenge von *AtbZIP53* auf etwa die Hälfte des Wildtyps (Abb. 5.38).

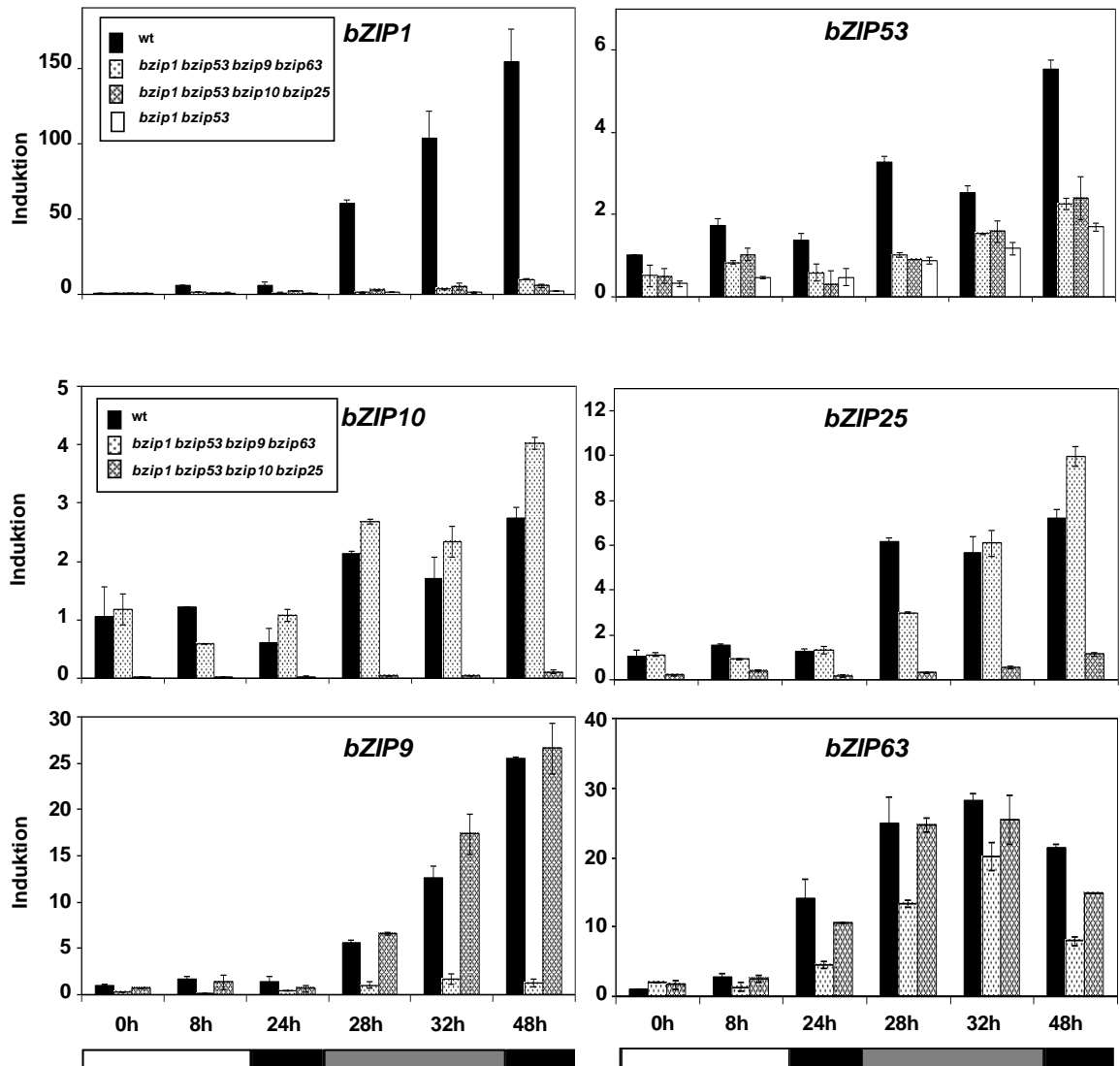


Abb. 5.38: Die Expression der bZIP Faktoren ist in den Doppel- und Vierfachmutanten deutlich reduziert

Die Pflanzen wurden 3-4 Wochen im Langtag angezogen und danach dunkel gestellt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils 8-10 Pflanzen geerntet und zusammen aufgearbeitet. Die Expression der oben genannten bZIP Faktoren wurde mit Hilfe der qPCR untersucht. Angegeben sind die relativen Werte im Vergleich zur Expression nach 0 Stunden Dunkelheit von je zwei Replikaten nach Abgleich mit dem Haushaltsgen *Ubiquitin*. Weißer Balken: normale Lichtphase (16h), schwarzer Balken: normale Nacht (8h), grauer Balken: verlängerte Nacht

AtbZIP10 wird in der *atbzip1 atbzip53 atbzip10 atbzip25* Vierfachmutante nicht mehr expremiert und auch die T-DNA-Insertion in das *AtbZIP25* Gen führt zu einer sehr starken Reduktion der Expression. *AtbZIP9* wird in der *atbzip1 atbzip53 atbzip9 atbzip63* Vierfachmutante ebenfalls nicht mehr expremiert, *AtbZIP63* ist allerdings wie *AtbZIP53* nur ein Knock-Down, d.h. hier findet während der verlängerten Nacht noch

eine Induktion des Transkripts durch Dunkelheit statt, auch wenn die Menge im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduziert ist (Abb. 5.38).

Phänotypisch zeigen beide Vierfachmutanten unter Standardwuchsbedingungen im Langtag keine Auffälligkeiten im Vergleich zum Wildtyp (hier exemplarisch für die *atbzip1 atbzip53 atbzip9 atbzip63* Mutante gezeigt, Abb. 5.39).

Ein Versuch eine Mutante herzustellen, in der *AtbZIP1*, *AtbZIP53* und die gesamte Gruppe C ausgeschaltet sind, scheiterte aber schon nach der ersten Generation. Bereits die Fünffachmutante, in der *AtbZIP1*, *AtbZIP53*, *AtbZIP9*, und *AtbZIP63* homozygot mutiert sind und lediglich *atbzip10* heterozygot ist, zeigte einen starken Zwergwuchs (Abb. 5.39). Eine vollständig homozygote Fünffachmutante konnte bisher trotz vieler Versuche nicht identifiziert werden.



Abb. 5.39: Phänotyp von Vierfach- und Fünffachmutanten des C/S1-bZIP Netzwerkes
Die Pflanzen wurden 3-4 Wochen im Langtag angezogen und anschließend phänotypisch begutachtet und fotografiert. Gezeigt sind Wildtyp (Wt), homozygote *atbzip1 atbzip53 atbzip9 atbzip63* Vierfachmutante und die Fünffachmutante, in der *atbzip1 atbzip53 atbzip9* und *atbzip63* homozygot sind und *atbzip10* heterozygot ist.

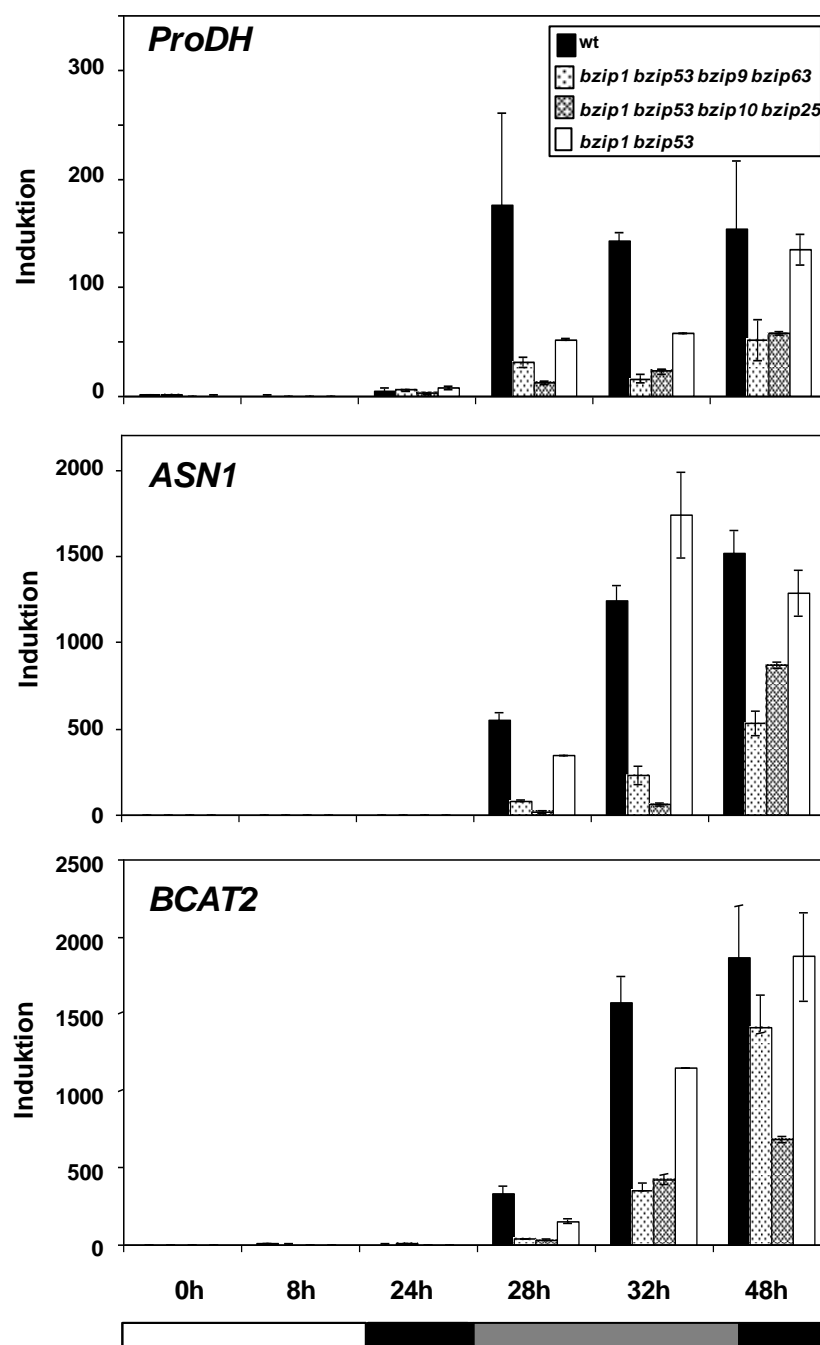


Abb. 5.40: Die Expression von *ProDH*, *ASN1* und *BCAT2* ist in beiden Vierfachmutanten des C/S1 bZIP Netzwerkes deutlich reduziert

Die Pflanzen wurden 3-4 Wochen im Langtag angezogen und danach dunkel gestellt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils 8-10 Pflanzen geerntet und zusammen aufgearbeitet. Die oben angegebenen Gene wurde mit Hilfe der qPCR untersucht. Angegeben sind die relativen Werte im Vergleich zur Expression nach 0 Stunden Dunkelheit von je zwei Replikaten nach Abgleich mit dem Haushaltsgen *Ubiquitin*. Weißer Balken: normale Lichtphase (16h), schwarzer Balken: normale Nacht (8h), grauer Balken: verlängerte Nacht

Eine Expressionsanalyse der drei Gene *ProDH*, *ASN1* und *BCAT2* während der verlängerten Nacht mittels qPCR zeigte deutlich, dass beide Vierfachmutanten in der Expression dieser Gene stark beeinträchtigt sind (Abb. 5.40). Für alle drei Gene sieht man die deutlich dunkelabhängige Induktion während der verlängerten Nacht. Wie bereits in den vorherigen Experimenten zeigt die Doppelmutante keinen Unterschied in der Expression der *ASN1* und der *BCAT2* im Vergleich zum Wildtyp und auch die *ProDH* Expression ist in der Doppelmutante nur geringfügig schwächer. In beiden Vierfachmutanten haben alle drei Gene besonders während der frühen Zeitpunkte der verlängerten Nacht (vier und acht Stunden) eine sehr deutlich reduzierte Expression. Nach länger anhaltender Dunkelheit (12 Stunden verlängerte Nacht) steigen aber auch in den Vierfachmutanten die Transkriptmengen von *ProDH*, *ASN1* und *BCAT2* deutlich an, auch wenn sie noch nicht an die Expressionsstärke im Wildtyp herankommen.

5.8 Bedeutung der beiden SnRK1-Kinasen KIN10 und KIN11 als mögliche Regulatoren der bZIP Transkriptionsfaktoren in der Anpassung an Energieverarmung

Obwohl sowohl AtbZIP1, als auch AtbZIP53 die Expression von *ASN1*, *ProDH* und *BCAT2* während der verlängerten Nacht regulieren können, zeigen sich in allen Experimenten doch auch deutliche Unterschiede zwischen den beiden Transkriptionsfaktoren. Während *AtbZIP53* während der verlängerten Nacht nur geringfügig transkriptionell aktiviert wird, führen schon geringe Steigerungen der Proteinmenge zu einer konstitutiven Aktivierung seiner Zielgene. Die Transkription von *AtbZIP1* dagegen wird sehr stark nach Dunkelheit hochreguliert. Eine Überexpression allein führt aber noch nicht zu einer konstitutiven Expression der Zielgene. Die Expression von *ProDH*, *ASN1* und *BCAT2* in den Überexpmierern von AtbZIP1 unterscheidet sich erst während der verlängerten Nacht wesentlich von der im Wildtyp. AtbZIP1 braucht also anscheinend eine posttranslationale Modifizierung um seine regulatorische Funktion ausüben zu können.

Erst kürzlich wurden die zwei Kinasen KIN10 und KIN11 als zentrale Regulatoren der Anpassung des pflanzlichen Metabolismus auf Energieverarmung nach Dunkelheit beschrieben (Baena-Gonzalez et al., 2007). In diesem Artikel wurde auch die *ASN1* als ein Ziel dieser KIN10/KIN11 vermittelten Anpassung an Energiemangelbedingungen gefunden. Es ist daher naheliegend zu spekulieren, dass diese beiden Kinasen möglicherweise eine regulatorische Funktion auf die bZIP Transkriptionsfaktoren ausüben, die dann wiederum ihre Zielgene wie z.B. die *ASN1* oder auch die *ProDH* direkt regulieren.

5.8.1 Die Expression von KIN10 bzw. KIN11 führt zu einer Aktivierung von *ProDH* und *ASN1* im Protoplastensystem

Um den Effekt der Kinasen auf die Expression der beiden Gene *ASN1* und *ProDH* näher zu untersuchen, wurde das Protoplastensystem verwendet.

Die transiente Überexpression von KIN10 und KIN11 führt hier zu einer sehr starken Steigerung der GUS-Aktivität beider Promotor:GUS Konstrukte, sowohl im konstanten Licht, als auch in konstanter Dunkelheit (Abb. 5.41 A). Durch die Überexpression der Kinasen braucht man also keinen zusätzlichen Stimulus z.B. durch Dunkelheit mehr, um *ProDH* und *ASN1* zu aktivieren.

Zur Kontrolle wurde auch das ProLea76:GUS Konstrukt getestet. Wie schon zuvor wird auch in diesem Versuch das Konstrukt nicht durch Dunkelheit aktiviert. Auch die Überexpression der beiden Kinasen zeigt keine Steigerung der GUS-Aktivität, obwohl sowohl KIN10 als auch KIN11 gut expremiert werden, wie der Western in der Abbildung zeigt (Abb. 5.41 B). Die Induktion der beiden Gene *ASN1* und *ProDH* durch die Kinasen ist also spezifisch.

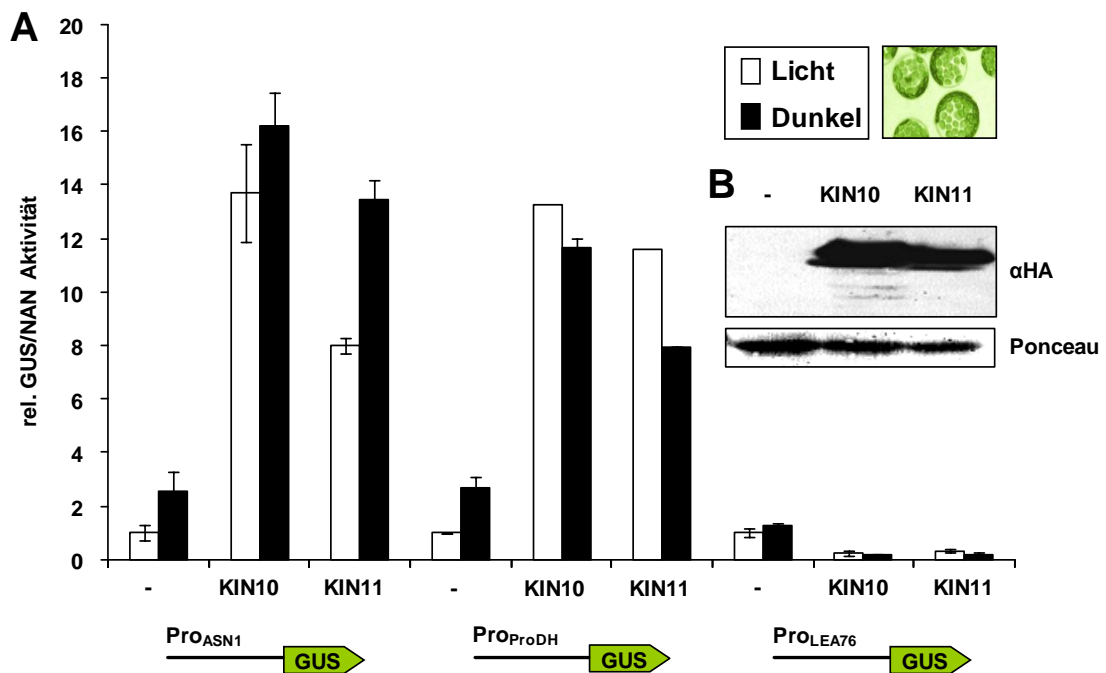


Abb. 5.41: KIN10 und KIN11 regulieren die Aktivität von ProDH und ASN1 im Protoplastensystem
A: Die Protoplasten wurden nach der Transformation über Nacht für 16 h in Dauerlicht (weiße Balken) oder Dauerdunkel (schwarze Balken) inkubiert. Die Ansätze wurden mit je 5 µg Reporterplasmid, 14 µg Effektorplasmid und 1 µg Pro35S:NAN Vektor transformiert. Die Angaben zeigen die Mittelwerte von vier unabhängigen Transformationsansätzen. Das Experiment wurde mehrmals mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt. **B:** Für die Western Analyse wurden die Protoplasten mit 40 µg Effektorplasmid transformiert und jeweils 2 Transformationsansätze nach der Inkubation über Nacht in Harnstoffextraktionspuffer aufgenommen und vereinigt.

5.8.2 KIN10 und KIN11 regulieren nicht die Transkription von *AtbZIP1* und *AtbZIP53*

Die nächste Frage ist jetzt, ob und wie KIN10 und KIN11 die Aktivität von *AtbZIP1* und 53 beeinflussen können. Die erste Möglichkeit ist, dass KIN10 und KIN11 die Transkription von *AtbZIP1* und *AtbZIP53* aktivieren. Um dies zu testen wurde ein Experiment durchgeführt, in dem KIN10 und KIN11 transient in Protoplasten überexprimiert wurden. Von diesen Protoplasten wurde RNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben und anschließend in der qPCR analysiert.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Transformation der Protoplasten mit KIN10 und KIN11 zu einer massiven Überexpression der beiden Kinasen führt (Abb. 5.42).

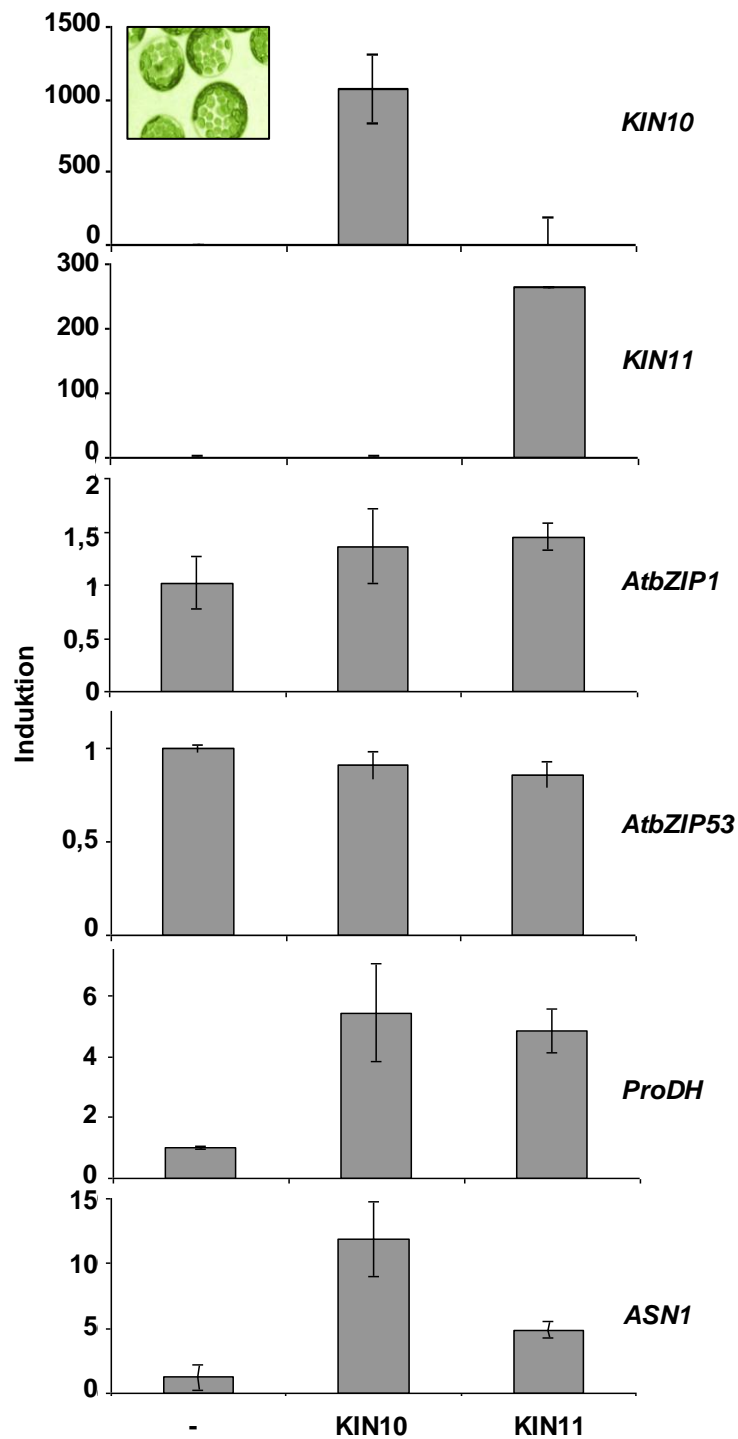


Abb. 5.42: *KIN10* und *KIN11* regulieren die Transkription von *ProDH* und *ASN1* nicht aber die Transkription von *AtbZIP1* und *AtbZIP53*

Protoplasten wurden mit je 5µg Reporterplasmid, 14µg Effektorplasmid und 1µg Pro35S:NAN Vektor transformiert und über Nacht für 16 h in WI Puffer inkubiert. Anschließend wurden je vier Ansätze vereinigt und für die RNA Extraktion und cDNA Synthese verwendet. Die oben angegebenen Gene wurden anschließend mit Hilfe der qPCR analysiert. Die Angaben zeigen die Mittelwerte von zwei Experimenten. Angegeben sind die relativen Werte im Vergleich zur Expression in der Negativ-Kontrolle (-) nach Abgleich mit dem Haushaltsgen *Ubiquitin*.

Die Transkription von *AtbZIP1* und *AtbZIP53* wird durch diese Überexpression aber nicht beeinflusst. Dagegen ist sowohl durch die Überexpression von KIN10 als auch durch die Überexpression von KIN11 eine Induktion der Zielgene *ProDH* und *ASN1* zu erkennen, was das Ergebnis aus dem vorherigen Protoplastenexperiment bestätigt, dass KIN10 und KIN11 einen großen Einfluss auf die Expression der beiden Gene haben. Dies geschieht allerdings nicht über eine transkriptionelle Aktivierung der beiden bZIP Transkriptionsfaktoren.

5.8.3 Die Mutation putativer SnRK-Phosphorylierungsstellen in *AtbZIP1* bzw. *AtbZIP53* hat keinen Einfluss auf die Aktivierung der *ProDH*

Eine weitere Möglichkeit ist, dass KIN10 und KIN11 die beiden bZIP Faktoren posttranslational modifizieren, indem sie sie phosphorylieren. In Huang und Huber (2001) werden typische Phosphorylierungsmotive von Kinasen der SnRK Familie, zu denen auch KIN10 und KIN11 gehören, beschrieben. Sie zeichnen sich durch ein oder zwei Serine/Threonine aus, die von hydrophoben und basischen Aminosäuren an definierten Positionen umgeben sind (Abb. 5.43 A).

In der Aminosäuresequenz von *AtbZIP1* und *AtbZIP53* finden sich viele Serine und Threonine (Anhang Kapitel 8.1.4 und 8.1.5). Untersucht man die umliegenden Aminosäuren um diese Serine/Threonine, so findet sich bei beiden Transkriptionsfaktoren am C-terminalen Ende ein Bereich, der relativ gut mit einer der vorhergesagten Aminosäuresequenzen aus der Veröffentlichung von Huang und Huber (2001) übereinstimmt (Abb. 5.43 B).

Sollten die Kinasen während der Dunkelheit tatsächlich die beiden bZIP Transkriptionsfaktoren an diesen Serinen phosphorylieren und damit ihre Aktivität beeinflussen, so sollte eine Mutation dieser Serine dazu führen, dass die bZIP Faktoren ihre regulatorische Funktion auf die Expression ihrer Zielgene nicht mehr ausüben können. Um dies zu testen wurden die beiden in Abb. 5.43 B dargestellten Serine aus *AtbZIP1* und *AtbZIP53* in Zusammenarbeit mit Johanna Lendner gegen Alanin ausgetauscht (Lendner, 2009). Diese Mutation sollte eine etwaige Phosphorylierung durch KIN10 und/oder KIN11 an dieser Stelle verhindern.

A

Ba-Hy-P-Ba-X-X-S-X-X-X-Hy-X-Ba

Hy-X-Ba-X-X-T/S-Hy-X-Ba-Hy-X-S-X-X-X-Hy

B

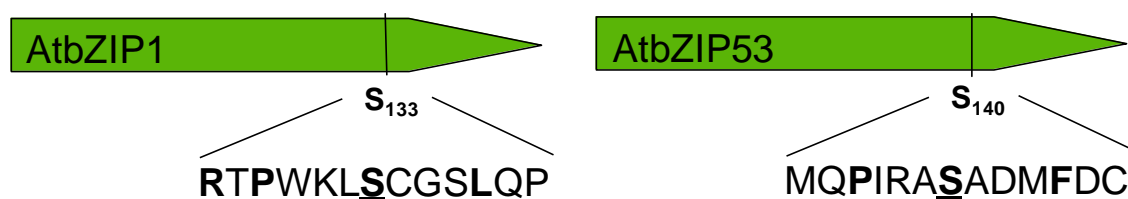


Abb. 5.43 *AtbZIP1* und *AtbZIP53* haben putative SnRK-Phosphorylierungsmotive in ihrer Aminosäuresequenz

A: Zwei typische Phosphorylierungsmotive der SnRK Kinasen (aus Huang und Huber, 2001); S = Serin, T = Threonin, P = Prolin, Ba = basische Aminosäure, Hy = hydrophobe Aminosäure, X = beliebige Aminosäure.

B: Putative SnRK-Phosphorylierungsmotive in *AtbZIP1* und *AtbZIP53*. Das unterstrichene Serin kennzeichnet die mögliche Phosphorylierungsstelle. Fettgedruckte Aminosäuren stimmen mit den vorhergesagten Aminosäuren aus der Sequenz von Huang und Huber (2001) überein.

Zusätzlich wurden Konstrukte hergestellt, in denen die entsprechenden Serine durch Aspartat ausgetauscht wurden. Dieses sollte eine konstitutive Phosphorylierung nachahmen (Furihata et al., 2006). Es ist allerdings bekannt, dass dieser Ansatz nicht immer zu einer konstitutiven Aktivierung führt. Alle unsere Aspartat-Mutanten verhielten sich in den folgenden Versuchen so wie die Alanin-Mutanten, so dass die Ergebnisse für die Aspartat-Mutanten hier nicht extra aufgeführt werden.

In Protoplasten wurde dann getestet, ob die mutierten bZIP Transkriptionsfaktoren trotz des durch Alanin ausgetauschten Serins immer noch die gleichen Aktivierungseigenschaften für ihr Zielgen die *ProDH* besitzen. Da KIN10 während der vorherigen Versuche immer die stärkeren Effekte gezeigt hat, wurde in diesem Versuch nur diese Kinase verwendet, um den Effekt auf die bZIP vermittelte *ProDH* Expression zu untersuchen. Die Inkubation der Protoplasten fand über Nacht im Dauerlicht statt, da die Überexpression der Kinase in Protoplasten die Induktion durch Dunkelheit überflüssig macht. Zusätzliche Dunkelinduktion führte in vorherigen Experimenten

kaum noch zu einer Steigerung der *ProDH* Aktivität (Abb. 5.41). Wie in vorherigen Protoplastenexperimenten auch, führt die Überexpression von AtbZIP1 (Abb. 5.44 A) lediglich zu einer geringen Aktivierung der *ProDH*, während AtbZIP53 (Abb. 5.44 B) und natürlich auch KIN10 zu einer starken Steigerung der *ProDH* Aktivität führen. Die Expression von AtbZIP1 zusammen mit der Kinase KIN10 führt aber ebenso wie die Co-Expression von AtbZIP53 und KIN10 zu einer deutlich stärkeren Aktivität als KIN10 allein. AtbZIP1 und AtbZIP53 können also die KIN10 vermittelte Expression der *ProDH* verstärken.

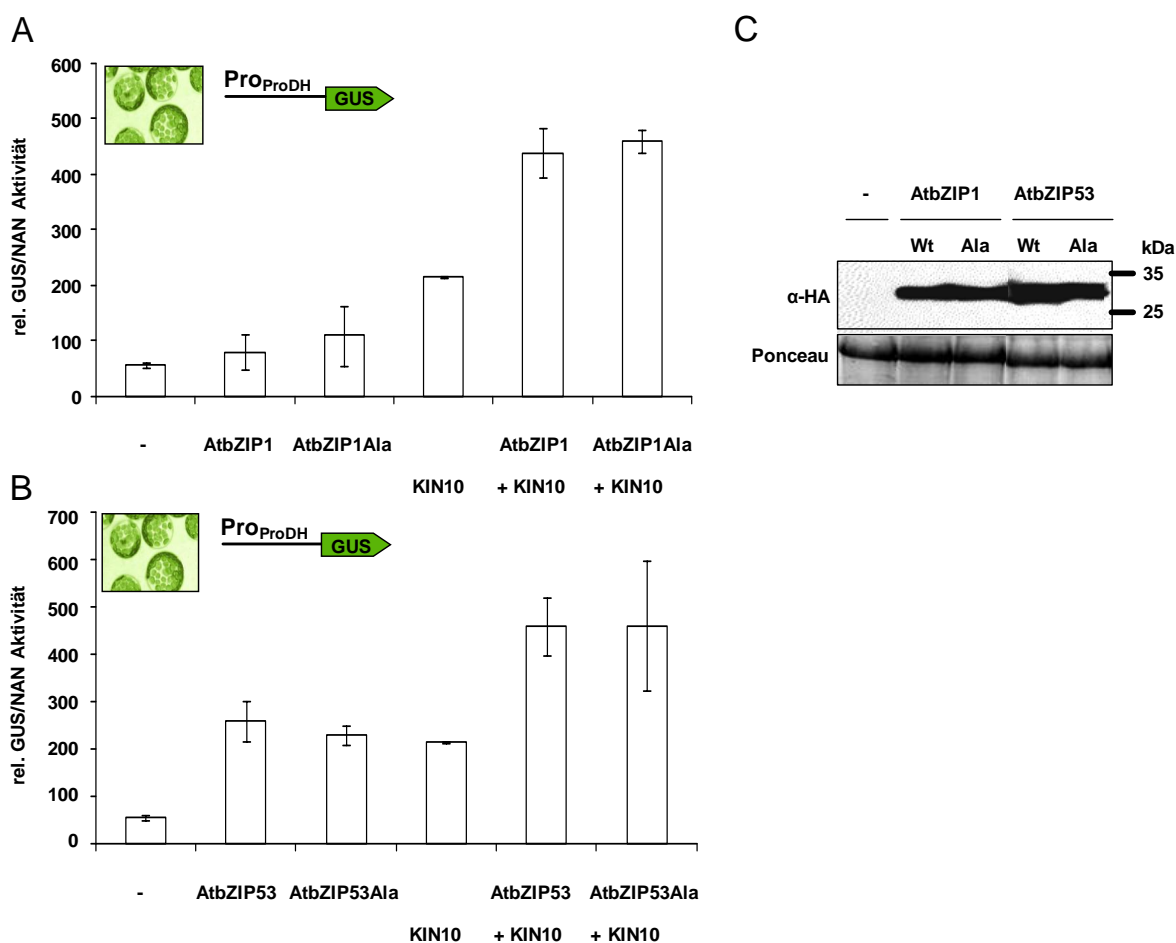


Abb. 5.44: Die Mutation der putativen SnRK-Phosphorylierungsstellen in AtbZIP1 und AtbZIP53 hat keinen Einfluss auf die bZIP vermittelte Aktivierung der *ProDH*

A/B: Protoplasten wurden nach der Transformation über Nacht für 16 h in Dauerlicht inkubiert. Die Ansätze wurden mit je 5µg Reporterplasmid, 14µg Effektorplasmid (7µg pro Effektor, wenn nur ein Effektorplasmid zugegeben wurde, wurde mit 7µg leerem Effektorplasmid aufgefüllt) und 1µg Pro35S:NAN Vektor transformiert. Die Angaben zeigen die Mittelwerte von vier unabhängigen Transformationsansätzen. Das Experiment wurde mehrmals mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt. **C:** Für die Western Analyse wurden die Protoplasten mit 40µg Effektorplasmid transformiert und jeweils zwei Transformationsansätze nach der Inkubation über Nacht in Harnstoffextraktionspuffer aufgenommen und vereinigt.

Allerdings ist diese Expression der *ProDH* unabhängig von einer Phosphorylierung der Serine 133 in AtbZIP1 und 140 in AtbZIP53. Die Alanin-Mutanten von AtbZIP1 und AtbZIP53 weisen die gleichen Aktivierungsschaften wie die unmutierten bZIP Transkriptionsfaktoren auf.

Wildtypprotein und Alanin-Mutante von AtbZIP1 und AtbZIP53 werden aber beide expremiert und zeigen etwa gleich starke Proteinbanden in der Western Analyse (Abb. 5.44 C).

Ob möglicherweise andere Serine in AtbZIP1 und/oder AtbZIP53 existieren, die nicht den von Huang und Huber (2001) beschriebenen Phosphorylierungsmotiven entsprechen, aber ebenfalls durch KIN10 phosphoryliert werden können, kann zu diesem Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden (Anhang Kapitel 8.1.4 und 8.1.5).

5.8.4 Die Mutation putativer SnRK-Phosphorylierungsstellen in AtbZIP63 führt zu einer Reduktion der *ProDH* Expression

Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Kinasen KIN10 und KIN11 gar nicht direkt AtbZIP1 und AtbZIP53 phosphorylieren, sondern andere Signalkomponenten wie z.B. mögliche Heterodimerisierungspartner der beiden Transkriptionsfaktoren.

Ein guter Kandidat hierfür ist AtbZIP63. Im Labor unseres Kooperationspartners M. Teige (Universität Wien) konnte bereits gezeigt werden, dass die Kinasen KIN10 und KIN11 mit AtbZIP63 interagieren. Eine genauere Analyse konnte bisher vier Serine in der Aminosäuresequenz von AtbZIP63 identifizieren, die *in vivo* phosphoryliert werden. Dies sind Serin 29, 59, 261 und 300 (persönliche Mitteilung, Anhang Kapitel 8.1.6). Alle vier Serine umgeben Aminosäuren, die gut zu den SnRK-Phosphorylierungsmotiven aus Huang und Huber (2001) passen. Besonders das Motiv um Serin 300 erfüllt perfekt diese Aminosäureabfolge (Abb. 5.45; Abb. 5.43 A).

Während die Mutation der Serine in AtbZIP1 und AtbZIP53 keinen Einfluss auf die Aktivierung des ProProDH:GUS Konstrukts hat, kann man mit der Mutante von

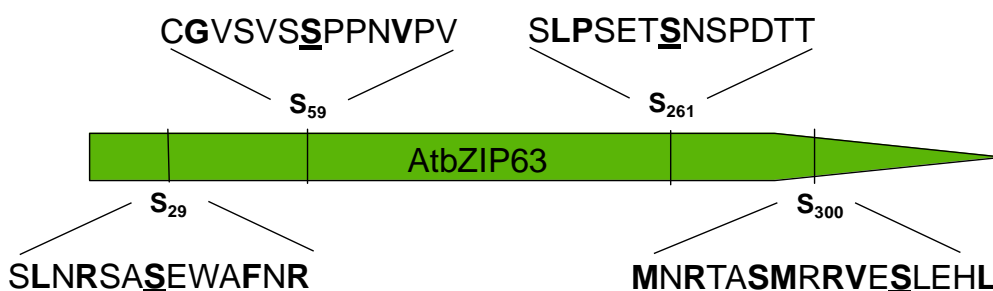


Abb. 5.45: *in vivo*-Phosphorylierungsmotive in AtbZIP63

Das unterstrichene Serin kennzeichnet die jeweilige Phosphorylierungsstelle. Fettgedruckte Aminosäuren stimmen mit den vorhergesagten Aminosäuren aus der Sequenz von Huang und Huber (2001) überein.

AtbZIP63, in der alle 4 *in vivo* phosphorylierten Serine durch Alanin ausgetauscht sind, sehr wohl einen Effekt sehen (Abb. 5.46). Die Mutation von S300 wurde bereits während der Diplomarbeit von Johanna Lendner angefertigt, die anderen drei Mutationen wurden von Christina Chaban (Universität Tübingen) durch zusätzliche Mutagenese eingefügt.

Die KIN10 vermittelte Steigerung der *ProDH*-Aktivität kann durch Co-Expression mit AtbZIP63 fast verdoppelt werden. Eine Co-Expression mit der Alanin-Mutante zeigt dagegen nur eine schwache Steigerung. Hier ist die *ProDH*-Aktivität nur fast genauso stark wie durch Expression der Kinase allein. Die vier Serine von AtbZIP63 und möglicherweise auch deren Phosphorylierungen haben also eine wichtige regulatorische Funktion für die Kinase-vermittelte Aktivierung der *ProDH*.

Um zu zeigen, dass dieser Unterschied in der GUS-Aktivität des ProProDH:GUS Konstrukts nicht auf eine unterschiedlich starke Expression der verschiedenen bZIP-Proteine zurückzuführen ist, wurde eine Western Analyse durchgeführt.

Die Expression der Mutationen von AtbZIP63 war dabei vergleichbar mit der Expression der wildtypischen Proteine (Abb. 5.46 B). Die Bande des mutierten AtbZIP63 Proteins ist aber etwas mobiler und läuft deshalb im Gel etwas schneller als die Wildtyp AtbZIP63 Bande. Möglicherweise ist dies auf die fehlenden vier Phosphorylierungen in der Alanin-Mutante zurückzuführen.

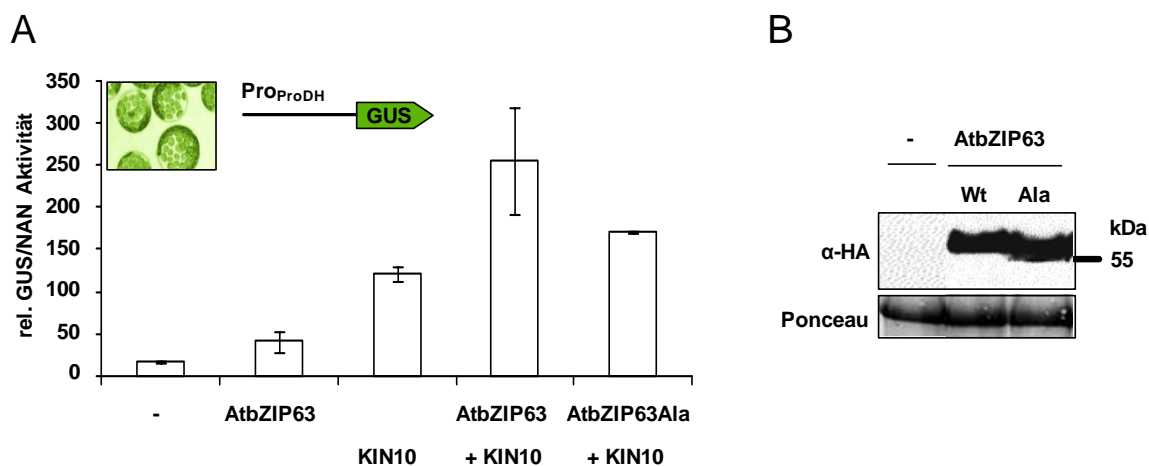


Abb. 5.46: Mutation von S29, S59, S261 und S300 in AtbZIP63 führt zu einer Reduktion der ProDH Aktivierung durch diesen Transkriptionsfaktor

A: Protoplasten wurden nach der Transformation über Nacht für 16 h in Dauerlicht inkubiert. Die Ansätze wurden mit je 5 μ g Reporterplasmid, 14 μ g Effektorplasmid (7 μ g pro Effektor, wenn nur ein Effektorplasmid zugegeben wurde, wurde mit 7 μ g leerem Effektorplasmid aufgefüllt) und 1 μ g Pro35S:NAN Vektor transformiert. Die Angaben zeigen die Mittelwerte von vier unabhängigen Transformationsansätzen. Das Experiment wurde mehrmals mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt. **B:** Für den Western wurden die Protoplasten mit 40 μ g Effektorplasmid transformiert und jeweils zwei Transformationsansätze nach der Inkubation über Nacht in Harnstoffextraktionspuffer aufgenommen und vereinigt.

Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die beiden Kinasen nicht direkt AtbZIP1 und AtbZIP53 sondern ihren Heterodimerisierungspartner AtbZIP63 phosphorylieren. Diese Phosphorylierung scheint auch dafür wichtig zu sein, dass AtbZIP63 zusammen mit KIN10 die *ProDH* aktivieren kann (Abb. 5.46). Können die Serine von AtbZIP63 wie im Fall der Alanin-Mutante nicht durch KIN10 phosphoryliert werden, so hat die Expression von AtbZIP63 keinen zusätzlichen Einfluss auf die KIN10-vermittelte *ProDH* Expression.

6 Diskussion

6.1 Protoplasten und transgene Pflanzen: Vor- und Nachteile zweier Modellsysteme zur Untersuchung von Energiemangel in Pflanzen

Eine Beteiligung der Gruppe S1 bZIP Transkriptionsfaktoren an der KIN10/KIN11 vermittelten dunkelinduzierten Aktivierung der *ASN1* konnte durch transiente Überexpressionen der bZIP Faktoren und Kinasen im Protoplastensystem demonstriert werden (Baena-Gonzales et al., 2007). Versuche zur Energieverarmung im Protoplastensystem wurden auch in der vorliegenden Arbeit erfolgreich durchgeführt. Die Aktivierung von *ProDH* und *ASN1* durch Dunkelheit und den Photosynthese Inhibitor DCMU konnte mit diesem System gezeigt werden. Die Überexpression von *AtbZIP53* führt in Protoplasten ebenso wie in transgenen Pflanzen zu einer konstitutiven Aktivierung von *ProDH* und *ASN1* in Licht und Dunkelheit. Die Überexpression von *AtbZIP1* hat in Protoplasten dagegen nur geringe Auswirkungen auf die Expression dieser beiden Gene. Transgene Pro35S:*AtbZIP1* Pflanzen zeigten zwar während der Lichtphase ebenfalls keine deutlichen Unterschiede zum Wildtyp, während der verlängerten Nacht kam es aber zu einer verstärkten Induktion der *ProDH* und *ASN1* im Vergleich zum Wildtyp. Möglicherweise fehlen in Protoplasten weitere Faktoren, die zu einer Aktivierung von *AtbZIP1* benötigt werden, oder aber die Dunkelinduktion über Nacht (ca. 16h) reicht nicht aus, um die Zielgene zu aktivieren. Auch in transgenen Pflanzen konnte erst nach einigen Stunden der verlängerten Nacht eine verstärkte Expression von *ProDH* und *ASN1* beobachtet werden. Die Stärke der Genaktivierung hängt dabei ganz entscheidend von den untersuchten Zeitpunkten ab. Hier werden die Limitierungen des Protoplastensystems deutlich. Trotz aller Vorteile die es bietet (kostengünstiges, schnelles System zur transienten Transformation, Möglichkeit viele Faktoren auf einmal zu testen, Auswirkungen unterschiedlichster Bedingungen wie Energiemangel, Salzstress, Hormonbehandlungen etc.), gibt es doch auch deutliche Nachteile. Es handelt sich um ein artifizielles System, in dem die Expression unabhängig von ihrer natürlichen Gewebe oder Kompartiment untersucht

wird. Durch die Protoplastierung werden die Zellen gestresst und in einem Puffer inkubiert, der ebenfalls einen Einfluss auf die Induktion der untersuchten Gene haben kann. Zudem kann lediglich eine Überexpression der Proteine durchgeführt werden. „Loss-of-function“ Ansätze sind dagegen nicht möglich. Das Protoplastensystem kann also nur erste Hinweise liefern, die anschließend in transgenen Pflanzen reproduziert werden müssen. Das Beispiel von AtbZIP1 zeigt, dass sich die Ergebnisse dort von den Ergebnissen in Protoplasten deutlich unterscheiden können.

Transgene Pflanzen bieten außerdem die Möglichkeit Wuchstypen zu beobachten, die auch auf die physiologische Bedeutung der untersuchten Proteine hinweisen können. Pflanzen, die die bZIP Transkriptionsfaktor AtbZIP1 oder AtbZIP53 überexprimieren, zeigen z.B. einen deutlich verfrühten Eintritt in die dunkelinduzierte Seneszenz. Ein ähnlicher Phänotyp der Überexpressionspflanzen wurde während der natürlichen, entwicklungsbedingten Seneszenz dagegen nicht beobachtet. Parallelen zwischen dem Transkriptom dunkelinduzierter Pflanzen und dem Transkriptom einer durch Zuckerverarmung in die Seneszenz getriebenen Zellkultur weisen darauf hin, dass die dunkelinduzierte Seneszenz auf einen Zuckermangel zurückzuführen ist (Swidzinski et al., 2002). Zuckermangel, wie er während langer Inkubation in Dunkelheit auftritt, induziert die Expression von AtbZIP1 und AtbZIP53 und auch Gruppe C bZIP Transkriptionsfaktoren wie AtbZIP63 werden stark unter diesen Bedingungen aktiviert. Während der natürlichen Seneszenz kommt es dagegen zu keiner Induktion dieser Faktoren. Die Expression von AtbZIP63 wird während der natürlichen Seneszenz sogar reprimiert (Weltmeier, 2005).

Diese Daten sprechen dafür, dass die Überexpression von AtbZIP1 und 53 zu einer Aktivierung physiologischer Prozesse führt, die eine wichtige Rolle in der Anpassung an eine dunkelinduzierten Energieverarmung spielen. Für die Ausprägung der natürlichen Seneszenz scheinen sie dagegen keine Bedeutung zu haben.

6.2 Die beiden Transkriptionsfaktoren AtbZIP1 und AtbZIP53 werden transkriptionell und posttranskriptionell durch Energieverarmung aktiviert

Bedingungen wie langanhaltende Dunkelheit führen zur Aktivierung einer ganzen Reihe von bZIP Transkriptionsfaktoren. Die stärkste transkriptionelle Aktivierung aller 75 bZIP Faktoren zeigte dabei AtbZIP1. Schon nach 4 Stunden der verlängerten Nacht wird die Expression von AtbZIP1 deutlich induziert. Zu diesem Zeitpunkt ist die gespeicherte Stärke vollständig verbraucht und ein deutlicher Energiemangel spürbar (Usadel et al., 2008). Die Transkription seines nächsten Verwandten, AtbZIP53, wird ebenfalls, wenn auch deutlich schwächer, durch Dunkelheit aktiviert. Andere Mitglieder der Gruppe S1 zeigen dagegen nur geringe Änderungen ihrer Transkription oder wurden während der verlängerten Nacht sogar reprimiert. Aus diesem Grund wurden AtbZIP1 und AtbZIP53 als mögliche transkriptionelle Regulatoren unter Energiemangelbedingungen für die weiteren Analysen ausgewählt.

Um zu testen, ob die transkriptionelle Aktivierung von AtbZIP1 und AtbZIP53 durch Dunkelheit oder durch die daraus resultierende Zuckerverarmung ausgelöst wird, wurden bereits Fütterungsexperimente mit Zuckern durchgeführt (Weltmeier, 2005). Dabei konnte gezeigt werden, dass Saccharose und Glukose, nicht aber 3-Orthomethylglukose (OMG) in der Lage sind, die durch Energiemangelbedingungen nach zwei Tagen Dunkelheit ausgelöste Expression von AtbZIP1, und in geringerem Maß auch von AtbZIP53, zu reprimieren. Diese Ergebnisse wurden vor kurzem durch Kang et al. (2010) bestätigt. OMG ist ein Derivat der Glukose, das von der Zelle aufgenommen, aber nicht metabolisiert wird. OMG führt auch nicht wie Glukose oder Saccharose zu einer Aktivierung des Hexokinase abhängigen Zuckersignalwegs (Cortes et al., 2003), was zu der Vermutung führt, dass die transkriptionelle Aktivierung von AtbZIP1 während der verlängerten Nacht durch Zuckermangel über einen Hexokinase-abhängigen Signalweg induziert wird. In Übereinstimmung damit wurde kürzlich durch Kang et al. (2010) gezeigt, dass die Repression der Transkription von *AtbZIP1* durch Glukose in der *gin2* Mutanten der Hexokinase nur noch eingeschränkt funktioniert.

Transkriptomstudien zeigen, dass bereits kleinste Änderungen im Energiezustand der Pflanze zu einer massiven Änderung der Genexpression führen (Usadel et al., 2008).

Auch *AtbZIP1* und *AtbZIP53* wurden in dieser Studie transkriptionell aktiviert und als mögliche Regulatoren der Anpassung an Energiemangelbedingungen beschrieben. Es konnte dabei gezeigt werden, dass *AtbZIP1* nicht nur durch die Verfügbarkeit von Zuckern, sondern auch durch die innere Uhr transkriptionell reguliert wird. Diese Regulation von *AtbZIP1* durch die innere Uhr wurde auch durch eine bioinformatische Netzwerkanalyse bestätigt (Gutierrez et al., 2008). Es konnte zusätzlich durch ChIP Analysen gezeigt werden, dass CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1), eine der Hauptkomponenten der inneren Uhr (Yakir et al., 2007), direkt an den *AtbZIP1* Promotor bindet (Gutierrez et al., 2008).

Obwohl noch einige Untersuchungen dafür fehlen, deutet vieles darauf hin, dass ein regulatorisches Netzwerk existiert, welches Kohlenstoff- und Stickstoffverfügbarkeit der Pflanze sowie den durch die innere Uhr vorgegebenen Tag-/Nachtrhythmus verarbeitet und so die durch *AtbZIP1* regulierte Genexpression kontrolliert. In diesem Zusammenhang wäre es sicherlich lohnenswert eine genaue Analyse des *AtbZIP1* Promotors durchzuführen, um mögliche *cis*-Elemente zu finden, die an der Integration dieser unterschiedlichen Signale beteiligt sind, und über diese Elemente vielleicht auch weitere Komponenten der Signalkette oberhalb von *AtbZIP1* zu identifizieren.

Zusätzlich zur transkriptionellen Aktivierung wird *AtbZIP1* möglicherweise auch durch eine Stabilisierung des Transkripts während der verlängerten Nacht reguliert. Die Transkriptmenge von *AtbZIP1* steigt in den Pro35S:*AtbZIP1* Überexpressionspflanzen während der Dunkelheit an, obwohl der 35S Promotor unter diesen Bedingungen nicht reguliert wird, was z.B. die gleichbleibende Expression von *AtbZIP53* in den Pro35S:*AtbZIP53* Überexpressionspflanzen zeigt. Durch Verwendung von Primern, die an die DNA-Sequenz des fusionierten HA-Tags binden und so nur das transgene *AtbZIP1* in den Pro35S:*AtbZIP1* Pflanzen amplifizieren, konnte auch ausgeschlossen werden, dass dieser Anstieg auf die Aktivierung der endogenen *AtbZIP1* Transkription zurückzuführen ist.

Neben der transkriptionellen Aktivierung und der möglichen Stabilisierung des *AtbZIP1* Transkripts während der verlängerten Nacht gibt es noch einen weiteren Regulationsmechanismus, der nicht nur bei *AtbZIP1*, sondern auch bei den anderen

Mitgliedern der Gruppe S1 der bZIP Transkriptionsfaktoren auftritt. Für alle 5 bZIP Faktoren konnte eine posttranskriptionelle Reprimierung der Translation durch Saccharose (SIRT, sucrose induced repression of translation) gezeigt werden (Weltmeier et al., 2009; Wiese et al., 2004; Hanson et al., 2008), die durch untranslatierte Leserahmen (uORFs) im 5'UTR der bZIPs vermittelt wird.

Um die Verteilung der bZIP Proteinmenge in der ganzen Pflanze abschätzen zu können, wurden stabil transformierte Promotor:GUS Linien der bZIP Faktoren hergestellt (Weltmeier, 2005). Unter normalen Langtagsbedingungen ist die Expression von AtbZIP1 und AtbZIP53 auf die jungen „sink“-Blätter beschränkt (Weltmeier et al., 2009). Während langanhaltender Dunkelheit breitet sich die Expression von AtbZIP1 und AtbZIP53 deutlich aus und ist dann auch in älteren Blättern zu finden (Weltmeier, 2005). Für einen direkten Nachweis der endogenen AtbZIP1 und AtbZIP53 Proteine wären spezifische Antikörper notwendig, deren Produktion trotz mehrerer Versuche bisher nicht erfolgreich war.

Die beschriebenen Regulationsmechanismen führen dazu, dass bei einer ausreichenden Zuckerversorgung sowohl die Transkription als auch die Translation von AtbZIP1 und AtbZIP53 reprimiert wird. Unter Energiemangelbedingungen werden Transkription und Translation dagegen aktiviert, so dass viel AtbZIP1 und AtbZIP53 Protein zur Verfügung steht. Dieses kann dann seine regulatorische Funktion in der Pflanze ausüben und möglicherweise so zur Anpassung des pflanzlichen Metabolismus an Energiemangelbedingungen beitragen.

6.3 AtbZIP1 und AtbZIP53 führen unter Energiemangelbedingungen zu einer Umprogrammierung des pflanzlichen Kohlenhydratmetabolismus

Der während des Tages durch die Photosynthese gewonnene Zucker wird etwa zur Hälfte in Saccharose umgewandelt und in die Teile der Pflanze exportiert, die keine

Photosynthese betreiben können. Der Rest des Zuckers wird als Reserve für die Nacht in Form von Stärke in den Chloroplasten gespeichert (Smith et al., 2005).

Die Überexpression von *AtbZIP53*, und im geringeren Maß auch die Überexpression von *AtbZIP1*, führt tagsüber zu einer massiven Stärkeeinlagerung in diesen Pflanzen. Die sonst im Wildtyp so strikt kontrollierten Prozesse der Stärkesynthese und des Stärkeabbaus (Gibon et al., 2004) sind in den Überexpremierern dereguliert.

Der Phänotyp der Pro35S:AtbZIP53 Pflanzen ähnelt mit seinem Zwergwuchs und der hohen Stärkeeinlagerung stark dem Phänotyp einiger Stärkeabbaumutanten. So ist z.B. die *sex1* (*starch excess 1*) Mutante, in der das Enzym GWD1 (GLUCAN-WATER DIKINASE 1) mutiert ist, das für die Phosphorylierung und damit den Abbau des Amylopektins wichtig ist (Abb. 6.1), ebenfalls zwergwüchsig und zeigt wie Pro35S:AtbZIP53 Pflanzen auch während der verlängerten Nacht eine erhöhte Stärkeeinlagerung (Lloyd et al., 2005; Yu et al., 2001). Tatsächlich wird in Pro35S:AtbZIP53 Pflanzen die β -AMYLASE 5 (*BAM5*) nicht mehr expremiert. Die Familie der β -Amylasen besteht in *Arabidopsis* aus 9 Mitgliedern. Generell katalysieren sie den Abbau von Amylopektin und Amylose zu Maltose (Abb. 6.1).

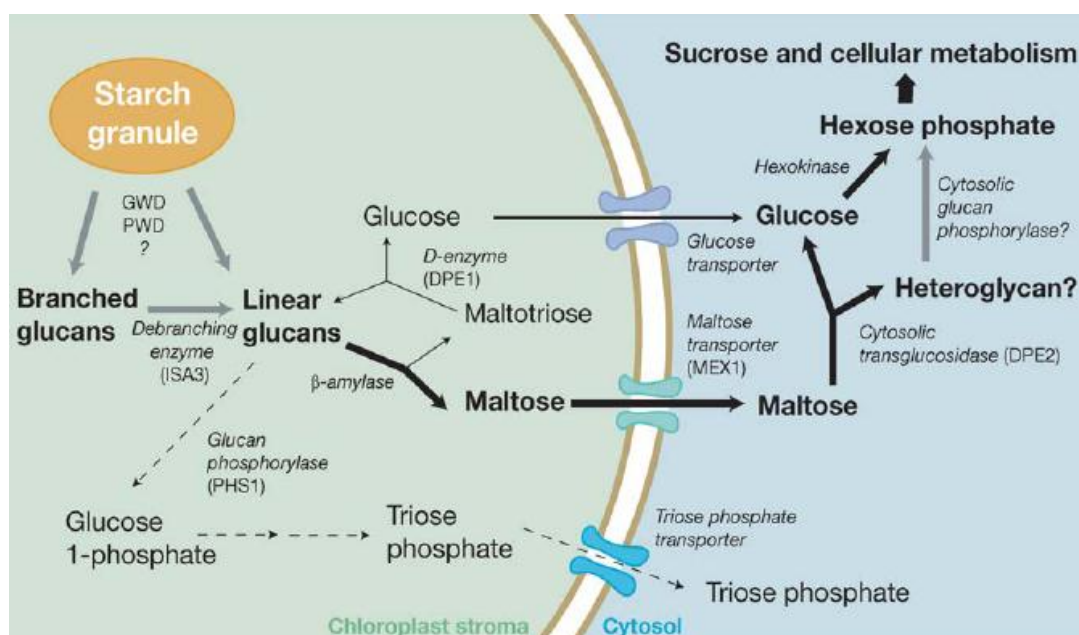


Abb. 6.1: Modell des Stärkeabbaus während der Nacht in *Arabidopsis* Blättern (Smith et al., 2005)

Auch α -Amylasen sind grundsätzlich dazu in der Lage den Abbau von Amylopektin und Amylose zu Maltose zu katalysieren, in *Arabidopsis* führt die Mutation aller drei α -Amylase-Gene aber zu keiner nennenswerten Veränderung des Stärkeabbaus (Yu et al., 2005). Lediglich vier der neun β -Amylasen (BAM1, BAM2, BAM3 und BAM4) aus *Arabidopsis* sind in den Chloroplasten, dem Ort des Stärkeabbaus, lokalisiert (Fulton et al., 2008). Drei von ihnen zeigen eine messbare β -Amylase-Aktivität, für die BAM4 konnte dies dagegen nicht nachgewiesen werden. Ihr wird statt dessen eine regulatorische Funktion für die anderen drei chloroplastidären β -Amylasen zugeschrieben (Fulton et al., 2008). Studien mit Mutanten von *BAM1*, *BAM2* und *BAM3* zeigen aber lediglich in *bam3* erhöhte Stärke- und niedrigere Maltosemengen während der Nacht (Fulton et al., 2008; Lao et al., 1999; Kaplan und Guy, 2005; Sparla et al., 2006). Eine erste Untersuchung der Expression dieser vier β -Amylasen mit Hilfe der qPCR ergab keine großen Unterschiede zwischen Wildtyp und Pro35S:AtbZIP53 Pflanzen. Nur zu einigen Zeitpunkten ist die Expression der vier Gene im Vergleich zum Wildtyp etwas stärker, möglicherweise um den Ausfall der β -Amylase 5 in diesen Pflanzen zu kompensieren. Sie scheinen aber nicht für die Akkumulation der Stärke in den Überexpressionspflanzen verantwortlich sein.

Von den andern fünf β -Amylasen, die alle außerhalb der Chloroplasten vorkommen, wurde bisher lediglich die BAM5 näher untersucht. Sie ist in den Siebelementen des Phloems lokalisiert (Wang et al., 1995) und 90% der β -Amylase-Aktivität der Pflanze ist auf die BAM5 zurückzuführen (Laby et al., 2001). Möglicherweise soll diese hohe Expression der *BAM5* eine Bildung von Stärkekörnern in den Siebelementen verhindern, da diese den Transport der löslichen Zucker durch die Poren der Siebplatten einschränken könnten (Wang et al., 1995). Eine stark verminderte Expression der *BAM5* wie sie in Pro35S:AtbZIP53 Pflanzen zu finden ist, hat also möglicherweise eine „Verstopfung“ der Siebelemente durch Stärkeeinlagerungen zur Folge, was zu einer starken Beeinträchtigung des „Source“ - „Sink“ Transports und damit dem Zwergwuchs der AtbZIP53 Überexpressionspflanzen führen könnte. Dies könnte auch erklären, warum selbst unter Dauerlicht gewachsene Pflanzen immer noch einen starken Zwergwuchs zeigen, obwohl sie durch die ständige Möglichkeit Photosynthese zu betreiben nicht auf den Abbau der chloroplastidären Stärke angewiesen sind. Dagegen spricht allerdings, dass eine Mutation der *BAM5* keine sichtbaren Auswirkungen auf die

Phloemfunktion hat (Laby et al., 2001). Leider konnte in der Metabolomanalyse, die in Kooperation mit W. Weckwerth (Universität Wien) durchgeführt wurde, keine Maltose bestimmt werden. Da der Abbau der Stärke durch die β -Amylasen zur Bildung von Maltose führt, hätten reduzierte Maltosemengen in den Überexpremierern einen weiteren Hinweis auf einen verminderten Stärkeabbau geliefert.

Möglicherweise sind der Zwergwuchs und der erhöhte Stärkegehalt der AtbZIP53 Überexpressionspflanzen auch nicht allein auf den verminderten Abbau der Stärke, sondern auch auf eine verstärkte Stärkesynthese zurückzuführen. Die AGPase ist eines der Schlüsselenzyme der Stärkesynthese (Geigenberger, 2003; Martin und Smith, 1995). In Kartoffel konnte gezeigt werden, dass sowohl Glukose, als auch Saccharose zu einer posttranslationalen Redox-Aktivierung der AGPase führen (Tiessen et al., 2003). Zumindest die saccharoseabhängige Aktivierung der AGPase wird dabei über die Aktivierung von SnRK1 Kinasen und eine anschließende transkriptionellen Regulation vermittelt. Die Versuche in dieser und in anderen Arbeiten (Baena-Gonzales et al., 2007) zeigen, dass die SnRK1 Kinasen eine Gruppe von bZIP Transkriptionsfaktoren aktivieren, zu denen auch AtbZIP1 und AtbZIP53 gehören, die anschließend eine Reihe von Genen des Primärmetabolismus transkriptionell regulieren. Eine Beteiligung von AtbZIP1 und AtbZIP53 an der Stärkesynthese ist damit zumindest nicht ausgeschlossen. Die Expression von wichtigen Genen der Stärkesynthese, wie den kleinen und großen Untereinheiten der AGPase oder verschiedenen Stärkesynthasen, müssten aber noch untersucht werden.

Gegen die These, dass die Stärkesynthese in den Pro35S:AtbZIP53 Pflanzen erhöht ist spricht allerdings die starke Akkumulation von löslichen Zuckern wie Glukose, Fruktose und Saccharose in diesen Pflanzen. Selbst während der verlängerten Nacht weisen sie noch höhere Mengen dieser Zucker auf, als die Wildtyppflanzen während des Tages. Der Abbau von Glukose, Fruktose und Saccharose zur Energiegewinnung erfolgt normalerweise über die Glykolyse und den anschließenden Citratzyklus. Sind während der verlängerten Nacht im Wildtyp keine Zucker mehr vorhanden, die verstoffwechselt werden können, so ist auch Pyruvat, das Endprodukt der Glykolyse nicht mehr messbar. AtbZIP53 Überexpremierer haben während der verlängerten Nacht zwar noch deutliche Zuckerreserven, die Pyruvatkonzentration unterscheidet sich aber kaum vom Wildtyp.

Überexpremierer von *AtbZIP1* weisen zwar auch leicht erhöhte Saccharosekonzentrationen während der verlängerten Nacht auf, die Glukose- und Fruktosemengen unterscheiden sich aber deutlich von denen im Wildtyp und in *Pro35S:AtbZIP53* Pflanzen. Schon tagsüber sind diese beiden Zucker in den *AtbZIP1* Überexpressionspflanzen kaum messbar, die Pyruvatmenge unterscheidet sich aber auch in diesen Pflanzen nicht signifikant von der des Wildtyps. Die Doppelmutante *atbzip1 atbzip53* zeigt generell kaum Unterschiede zum Wildtyp. Hier wäre es interessant auch die Metabolite in den Vierfachmutanten zu bestimmen. Die Komponenten des Citratzyklus, sind in beiden Überexpressionspflanzen in ähnlichen Mengen zu finden wie im Wildtyp und der Doppelmutante. Trotz der stark veränderten Zucker- und Stärkekonzentrationen der Überexpremierer sind die Unterschiede nur minimal und der Citratzyklus in diesen Pflanzen wenig beeinträchtigt. Dies kann nur gewährleistet werden, indem andere Makromoleküle wie z.B. Proteine, Aminosäuren und Lipide abgebaut, und als Zwischenprodukte in den Citratzyklus eingeschleust werden.

6.4 *AtbZIP1* und *AtbZIP53* aktivieren unter Energiemangel Gene des Lipid- und Aminosäurestoffwechsels

Da unter Energiemangelbedingungen wie der verlängerten Nacht eine Kohlenstoffassimilation durch die Photosynthese ausgeschlossen ist, müssen andere Makromoleküle wie Lipide, Proteine und Aminosäuren abgebaut werden, um den bleibenden Energiebedarf der Pflanze zu decken, und ein Überleben zu sichern (Abb. 6.2). *AtbZIP1* und *AtbZIP53* sind an dieser Anpassung des pflanzlichen Metabolismus beteiligt. Im letzten Kapitel wurde bereits beschrieben, dass die Überexpression der beiden Transkriptionsfaktoren zu einer Deregulation des Kohlenstoffmetabolismus führt. Dies ist sinnvoll, da die Aktivierung von *AtbZIP1* und *AtbZIP53* normalerweise unter Bedingungen erfolgt, in denen Kohlenstoff limitierend und die Expression von Enzymen des Kohlenhydratabbaus daher unnötig ist.

Die Überexpression von *AtbZIP1* und *AtbZIP53* führt dagegen zu einer gesteigerten Expression von Lipasegenen. Lipasen sind Enzyme, die von Lipiden die freien Fettsäuren abspalten. Dieser Degradationsprozess findet in der natürlichen

Blattseneszenz im Zuge der Mobilisierung von Nährstoffen und deren Recycling für noch wachsende Pflanzenteile statt (Nooden et al., 1997; Buchanan-Wollaston, 1997; Quirino et al., 2000). Entsprechend wurden in der Literatur bereits seneszenzinduzierte Lipasen beschrieben (Hong et al., 2000; Thomson et al., 2000).

Eine mögliche Beteiligung am Lipidabbau während des Seneszenzprozesses wird auch für pflanzliche Lipoxygenasen vermutet (Feussner und Wasternack, 1998). Im tierischen System konnte eine Rolle im Membranabbau bereits für 15-Lipoxygenasen gezeigt werden (Schewe und Kühn, 1991). Die durch die Lipaseaktivität frei werdenden Fettsäuren wie z.B. Linolsäure oder Linolensäure können entweder weiter abgebaut werden und in Form von Acetyl-CoA zur Energiegewinnung in den Citrat-Zyklus eingeschleust werden (Abb. 6.2) oder dienen als Ausgangsmaterial für die Synthese von

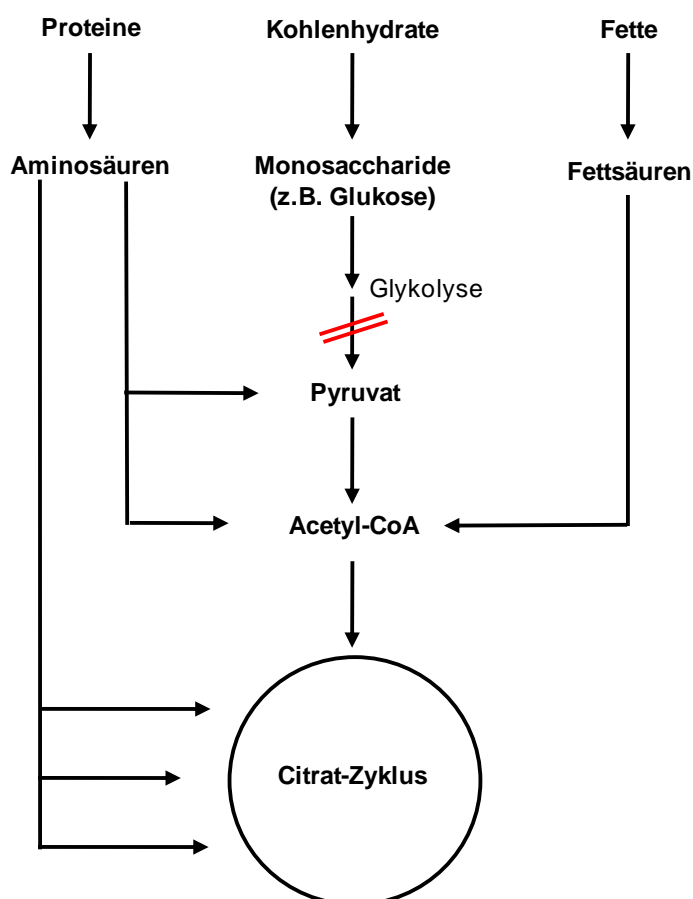


Abb. 6.2: Abbau von Proteinen und Fetten über den Citrat-Zyklus (modifiziert nach Stryer, Biochemie)

Jasmonsäure (JA) durch sogenannte 13-Lipoxygenasen (Creelman und Mullet, 1997). In dieser Umsetzung von Linol- bzw. Linolensäure zu JA könnte auch eine der Ursachen der Seneszenz liegen, denn JA scheint eine entscheidende Rolle in der Ausprägung der Blattseneszenz zu spielen. Die Konzentration von JA ist in seneszenten Blättern 4fach so hoch wie in nicht seneszenten und eine exogene Behandlung von Blättern mit JA führt zu einem verfrühten Eintritt in die Blattseneszenz (He et al., 2002).

In *Arabidopsis* existieren 6 verschiedene Lipoxygenasen (Feussner und Wasternack, 2002; Stenzel et al., 2003). Vier von ihnen, darunter auch die in den Arrays der Pro35S:AtbZIP1 Pflanzen verstärkt expremierte *LOX2*, gehören zu den 13-Lipoxygenasen und können damit den ersten Schritt zur Biosynthese von JA katalysieren. Während der dunkelinduzierten Seneszenz wird ihre Expression allerdings reprimiert, so dass es fraglich ist, ob es auch während dieser Form der Seneszenz zu einer Akkumulation von JA kommt. Eine Messung der JA Konzentration sowie der Konzentration verschiedener Fettsäuren in Blättern während einer verlängerten Nacht könnte Aufschluss über diese Fragestellung geben.

Während der dunkelinduzierten Energieverarmung wird dagegen die *LOX1* induziert, eine 9-Lipoxygenase, die in Überexpressionspflanzen von AtbZIP1 und AtbZIP53 verstärkt expremiert wird. Die Funktion der 9-Lipoxygenasen ist wesentlich weniger gut untersucht als die Funktion der 13-Lipoxygenasen. Ihre Expression führt nicht zur Biosynthese von JA, sondern zu verschiedenen anderen Metaboliten, für die bisher eine mögliche Rolle in Wurzelentwicklung, Pathogen-Abwehr und Zelltod beschrieben wurde (Abb. 5.8; Melan et al., 1993; Velosillo et al., 2007). Eine Analyse der Überexpressionspflanzen auf mögliche Akkumulationen von 9-LOX-Produkten und eine anschließende Untersuchung dieser Produkte auf ihre Rolle in der dunkelinduzierten Seneszenz würde sich wahrscheinlich lohnen, da die Mutation der *LOX1* in den AtbZIP1 Überexpressionspflanzen bereits ausreicht, den Phänotyp des verfrühten Eintritts in die dunkelinduzierte Seneszenz zu verhindern. Da in den Pro35S:AtbZIP1 Pflanzen aber auch die *LOX2* verstärkt expremiert wird und deren Expression in der Kreuzung aus Pro35S:AtbZIP1 Pflanzen und *LOX1* Mutante ebenfalls beeinträchtigt ist, könnte der beobachtete Phänotyp auch auf eine verstärkte Bildung von JA zurückzuführen sein. Um hier genauere Aussagen treffen zu können, müssten weitere Versuche wie z.B. die Messung der JA Mengen folgen. Die Herstellung von

homozygoten Pro35S:LOX1 Pflanzen ist in Zusammenarbeit mit E. Hornung und I. Feussner (Universität Göttingen, Abt. Biochemie der Pflanze) bereits in Arbeit. Durch sie könnte geklärt werden, ob allein die starke Expression der *LOX1* in den Pro35S:AtbZIP1 Pflanzen für den verfrühten Eintritt in die dunkelinduzierte Seneszenz verantwortlich ist.

Auch Proteine werden während der verlängerten Nacht vermehrt abgebaut. Dies führt zu einem stetigen Anstieg an freien Aminosäuren, die während der Dunkelheit ebenfalls verstoffwechselt werden. Die entstehenden Zwischenprodukte können über den Citrat-Zyklus abgebaut werden. Gene des Aminosäureabbaus wie die *ProDH* oder die *BCAT2* werden dafür transkriptionell aktiviert. Die verstärkte Expression dieser beiden Gene in Überexpressemern von AtbZIP1 und AtbZIP53 führt so auch zu einem reduzierten Gehalt an Prolin und den verzweigtkettigen Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin im Vergleich zum Wildtyp. Der Abbau von Prolin dient unter diesen Bedingungen als alternative Quelle für Energie (Blum und Ebercon, 1976), Kohlenstoff und Stickstoff (Ahmad und Hellebust, 1988). Diese Dinge werden unter Energiemangelbedingungen gerade in den Überexpressemern von AtbZIP1 und AtbZIP53 mit ihrem deregulierten Kohlenhydratmetabolismus, dringend benötigt. Auch Leucin, Isoleucin und Valin werden in den AtbZIP1 und AtbZIP53 Überexpressionspflanzen verstärkt abgebaut. Die in den Mitochondrien lokalisierte BCAT1 wird bisher als das zentrale Enzym des Abbaus verzweigtkettiger Aminosäuren beschrieben (Diebold et al., 2002; Schuster und Binder, 2005). Die Analyse der 6 BCAT-Gene aus *Arabidopsis* ergab aber, dass unter den Bedingungen der verlängerten Nacht die *BCAT2* die stärkste Induktion zeigt. Die *BCAT2* ist in den Chloroplasten lokalisiert und wurde bisher eher der Synthese der verzweigtkettigen Aminosäuren zugeordnet (Schuster und Binder, 2005; Lees und Galili, 2009). Unter Energiemangelbedingungen in der Dunkelheit kommt es im Chloroplasten zum Abbau von Proteinen wie der RUBISCO. Möglicherweise verschiebt sich durch die vielen dabei frei werdenden verzweigtkettigen Aminosäuren das Gleichgewicht, und die *BCAT2* katalysiert nun auch den Abbau dieser Aminosäuren. Die Aktivierung des Abbauweges der verzweigtkettigen Aminosäuren durch Leucin in zuckerverarmten Zellen wurde in der Literatur bereits beschrieben (Fujiki et al., 2001). Die durch die *BCAT2* katalysierte Deaminierungsreaktion unter Energiemangelbedingungen dient dabei möglicherweise der Synthese von

Glutaminsäure, die bei dieser Reaktion entsteht (Schuster und Binder, 2005). Glutaminsäure ist essentiell für die Synthese von Asparagin, was, während der Dunkelheit für den Transport und die Verteilung von Kohlenstoff und Stickstoff aus den abgebauten Aminosäuren in der Pflanze sorgt. Die dunkelinduzierte *BCAT2* Expression und damit der Abbau verzweigtkettiger Aminosäuren wie Leucin oder Isoleucin ist so möglicherweise eng verknüpft mit der Asparaginsynthese und wird deshalb auch durch die gleichen Transkriptionsfaktoren reguliert. Auch bei dem durch *AtbZIP1* und *AtbZIP53* regulierten Abbau von Prolin durch *ProDH* und *P5C-DECARBOXYLASE* entsteht Glutaminsäure, die ebenfalls für die Synthese von Asparagin genutzt werden kann.

Asparagin ist wegen seines hohen Stickstoff zu Kohlenstoff Verhältnisses eine wichtige Aminosäure für den Stickstoff-Transport in der Pflanze, besonders unter Bedingungen des Kohlenstoffmangels. Außerdem ist es relativ stabil und inert, was es zu einer geeigneten Aminosäure für einen Transport auch über lange Strecken macht und eine Funktion in der Speicherung von Stickstoff zulässt (Lam et al., 1994; Lea und Mißlin, 1980; Sieciechowicz et al., 1988).

Versuche mit Überexpressionspflanzen der *ASN1*, dem zentralen Enzym der Asparaginsynthese, zeigten erhöhte Asparaginsmengen im Phloemsaft, die vor allem in „sink“-Gewebe transportiert wurden (Lam et al., 2003).

Während der verlängerten Nacht kommt es zu einer starken Induktion der Gene der Asparaginbiosynthese. Die Expression von *ASP3*, *GDH2*, *GLNS* und *ASN1* wird unter diesen Bedingungen koordiniert aktiviert und durch Zucker reprimiert (Lin und Wu, 2004). Dies ermöglicht eine verstärkte Synthese von Asparagin aus den durch den gesteigerten Protein- und Aminosäureabbau zur Verfügung stehenden Metaboliten und eine gleichmäßige Verteilung dieser Stickstoff- und Kohlenstoffreserven in der ganzen Pflanze. Asparagin macht deshalb während der verlängerten Nacht einen Großteil der freien Aminosäuren aus. Über den Abbau zu Oxalacetat kann Asparagin schließlich wieder zur Energiegewinnung in den Citrat-Zyklus eingeschleust werden (Abb. 6.2; Stryer, Biochemie).

Sowohl *AtbZIP1* als auch *AtbZIP53* ist in der Lage die Expression der Gene der Asparaginbiosynthese zu regulieren. Während *AtbZIP53* die beteiligten Gene konstitutiv, d.h. unabhängig vom Energiezustand der Pflanze, aktivierte, führte die

Überexpression von AtbZIP1 hauptsächlich während der verlängerten Nacht zu einer deutlichen Steigerung der Expression der Asparaginbiosynthesegene. Dieser Effekt konnte auch schon bei der Expression der *ProDH* in den beiden Überexpremierern beobachtet werden und deutet auf eine zwar überlappende Funktion aber auch auf deutliche Unterschiede in der Regulation durch die beiden Transkriptionsfaktoren hin. Unterschiede zwischen beiden Überexpremierern finden sich auch in der gemessenen Asparaginmenge. Während die verstärkte Expression der Asparaginbiosynthesegene in Pro35S:AtbZIP53 Pflanzen auch zu einer Steigerung des Asparagingehalts führt, zeigen Pro35S:AtbZIP1 Pflanzen keine erhöhten Asparaginmengen im Vergleich zum Wildtyp. Dies lässt sich auf transkriptioneller Ebene durch die Expression einer *ASPARAGINASE* (*ANS*) erklären, die in den AtbZIP1 Überexpremierern, nicht aber in den AtbZIP53 Überexpremierern, zum Abbau von Asparagin zu Aspartat führt (Bruneau et al., 2006).

Die Überexpression sowohl von AtbZIP1 als auch von AtbZIP53 führt also zu einem verstärkten Abbau von Lipiden und Aminosäuren während der verlängerten Nacht. Obwohl grundsätzlich beide bZIP Transkriptionsfaktoren in der Lage sind, die Expression von Lipasen, Lipoxygenasen, *ProDH*, *BCAT2* und Genen der Asparaginbiosynthese wie der *ASNI* zu aktivieren, zeigten sich hier doch auch deutliche Unterschiede in der Regulation ihrer Zielgene.

6.5 AtbZIP1 und AtbZIP53 kontrollieren die Transkription von Genen des Aminosäurestoffwechsels über Bindung an G-Box-, C-Box- und ACTCAT-Promotorelemente

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von AtbZIP1 bzw. AtbZIP53 zu einer starken Aktivierung von Aminosäuregenen wie der *ProDH* und der *ASNI* führt. Frühere ChIP Analysen belegten bereits eine direkte Bindung von AtbZIP53 an die Promotoren von *ASNI* und *ProDH* (Weltmeier, 2005; Weltmeier et al., 2006), die zu einer Aktivierung der beiden Gene führt. In dieser Arbeit konnte durch weitere ChIP Analysen nun auch die Bindung von AtbZIP1 an beide Promotoren gezeigt werden. Da weder für AtbZIP53 noch für AtbZIP1 spezifische Antikörper

existieren, obwohl mehrfach versucht wurde sie herzustellen, wurden die ChIP Analysen mit Pflanzen durchgeführt, die mit einem HA-Tag fusioniertes bZIP Protein überexprimieren. Da dieser HA-Tag einen Einfluss auf die Bindung der bZIP Proteine an die DNA haben kann, müssen die aus diesem Versuch gewonnenen Daten mit Vorsicht betrachtet werden.

Eine mögliche Erklärung für die dunkelinduzierte Aktivierung der Gene des Aminosäuremetabolismus wäre, dass eine Bindung der bZIP Transkriptionsfaktoren erst nach einem Stimulus (z.B. Energiemangel) an den Promotor ihrer Zielgene erfolgt, was dann zu einer Aktivierung der Transkription führen würde. Am Beispiel des *ProDH* Promotors konnte in dieser Arbeit aber gezeigt werden, dass die Bindung von AtbZIP1 schon während des Tages stattfindet und durch vier Tage anhaltende Dunkelheit nicht weiter beeinflusst wird. Hier wäre es allerdings sinnvoll in der Zukunft auch die kürzeren Zeitpunkte der verlängerten Nacht in die Analyse mit einzubeziehen, da sich gerade in den ersten Stunden starke Veränderungen des Primärmetabolismus zeigen.

Untersuchungen in transient transformierten Mesophyllprotoplasten aus *Arabidopsis* bestätigen eine Bindung der beiden Transkriptionsfaktoren an Promotorelemente von *ASN1* und *ProDH*. Während eine einzelne G-Box (G1) die dunkelinduzierte Aktivierung des *ASN1* Promotors durch die bZIPs vermittelt, finden sich im Promotor der *ProDH* gleich drei *cis*-Elemente, die für die dunkelinduzierte *ProDH* Expression wichtig sind. Dabei handelt es sich um zwei ACTCAT Motive und eine C-Box. Ähnliche *cis*-Elemente, mit ACGT-Konsensussequenz finden sich in allen in dieser Arbeit untersuchten Genen des Aminosäurestoffwechsels (Anhang Tabelle 8.1).

Dass bZIP Transkriptionsfaktoren wie AtbZIP53 an G-Boxen binden können, wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt (Alonso et al., 2009). Baena-Gonzales et al. (2007) und Hanson et al. (2008) bestätigen die Bedeutung der G-Box für die Aktivierung der *ASN1*. Die Sequenzinformation der sechs Nukleotide allein reicht dabei allerdings nicht für die Aktivierung der *ASN1* aus, wie Versuche mit Mutationen der G2-Box zeigten. Auch der Promotorkontext, in dem sich das *cis*-Element befindet, ist wichtig für die Bindung und Aktivierung durch die Transkriptionsfaktoren. *In vitro* Analysen konnten belegen, dass an die G-Box angrenzende Sequenzen einen Einfluss auf die Proteinbindung haben können (Williams et al., 1992).

Die C-Box (GACGTC) aus dem *ProDH* Promotor ist eng verwandt mit der G-Box (CACGTG) des *ASN1* Promotors. Palindromische Sequenzen wie diese beiden Boxen, sind bevorzugte Bindemotive der bZIP Transkriptionsfaktoren (Foster et al., 1994; Izawa et al., 1993). Trotzdem reicht die Mutation der C-Box allein nicht aus, um die dunkelinduzierte Aktivierung der *ProDH* zu verhindern. Erst durch zusätzliche Mutation von einem oder zwei der ACTCAT Motive, für die bereits eine wichtige Rolle in der Regulation der *ProDH* unter hypoosmotischen Bedingungen beschrieben wurde (Sato et al., 2002; Sato et al., 2004; Weltmeier et al., 2006), kommt es zu einer deutlichen Reduktion der dunkelinduzierten *ProDH* Expression.

Nicht nur die Regulation durch unterschiedliche cis-Elemente unterscheidet diese beiden Promotoren, sondern auch der Einfluss der Überexpression von AtbZIP1 und AtbZIP53 auf die Expression der beiden Gene ist deutlich unterschiedlich. Während der verlängerten Nacht hat die Überexpression von AtbZIP53 einen stärkeren Einfluss auf die Expression der *ProDH*, AtbZIP1 Überexpression führt unter diesen Bedingungen zu einer stärkeren Aktivierung der Expression der *ASN1*. Da die bZIP Transkriptionsfaktoren meist als Dimere an die DNA binden (Landschultz et al, 1988), führt die unterschiedliche Struktur der Promotoren von *ASN1* und *ProDH* mit ihren verschiedenen cis-Elementen möglicherweise zu einer Rekrutierung unterschiedlicher Heterodimere von AtbZIP1 bzw. AtbZIP53 mit Mitgliedern der Gruppe C. Diese Heterodimere können sich in ihrer Bindespezifität und dem Aktivierungspotenzial deutlich unterscheiden und so zu einer entsprechend unterschiedlichen Genexpression führen.

6.6 Unter Energiemangelbedingungen zeigen bZIP Transkriptionsfaktoren des C/S1-Netzwerks eine partielle Redundanz

In allen Versuchen dieser Arbeit ist deutlich zu erkennen, dass die Überexpression von AtbZIP1 bzw. AtbZIP53 einen großen Einfluss auf verschiedene Stoffwechselwege des Primärmetabolismus hat. Die Einzelmutanten *atbzip1* und *atbzip53* sowie die

Doppelmutante *atbzip1 atbzip53* zeigten dagegen im Vergleich zum Wildtyp kaum Unterschiede.

Neben AtbZIP1 und AtbZIP53 wird etwa die Hälfte der 75 bZIPs aus *Arabidopsis* während der verlängerten Nacht induziert, auch wenn AtbZIP1 die stärkste transkriptionelle Aktivierung unter diesen Bedingungen aufweist. Nicht nur AtbZIP1 und 53 sind damit Kandidaten für die Regulation physiologischer Prozesse in der Anpassung an langanhaltende Dunkelheit, sondern auch z.B. Mitglieder der Gruppe C wie AtbZIP9 und AtbZIP63 (At5g24800 und At5g28770), oder auch Mitglieder der Gruppe G wie AtbZIP41 (At4g36730) und AtbZIP54 (At4g01120). All diese anderen bZIP Transkriptionsfaktoren können möglicherweise redundante Funktionen in der Anpassung des Metabolismus während der verlängerten Nacht übernehmen, so dass eine Mutation von nur ein oder zwei dieser Faktoren, wie in der *atbzip1 atbzip53* Doppelmutante, möglicherweise von anderen Faktoren ausgeglichen werden kann.

Da die Redundanz von Transkriptionsfaktorfamilien die Analyse ihrer biologischen Funktion häufig erschwert, wurde ein alternativer Ansatz zur Verwendung von einzelnen T-DNA-Insertionslinien entwickelt (Hiratsu et al., 2003). Dabei wird ein Fusionsprotein aus dem zu untersuchenden Transkriptionsfaktor und einer 12 Aminosäuren großen EAR-Repressor-Domäne exprimiert, dass als dominanter Repressor spezifisch an Zielgene bindet und so deren Transkription sogar in Anwesenheit von anderen, redundanten Transkriptionsfaktoren reprimiert, da es die Bindestelle für diese anderen Faktoren blockiert (Hiratsu et al., 2003).

Die Expression von EAR-AtbZIP1 bzw. EAR-AtbZIP53 Fusionsproteinen in *Arabidopsis* Mesophyll Protoplasten führte, im Gegensatz zu den Expressionsstudien der *ProDH* in T-DNA-Insertionslinien von AtbZIP1 und AtbZIP53, zu einer starken Reduktion der dunkelinduzierten, bZIP-vermittelten *ProDH* Expression. Dieses Ergebnis zeigt, dass EAR-AtbZIP1 und EAR-AtbZIP53 tatsächlich an *cis*-Elemente des *ProDH* Promotors binden, bei denen es sich wahrscheinlich um die zuvor identifizierten ACTCAT Motive und die C-Box handelt, und diese für andere redundante Faktoren blockieren.

Leider funktioniert dieser EAR-Domänen Ansatz nicht für jede beliebige Kombination aus Transkriptionsfaktor und Zielgen. Die Expression der *ASN1* wird z.B. durch EAR-

AtbZIP1 und EAR-AtbZIP53 stärker aktiviert als durch die entsprechenden unfusionierten Proteine. Dieses Ergebnis zeigt ein weiteres Mal die unterschiedliche Regulation von *ProDH* und *ASN1*. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Repression der Transkription der Zielgene durch eine Interaktion der EAR-Repressor-Domäne mit einer Histon Deacetylase vermittelt wird (Szemenyei et al., 2008). Durch die Deacetylierung der Histone wird ihre Bindung an die DNA ermöglicht und diese dadurch für Transkriptionsfaktoren blockiert. Möglicherweise ist diese Rekrutierung der Histon Deacetylase oder auch ein Bindung der Histone an den *ASN1* Promotor aufgrund seiner Struktur nicht möglich.

Gute Kandidaten für redundante bZIP Transkriptionsfaktoren sind die vier Mitglieder der Gruppe C. Neben der Genevestigator Analyse (Hruz et al., 2008) zeigen auch Northern Analysen (Weltmeier, 2005), dass zumindest *AtbZIP9*, *AtbZIP63* und *AtbZIP25* durch Dunkelheit aktiviert werden. Außerdem ist bekannt, dass sie mit AtbZIP1 und AtbZIP53 heterodimerisieren können (Ehlert et al., 2006; Kang et al., 2010), was zu einer Verstärkung der Aktivierung ihrer Zielgene führen kann (Weltmeier et al., 2006; Ehlert et al., 2006; Alonso et al., 2009). Ein ähnlicher Mechanismus ist auch während der dunkelinduzierten Expression von Genen wie der *ProDH* oder der *ASN1* denkbar.

Tatsächlich zeigen zwei verschiedene Vierfachmutanten (*atbzip1 atbzip53 atbzip9 atbzip63* und *atbzip1 atbzip53 atbzip10 atbzip25*) eine deutlich reduzierte dunkelinduzierte *ProDH*, *ASN1* und *BCAT2* Expression, obwohl es sich bei *atbzip53* und *atbzip63* durch eine Insertion der T-DNA im Promotorbereich nicht um vollständige Null-Mutanten handelt. Dieser Effekt ist besonders stark zu den frühen Zeitpunkten der Dunkelinduktion, in denen die Expression dieser Gene im Wildtyp deutlich ansteigt. Zu späteren Zeitpunkten steigt auch in den beiden Vierfachmutanten die Expression der drei Gene an, auch wenn sie immer noch deutlich unter der Expressionsstärke des Wildtyps liegt. Selbst in den Vierfachmutanten findet also während der verlängerten Nacht eine Aktivierung der drei Gene durch andere Faktoren statt, die die Funktion der vier mutierten bZIPs übernehmen können. Deshalb wurde getestet, ob die Expression der unmutierten bZIP Transkriptionsfaktoren in den Vierfachmutanten verstärkt wird. Eine transkriptionelle Aktivierung konnte aber

zumindest für die anderen Mitglieder der Gruppe S1 und C nicht nachgewiesen werden (C. Carsjens, persönliche Mitteilung). Diese Analyse wurde allerdings nicht unter Energiemangelbedingungen durchgeführt. Interessant wäre ein entsprechendes Experiment während der Dunkelinduktion.

Ein Versuch, eine Fünffach- oder Sechsfachmutante von AtbZIP1 und AtbZIP53 mit allen potentiellen Heterodimerisierungspartnern der Gruppe C herzustellen, scheiterte. Zwar konnte eine heterozygote Fünffachmutante durch Kreuzen gefunden werden (*atbzip1 atbzip53 atbzip9 atbzip63* homozygot und *atbzip10* heterozygot), diese zeigte aber bereits einen starken Zwergwuchs. Obwohl viele Nachkommen dieser Pflanze in der nächsten Generation getestet wurden, konnte bisher keine homozygote Fünffachmutante gefunden werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass diese homozygote Mutation der fünf bZIP Faktoren letal ist, was die wichtige Funktion des bZIP-Netzwerks in der Regulation des Primärmetabolismus aufzeigt.

Die Regulation der Zielgene durch ein ganzes Netzwerk aus redundanten, heterodimerisierenden Transkriptionsfaktoren ist deutlich komplexer als die Regulation durch einen einzelnen Transkriptionsfaktor. Trotz allem kann gerade durch diese Komplexität eine sehr genaue Feinabstimmung der Expression der Zielgene erfolgen, in dem die Verfügbarkeit und Aktivität jedes einzelnen Dimerisierungspartners in den unterschiedlichen Phasen der dunkelinduzierten Seneszenz reguliert wird. Auch in Bezug auf Mutationen einzelner Faktoren ist dieses Regulationsnetzwerk deutlich stabiler als ein einzelner Transkriptionsfaktor es sein könnte.

Genetische Redundanz kommt vor allem bei homologen Genen vor, die durch Genduplikation entstanden sind (Picket und Meeks-Wagner, 1995). Die Genduplikation ist ein wichtiger Bestandteil der evolutionären Entwicklung. Phylogenetische Studien zeigen, dass die Familie der 75 bZIP Transkriptionsfaktoren in *Arabidopsis* auf wenige Vorläufer zurückzuführen ist (Correa et al., 2008). Die große Gruppe S entwickelte sich erst spät im Laufe der pflanzlichen Evolution und ist wahrscheinlich durch Genduplikation aus der ursprünglichen Gruppe C hervorgegangen. Dies weist auf eine enge Verwandtschaft der Gruppen C und S hin und ist eine Erklärung für ihre

gemeinsame Funktionen in der Kontrolle des Energiestoffwechsels (Correa et al., 2008). Gerade spät entstandenen Gene, wie die der Gruppe S, unterliegen einem geringeren Selektionsdruck und können so langsam unterschiedliche Funktionen übernehmen (Lynch und Katju, 2004). Je nach Entwicklungsstand haben sie dabei aber immer noch teilweise überlappende Funktionen. Dies lässt sich gut am Beispiel der beiden eng verwandten Proteine AtbZIP1 und AtbZIP53 zeigen. Obwohl sowohl für AtbZIP1 als auch für AtbZIP53 in dieser Arbeit eine Beteiligung an der Regulation des Primärmetabolismus gezeigt wurde, gibt es doch auch deutliche Unterschiede in der Funktion der beiden Transkriptionsfaktoren. Dies spiegelt sich z.B. in der Regulation der *ProDH* und der *ASN1* wieder. Ein anderes Beispiel für die überlappende aber auch unterschiedliche Funktion von AtbZIP1 und AtbZIP53 zeigt sich in der Samenentwicklung (Alonso et al., 2009; Weltmeier et al., 2009). Die Expression von Samenspeicherproteinen wie dem *ALBUMIN (2S2)* wird durch Heterodimere von AtbZIP53 mit Mitgliedern der Gruppe C wie z.B. AtbZIP10 und AtbZIP25 reguliert. Obwohl auch *AtbZIP1* während der Samenentwicklung expremiert wird und in Protoplasten wie AtbZIP53 die Transkription von *2S2* aktivieren kann, zeigen Pro35S:AtbZIP1 Pflanzen keine gesteigerte *2S2* Expression (Weltmeier et al., 2009).

6.7 Die SnRK1 Kinasen KIN10 und KIN11 aktivieren unter Energiemangel das C/S1-bZIP Transkriptionsfaktor-Netzwerk wahrscheinlich über eine Phosphorylierung von AtbZIP63

Schon geringe Änderungen der Proteinmenge von AtbZIP53 führen zu einer Änderung der Genexpression unabhängig vom Energiestatus der Pflanze. AtbZIP1 benötigt dagegen ein weiteres posttranslationales Signal, um aktivieren zu können. Die Überexpression allein führt noch nicht zu einer Steigerung der Genexpression von Zielgenen wie *ProDH* und *ASN1* im Licht. Erst unter Energiemangelbedingungen kommt es in Pro35S:AtbZIP1 Pflanzen ebenfalls zu einer Steigerung der Aktivität dieser Gene. Da auch Transkription und Translation von AtbZIP1 stärker als von AtbZIP53 unter diesen Bedingungen aktiviert werden spricht dies dafür, dass

hauptsächlich AtbZIP1 nach einer posttranslationalen Aktivierung die Genexpression unter Energiemangel reguliert.

Die beiden SnRK1 Kinasen KIN10 und KIN11 aus *Arabidopsis* wurden als zentrale Regulatoren eines Netzwerks aus bZIP Transkriptionsfaktoren beschrieben, die die Genexpression unter Energiemangelbedingungen regulieren (Baena-Gonzalez et al., 2007; Baena-Gonzalez und Sheen, 2008). Für weitere Studien der Funktion dieser Kinasen sind Versuche mit transgenen Überexprimierern bzw. Mutanten unerlässlich. Eine Überexpression von KIN10 bzw. KIN11 wurde in dieser Arbeit transient im Protoplastensystem durchgeführt, auch wenn dies transgene Überexpressionspflanzen auf Dauer nicht ersetzen kann. Ein „loss-of-function“-Ansatz ist mit dem Protoplastensystem allerdings nicht möglich. Da durch „virus-induced gene silencing“ (VIGS; Burch-Smith et al., 2006) erzeugte *kin10 kin11* Mutanten starke Wuchsdefekte und einen Eintritt in die Seneszenz noch vor der Blütenbildung zeigen (Baena-Gonzalez et al., 2007), arbeiten wir zurzeit an der Herstellung von Pflanzen mit induzierbarer amiRNA, über welche ein Gene-Silencing von KIN10 und KIN11 erst nach Estradiolinduktion erfolgt.

Ein Sequenzvergleich von AtbZIP1 mit dem in Huang und Huber (2001) beschriebenen SnRK-Phosphorylierungsmotiv führte zu einem Serin am C-terminalen Ende von AtbZIP1 bei dem es sich möglicherweise um eine Phosphorylierungsstelle handeln könnte. Ein ähnliches Motiv wurde auch am C-terminalen Ende von AtbZIP53 gefunden.

Aminosäureaustausch-Mutanten von AtbZIP1 und AtbZIP53, mit einem Alanin oder Aspartat statt des zentralen Serins des Motivs, wurden hergestellt (Lendner, 2009). Alanin verhindert eine Phosphorylierung an dieser Stelle und soll somit den nicht phosphorylierten Zustand simulieren. Aspartat ähnelt in seiner räumlichen Struktur und Ladung dagegen dem phosphorylierten Serin (Furihata et al., 2006). Die Expression dieser Mutanten von AtbZIP1 und AtbZIP53 in transient transformierten Mesophyllprotoplasten ergab allerdings keine Unterschiede zur Transformation mit den unmutierten bZIPs. Zumindest diese Motive werden also nicht direkt durch die beiden Kinasen KIN10 und KIN11 phosphoryliert und spielen damit keine Rolle in der posttranslationalen Modifikation der bZIP Faktoren. Dies schließt allerdings nicht aus, dass andere Motive in der Aminosäureabfolge von AtbZIP1 und/oder AtbZIP53

existieren, die phosphoryliert werden. So beschreiben Halford et al. (2003) z.B. ein SnRK1-Phosphorylierungsmotiv (Hy-X-Ba-X-X-S-X-X-X-Hy), das dem in Huang und Huber (2001) zwar sehr ähnelt, aber an dessen Position -4 vom Serin aus nicht notwendigerweise ein Prolin steht, wie es Huang und Huber (2001) beschreiben. Sucht man dieses Motiv in der Aminosäuresequenz von AtbZIP1 findet man z.B. das Serin S9, das damit auch eine mögliche Phosphorylierungsstelle durch die Kinasen ist. Hier wäre eine Analyse der *in vivo* Phosphorylierungsstellen von AtbZIP1 und AtbZIP53 aufschlussreich. Diese würden die Zahl der möglichen phosphorylierten Serine einschränken und so eine weitere Untersuchung erleichtern.

Eine solche Analyse wurde bereits für AtbZIP63 durchgeführt (A. Mair, M. Teige, unveröffentlicht). Die Interaktion mit KIN10 und KIN11 aber auch mit anderen Kinasen wie z.B. einer CDPK (Calcium dependent kinase) konnte mit Hilfe einer Co-Immunopräzipitation eines GFP-fusionierten AtbZIP63 Proteins gezeigt werden. In einer massenspektrometrischen Analyse von AtbZIP63 Phosphopeptiden konnten die vier phosphorylierten Serine S29, S59, S261 und S300 identifiziert werden. Alle vier Serine sind dabei von Aminosäuresequenzen umgeben, die Übereinstimmungen mit Phosphorylierungsmotiven aus der Literatur aufweisen (Huang und Huber, 2001; Halford et al., 2003). Besonders das Motiv um Serin 300 erfüllt optimal eines der in Huang und Huber (2001) beschriebenen Phosphorylierungsmotive.

Aminosäureaustausch-Mutanten der vier Serine von AtbZIP63 wurden in Zusammenarbeit mit C. Chaban (Universität Tübingen) und J. Lendner (Lendner, 2009) hergestellt und in Protoplasten analysiert. Eine Mutation der entsprechenden Serine von AtbZIP63 führte in diesem Versuch tatsächlich zu einer signifikanten Reduktion der dunkelinduzierten *ProDH* Aktivität im Vergleich mit dem unmutierten AtbZIP63. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass KIN10 und KIN11 nicht direkt AtbZIP1 und AtbZIP53, sondern ihren Heterodimerisierungspartner AtbZIP63 phosphorylieren. Die Heterodimerisierung von AtbZIP1 und AtbZIP53 mit den Mitgliedern der Gruppe C (Ehlert et al., 2006; Kang et al., 2010), sowie die Bedeutung dieser redundanten S1 und C bZIP Faktoren für die Regulation der Aminosäuregene unter Energiemangelbedingungen, konnte bereits gezeigt werden. Die Rolle von AtbZIP63 in der Anpassung des pflanzlichen Metabolismus an Energiemangelbedingungen wurde dagegen bisher kaum untersucht. Zwar wird die Transkription von *AtbZIP63* während

der Dunkelheit ebenfalls induziert (Weltmeier, 2005), die Protoplastenanalysen in dieser Arbeit zeigten allerdings keine nennenswerte Aktivierung von *ASN1* und *ProDH* durch alleinige Überexpression dieses Transkriptionsfaktors. Hier wären möglicherweise Protoplastenanalysen aufschlussreich, in denen unterschiedliche Kombinationen von Heterodimeren wie z.B. AtbZIP1 und AtbZIP63 oder AtbZIP53 und AtbZIP63 auf ihre Fähigkeit, die Expression von *ProDH* und *ASN1* zu aktivieren, analysiert werden würden. Auch Untersuchungen von Pro35S:AtbZIP63 Pflanzen und *atbzip63* Mutanten auf die Expression von *ProDH*, *ASN1* und *BCAT2* wären hier hilfreich. Falls die dunkelinduzierte Aktivierung von z.B. *ProDH* und *ASN1* tatsächlich von der Phosphorylierung von AtbZIP63 durch die Kinasen KIN10 und KIN11 abhängt, sollte in einer entsprechenden Null-Mutante von AtbZIP63 diese dunkelinduzierte Expression unterbunden werden. Tatsächlich zeigte die Vierfachmutante in der die Transkription von *AtbZIP63* durch eine Insertion im Promotor beeinträchtigt ist eine deutliche Reduktion der Expression von *ProDH* und *ASN1*. Allerdings ist die Transkriptmenge von *AtbZIP63* in dieser Mutante nur etwa auf die Hälfte reduziert. Ein vollständigen Knock-Out von *AtbZIP63* existiert nun ebenfalls (Vincente-Carbajosa, unveröffentlicht) und kann in zukünftige Analysen mit einbezogen werden.

Interessant wäre auch, ob die *in vivo* Phosphorylierung von AtbZIP63 erst durch Energiemangelbedingungen stimuliert wird und ob weitere bZIP Transkriptionsfaktoren existieren, die durch die beiden Kinasen phosphoryliert werden. Ein generellerer Ansatz um mögliche weitere Phosphorylierungsziele der Kinase KIN10 zu finden ist deshalb in Kooperation mit W. Weckwerth (Universität Wien) in Planung.

6.8 Modell: SnRK1 Kinasen und bZIP Faktoren des C/S1 Netzwerks vermitteln eine Reprogrammierung des pflanzlichen Metabolismus unter Energiemangelbedingungen

Die bisher beschriebenen Daten in der Literatur so wie die Ergebnisse dieser Arbeit führen zu folgendem Modell der Regulation des pflanzlichen Primärmetabolismus unter Energiemangelbedingungen: Transkription und Translation insbesondere von AtbZIP1, aber auch von AtbZIP53, werden durch Zucker reprimiert. Dunkelheit und andere

Stressbedingungen, die einen Energiemangel verursachen, führen dagegen zur Aktivierung der Transkription und Translation. Auch die Transkription einiger Gruppe C bZIP Faktoren wird unter diesen Bedingungen aktiviert. AtbZIP1 und AtbZIP53 dimerisieren mit Mitgliedern der Gruppe C und binden als Heterodimere an ACGT- und ACTCAT-Elemente in den Promotoren ihrer Zielgene. Die Aktivität des Gruppe C Faktors AtbZIP63 wird möglicherweise über eine Phosphorylierung durch die SnRK1 Kinase KIN10 beeinflusst, die ebenfalls durch Energiemangel aktiviert wird. Zu den Zielgenen von AtbZIP1 und AtbZIP53 gehören Gene des Aminosäure- und Lipidstoffwechsels. Der Kohlenhydratmetabolismus wird dagegen dereguliert. Unter Energiemangel kommt es so zu einer Anpassung des Primärmetabolismus, um die Grundbedürfnisse an Energie zu decken und der Pflanze ein Überleben zu sichern.

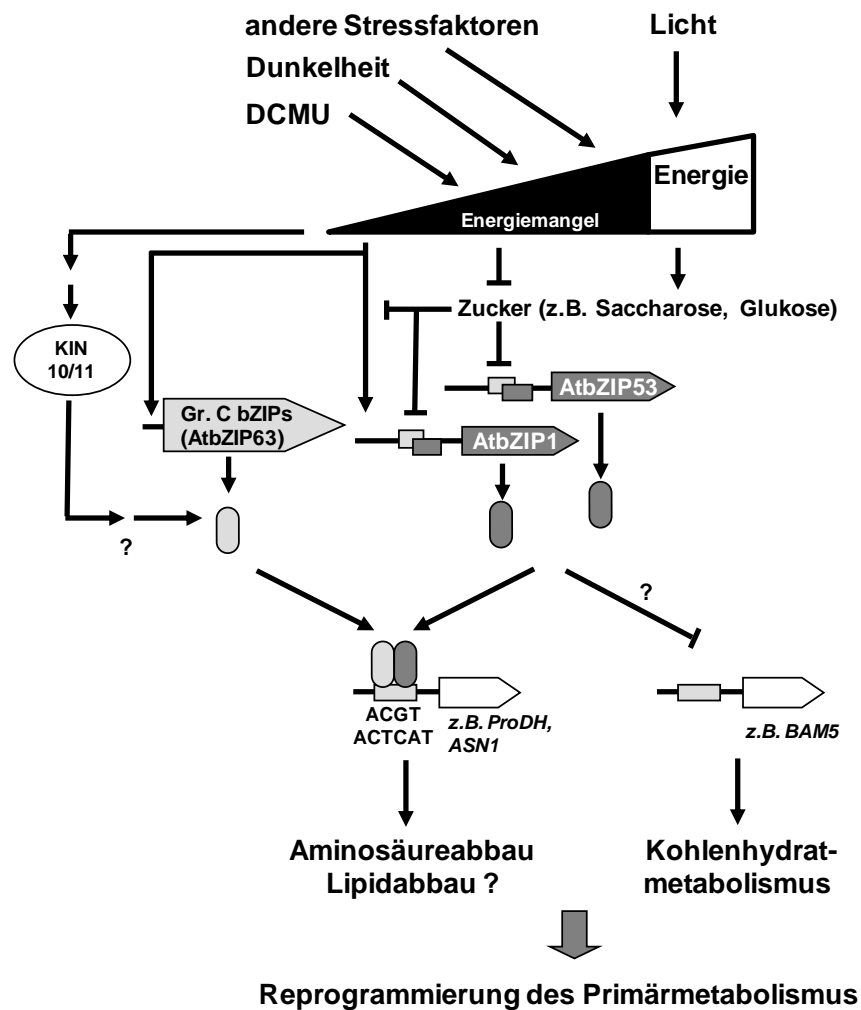


Abb. 6.3: Modell zur Anpassung des pflanzlichen Metabolismus an Energiemangelbedingungen durch das Netzwerk aus Gruppe C/S1-bZIPs und den Kinasen KIN10 und KIN11

7 Literaturverzeichnis

Ahmad I. and Hellebust J.A. (1988): The relationship between inorganic nitrogen metabolism and proline accumulation in osmoregulatory responses of two euryhaline microalgae. *Plant Physiology*, 88, 348-354.

Alonso R., Oñate-Sánchez L., Weltmeier F., Ehlert A., Diaz I., Dietrich K., Vicente-Carbajosa J. and Dröge-Laser W. (2009): A pivotal role of the basic leucine zipper transcription factor AtbZIP53 in the regulation of seed maturation gene expression based on heterodimerisation and protein complex formation. *The Plant Cell*, 6, 1747-61.

Alwine J.C., Kemp D.J. and Stark G.R. (1977): Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *PNAS*, 74, 5350-5354.

Amodeo G.A., Rudolph M.J. and Tong L. (2007): Crystal structure of the heterotrimer core of *Saccharomyces cerevisiae* AMPK homologue SNF1. *Nature*, 449.

Baena-Gonzalez E. and Sheen J. (2008): Convergent energy and stress signaling. *Trends in Plant Science*, 13, 474-482.

Baena-Gonzalez E., Rolland F., Thevelein J.M. and Sheen J. (2007): A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature*, 448, 938-42.

Baxevanis A. D. and Vinson C. R. (1993): Interactions of coiled coils in transcription factors: where is the specificity? *Curr Opin Genet Dev*, 3, 278-85.

Bent A.F. (2000): *Arabidopsis in planta* transformation. Uses, mechanisms, and prospects for transformation of other species. *Plant Physiol*, 124, 1540-7.

Bernard P., Kezdy K.E., Van Melderren L., Steyaert J., Wyns L., Pato M.L., Higgins P.N. and Couturier M. (1993): The F plasmid CcdB protein induces efficient ATP-dependent DNA cleavage by gyrase. *J Mol Biol*, 234, 534-41.

Binder S., Knill T. and Schuster J. (2007): Branched-chain amino acid metabolism in higher plants. *Physiologia Plantarum*, 129, 68-78.

Blasing O.E., Gibon Y., Gunther M., Hohne M., Morcuende R., Osuna D., Thimm O., Usadel B., Scheible W.R. and Stitt M. (2005): Sugars and circadian regulation make major contributions to the global regulation of diurnal gene expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 17, 3257-3281.

- Blum A. and Ebercon A.** (1976): Genotypic Responses in Sorghum to Drought Stress. III. Free Proline Accumulation and Drought Resistance. *Crop Science*, 16, 428-431.
- Bolton E.T. and McCarthy B.J.** (1962): A general method for isolation of RNA complementary to DNA. *PNAS*, 48, 1390-1397.
- Boudsocq M. and Sheen J.** (2008): Calcium sensing and signaling. In: Abiotic Stress Adaptation in Plants: Physiological, Molecular and Genomic Foundation (A. Pareek, S.K. Sopory, H.J. Bohnert, Govindjee, eds.), Springer, Dordrecht, The Netherlands. In press.
- Bouly J.P., Gissot L., Lessard P., Kreis M. and Thomas M.** (1999): *Arabidopsis thaliana* proteins related to the yeast SIP and SNF4 interact with AKINalpha1, an SNF1-like protein kinase. *The Plant Journal*, 18, 541-50.
- Bruneau L., Chapman R. and Marsolais F.** (2006): Co-occurrence of both L-asparaginase subtypes in *Arabidopsis*: At3g16150 encodes a K⁺-dependent L-asparaginase. *Planta*, 224, 668–679.
- Buchanan-Wollaston V. and Ainsworth C.** (1997): Leaf senescence in *Brassica napus*: cloning of senescence related genes by subtractive hybridisation. *Plant Mol Biol*, 33, 821-34.
- Buchanan-Wollaston V., Earl S., Harrison E., Mathas E., Navabpour S., Page T. and Pink D.** (2003): The molecular analysis of leaf senescence - a genomics approach. *Plant Biotechnol Journal*, 1 (1), 3-22.
- Buchanan-Wollaston V., Page T., Harrison E., Breeze E., Lim P.O., Nam H.G., Lin J.F., Wu S.H., Swidzinski J., Ishizaki K. and Leaver C.J.** (2005): Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 42, 567-585.
- Burch-Smith T. M., Schiff M., Liu Y. and Dinesh-Kumar S. P.** (2006): Efficient virus induced gene silencing in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 142, 21–27.
- Carlson M., Osmond B.C. and Botstein D.** (1981): Mutants of yeast defective in sucrose utilization. *Genetics*, 98 (1), 25-40.
- Caspar T., Huber S.C. and Somerville C.** (1985): Alterations in Growth, Photosynthesis, and Respiration in a Starchless Mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Deficient in Chloroplast Phosphoglucomutase Activity. *Plant Physiol.*, 79 (1), 11-17.
- Celenza J.L. and Carlson M.** (1989): Mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 protein kinase and evidence for functional interaction with the SNF4 protein. *Mol Cell Biol.*, 9 (11), 5034-44.

Chae M.J., Lee J.S., Nam M.H., Cho K., Hong J.Y., Yi S.A., Suh S.C. and Yoon I.S. (2007): A rice dehydration-inducible SNF1-related protein kinase 2 phosphorylates an abscisic acid responsive element-binding factor and associates with ABA signaling. *Plant Mol Biol.*, 63 (2), 151-69.

Chen J.G., Willard F.S., Huang J., Liang J., Chasse S.A., Jones A.M. and Siderovski D.P. (2003): A seven-transmembrane RGS protein that modulates plant cell proliferation. *Science*, 301, 1728-1731.

Chen J.G. and Jones A.M. (2004): AtRGS1 function in *Arabidopsis thaliana*. *Methods Enzymol.*, 389, 338-50.

Chiou T.J. and Bush D.R. (1998): Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. *PNAS*, 95, 4784-4788.

Choi H., Hong J., Ha J., Kang J. and Kim S. Y. (2000): ABFs, a family of ABA responsive element binding factors. *J Biol Chem*, 275, 1723-30.

Chomczynski P. (1993): A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*, 15, 532-4, 536-7.

Chomczynski P. and Sacchi N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162, 156-9.

Church G.M. and Gilbert W. (1984): Genomic sequencing. *PNAS*, 81, 1991-5.

Ciceri P., Gianazza E., Lazzari B., Lippoli G., Genga A., Hoscheck G., Schmidt R.J., and Viotti A. (1997): Phosphorylation of Opaque2 changes diurnally and impacts its DNA binding activity. *The Plant Cell*, 9, 97-108.

Ciereszko I., Johansson H. and Kleczkowski L.A. (2001): Sucrose and light regulation of a cold-inducible UDP-glucose pyrophosphorylase gene via a hexokinase-independent and abscisic acid-insensitive pathway in *Arabidopsis*. *Biochem. J.*, 354, 67-72.

Clark J.M. (1988): Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res*, 16, 9677-86.

Clough S.J. and Bent A.F. (1998): Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 16, 735-43.

Cohen S.N., Chang A.C., Boyer H.W. and Helling R.B. (1973): Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Biotechnology*, 24, 188-92.

Corrêa L.G., Riaño-Pachón D.M., Schrago C.G., dos Santos R.V., Mueller-Roeber B. and Vincentz M. (2008): The role of bZIP transcription factors in green plant evolution: adaptive features emerging from four founder genes. *PLoS One*, 3 (8), e2944.

Cortès S., Gromova M., Evrard A., Roby C., Heyraud A., Rolin D.B., Raymond P. and Brouquisse R.M. (2003): In plants, 3-o-methylglucose is phosphorylated by hexokinase but not perceived as a sugar. *Plant Physiology*, 131 (2), 824-37.

Creelman R.A. and Mullet J.E. (1997): Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.*, 48, 355-381.

De Pater S., Katagiri F., Kijne J. and Chua N.H. (1994): bZIP proteins bind to a palindromic sequence without an ACGT core located in a seed-specific element of the pea lectin promoter. *The Plant Journal*, 6, 133-40.

De Risi J.L., Iyer V.R. and Brown P.O. (1997): Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*, 278 (5338), 680-6.

Diebold R., Schuster J., Daschner K. and Binder S. (2002): The branched-chain amino acid transaminase gene family in *Arabidopsis* encodes plastid and mitochondrial proteins. *Plant Physiology*, 129, 540-550.

Dietrich K. (2006): Die Funktion der Transkriptionsfaktoren AtbZIP1 und AtbZIP53 aus *Arabidopsis thaliana* unter biotischen und abiotischen Stressbedingungen. *Diplomarbeit*.

Dijkwel P.P., Huijser C., Weisbeek P.J., Chua N.H., and Smeekens S. (1997): Sucrose control of phytochrome A signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 9, 583-595.

Ehlert A. (2004): Analyse der Dimerisierungs- und Aktivierungseigenschaften von Gruppe C und S bZIP- Transkriptionsfaktoren aus *Arabidopsis thaliana*. *Diplomarbeit*.

Ehlert A., Weltmeier F., Wang X., Mayer C.S., Smeekens S., Vicente-Carbajosa J. and Dröge-Laser W. (2006): Two-hybrid protein-protein interaction analysis in *Arabidopsis* protoplasts: establishment of a heterodimerization map of group C and group S bZIP transcription factors. *The Plant Journal*, 46, 890-900.

Ehness R., Ecker M., Godt D.E. and Roitsch T. (1997): Glucose and Stress Independently Regulate Source and Sink Metabolism and Defense Mechanisms via Signal Transduction Pathways Involving Protein Phosphorylation. *The Plant Cell*, 9, 1825-1841.

Feinberg A.P. and Vogelstein B. (1983): A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem*, 132, 6-13.

Feinberg A.P. and Vogelstein B. (1984): A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Addendum Anal Biochem*, 137, 266-7.

Feussner I. and Wasternack C. (1998): Lipoxygenase catalyzed oxygenation of lipids. *Fett/Lipid*, 100, 146-152.

Feussner I. and Wasternack C. (2002): The lipoxygenase pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 53, 275–297.

Fondy B.R. and Geiger D.R. (1985): Diurnal changes of allocation of newly fixed carbon in exporting sugar beet leaves. *Plant Physiology*, 78, 753–757.

Fordham-Skelton A.P., Chilley P., Lumberras V., Reignoux S., Fenton T.R., Dahm C.C., Pages M. and Gatehouse J.A. (2002): A novel higher plant protein tyrosine phosphatase interacts with SNF1-related protein kinases via a KIS (kinase interaction sequence) domain. *The Plant Journal*, 29 (6), 705-15.

Foster R., Izawa T. and Chua N. H. (1994): Plant bZIP proteins gather at ACGT elements. *Faseb J*, 8, 192-200.

Fujiki Y., Ito M., Nishida I. and Watanabe A. (2001): Leucine and its keto acid enhance the coordinated expression of genes for branched-chain amino acid catabolism in *Arabidopsis* under sugar starvation. *FEBS Lett*, 499 (1-2), 161-5.

Fujiki Y., Yoshikawa Y., Sato T., Inada N., Ito M., Nishida I. and Watanabe A. (2001): Dark-inducible genes from *Arabidopsis thaliana* are associated with leaf senescence and repressed by sugars. *Physiol Plant*, 111, 345-352.

Fukazawa J., Sakai T., Ishida S., Yamaguchi I., Kamiya Y. and Takahashi Y. (2000): Repression of shoot growth, a bZIP transcriptional activator, regulates cell elongation by controlling the level of gibberellins. *The Plant Cell*, 12, 901-15.

Fulton D.C., Stettler M., Mettler T., Vaughan C.K., Li J., Francisco P., Gil M., Reinhold H., Eicke S., Messerli G., Dorken G., Halliday K., Smith A.M., Smith S.M. and Zeeman S.C. (2008): Beta-AMYLASE4, a noncatalytic protein required for starch breakdown, acts upstream of three active beta-amylases in *Arabidopsis* chloroplasts. *The Plant Cell*, 20 (4), 1040-58.

Furihata T., Maruyama K., Fujita Y., Umezawa T., Yoshida R., Shinozaki K. and Yamaguchi-Shinozaki K. (2006): Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *PNAS*, 103, 1988-93.

Furuichi T., Mori I.C., Takahashi K. and Muto S. (2001): Sugar-induced increase in cytosolic Ca²⁺ in *Arabidopsis thaliana* whole plants. *Plant Cell Physiology*, 42, 1149-1155.

Gan S. (2003): Mitotic and postmitotic senescence in plants. *Sci Aging Knowledge Environ.*, 38, RE7.

Gateway® Technology – The Gateway Manual

Geigenberger P. (2003): Regulation of sucrose to starch conversion in growing potato tubers. *J Exp Bot.*, 54 (382), 457-65.

Geiger D.R. and Servaites J.C. (1994): Diurnal regulation of photosynthetic carbon metabolism in C3 plants. *Annu Rev Plant Biol*, 45, 235–256.

Gibon Y., Blaesing O.E., Hannemann J., Carillo P., Höhne M., Hendriks J.H., Palacios N., Cross J., Selbig J. and Stitt M. (2004): A Robot-based platform to measure multiple enzyme activities in Arabidopsis using a set of cycling assays: comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. *The Plant Cell*, 16 (12), 3304-25.

Gibon Y., Bläsing O.E., Palacios-Rojas N., Pankovic D., Hendriks J.H., Fisahn J., Höhne M., Günther M. and Stitt M. (2004): Adjustment of diurnal starch turnover to short days: depletion of sugar during the night leads to a temporary inhibition of carbohydrate utilization, accumulation of sugars and post-translational activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in the following light period. *The Plant J.*, 39 (6), 847-62.

Gibson U.E., Heid C.A. and Williams P.M. (1996): A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.*, 6 (10), 995-1001.

Gissot L., Polge C., Bouly J.P., Lemaitre T., Kreis M. and Thomas M. (2004): AKINbeta3, a plant specific SnRK1 protein, is lacking domains present in yeast and mammals non-catalytic beta-subunits. *Plant Molecular Biology*, 56, 747-59.

Gonzali S., Loreti E., Solfanelli C., Novi G., Alpi A. and Perata P. (2006): Identification of sugar-modulated genes and evidence for *in vivo* sugar sensing in *Arabidopsis*. *J. Plant Res.*, 119, 115-123.

Goodacre R., Vaidyanathan S., Dunn W.B., Harrigan G.G. and Kell D.B. (2004): Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *TRENDS in Biotechnology*, 22, 5.

Gutierrez R.A., Stokes T.L., Thum K., Xu X., Obertello M., Katari M.S., Tanurdzic M., Dean A., Nero D.C., McClung C.R. and Coruzzi G.M. (2008): Systems approach identifies an organic nitrogen-responsive gene network that is regulated by the master clock control gene CCA1. *PNAS*, 105, 4939-4944.

Gutierrez R.A., Stokes T.L., Thum K., Xu X., Obertello M., Katari M.S., Tanurdzic M., Dean A., Nero D.C., McClung C.R. and Coruzzi G.M. (2008): Systems approach identifies an organic nitrogen-responsive gene network that is regulated by the master clock control gene CCA1. *PNAS*, 105, 4939-4944.

Halford N.G. and Hey S.J. (2009): Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants. *Biochem. J.*, 419, 247–259.

Halford N.G., Hey S., Jhurrea D., Laurie S., McKibbin R.S., Paul M. and Zhang Y. (2003): Metabolic signalling and carbon partitioning: role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase. *J Exp Bot.*, 54 (382), 467-75.

Halket J.M., Waterman D., Przyborowska A.M., Patel R.K.P., Fraser P.D. and Bramley P.M. (2005): Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. *Journal of Experimental Botany*, 56, 410, *Metabolome Special Issue*, 219–243.

Hanahan D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 166, 557-80.

Hanson J., Hanssen M., Wiese A., Hendriks M.M. and Smeekens S. (2008): The sucrose regulated transcription factor bZIP11 affects amino acid metabolism by regulating the expression of *ASPARAGINE SYNTHETASE1* and *PROLINE DEHYDROGENASE2*. *The Plant J.*, 53 (6), 935-49.

Hardie D.G., Carling D. and Carlson M. (1998): The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu Rev Biochem.*, 67, 821-55.

Hartmann L. (2009): Bedeutung des *Arabidopsis* C-/S1-bZIP Transkriptionsfaktor-Netzwerks im Rahmen der pflanzlichen Antwort auf Salzstress. *Diplomarbeit*.

He Y., Fukushige H., Hildebrand D. F. and Gan S. (2002): Evidence Supporting a Role of Jasmonic Acid in *Arabidopsis* Leaf Senescence. *Plant Physiol*, 128, 876-84.

Hecht A., Strahl-Bolsinger S. and Grunstein M. (1996): Spreading of transcriptional repressor SIR3 from telomeric heterochromatin. *Nature*, 383, 92-6.

Heinekamp T., Kuhlmann M., Lenk A., Strathmann A. and Droge-Laser W. (2002): The tobacco bZIP transcription factor BZI-1 binds to G-box elements in the promoters of phenylpropanoid pathway genes *in vitro*, but it is not involved in their regulation *in vivo*. *Mol Genet Genomics*, 267, 16-26.

Hellmann H., Funck D., Rentsch D. and Frommer W.B. (2000): Hypersensitivity of an *Arabidopsis* sugar signaling mutant toward exogenous proline application. *Plant Physiology*, 122, 357-368.

Herrera-Estrella L., Depicker A., Van Montagu M. and Schell J. (1992): Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Biotechnology*, 24, 377-81.

Hey S., Mayerhofer H., Halford N.G. and Dickinson J.R. (2007): DNA sequences from *Arabidopsis*, which encode protein kinases and function as upstream regulators of Snf1 in yeast. *J Biol Chem*, 282, 10472-10479.

Hildebrand D., Fukushige H., Afithile M. and Wang C. (1998): Lipoxygenases in plant development and senescence. In A. Rowley, H. Kuhn, T. Schewe, eds, *Eicosanoids and Related Compounds in Plants and Animals*. Portland Press Ltd., London, pp 151–181.

Hiratsu K., Matsui K., Koyama T. and Ohme-Takagi M. (2003): Dominant repression of target genes by chimeric repressors that include the EAR motif, a repression domain, in *Arabidopsis*. *The Plant J.*, 34 (5), 733-9.

Holden M. (1965): Chlorophylls. In: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments* (T. W. Goodwin, ed.), Academic Press, New York, 461-488.

Hong Y., Wang T.W., Hudak K.A., Schade F., Froese C.D. and Thompson J. E. (2000): An ethylene-induced cDNA encoding a lipase expressed at the onset of senescence. *PNAS*, 97, 8717-8722.

Hruz T., Laule O., Szabo G., Wessendorp F., Bleuler S., Oertle L., Widmayer P., Gruissem W. and Zimmermann P. (2008): Genevestigator V3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Advances in Bioinformatics*, 420747.

Huang J.Z. and Huber S.C. (2001): Phosphorylation of synthetic peptides by a CDPK and plant SNF1-related protein kinase. Influence of proline and basic amino acid residues at selected positions. *Plant and Cell Physiology*, 42, 1079-87.

Hudson E.R., Pan D.A., James J., Lucocq J.M., Hawley S.A., Green K.A., Baba O., Terashima T. and Hardie D.G. (2003): A novel domain in AMP-activated protein kinase causes glycogen storage bodies similar to those seen in hereditary cardiac arrhythmias. *Current Biology*, 13, 861-6

Inoue H., Nojima H. and Okayama H. (1990): High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96, 23-28.

Invitrogen (2001): Proquest Two-Hybrid System. Instruction Manual.

Ito K., Kusano T. and Tsutsumi K.I. (1999): A cold-inducible bZIP protein gene in radish root regulated by calcium- and cycloheximide-mediated signals. *Plant Science*, 142, 57-65.

Iwata Y., Kuriyama M., Nakakita M., Kojim, H., Ohto M. and Nakamura K. (1998): Characterization of a calcium-dependent protein kinase of tobacco leaves that is associated with the plasma membrane and is inducible by sucrose. *Plant Cell Physiology*, 39, 1176-1183.

Izawa T., Foster R. and Chua N. H. (1993): Plant bZIP protein DNA binding specificity. *J Mol Biol*, 230, 1131-44.

Jakoby M., Weisshaar B., Droge-Laser W., Vicente-Carbajosa J., Tiedemann J., Kroj T. and Parcy F. (2002): bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science*, 7, 106-11.

Jiang R. and Carlson M. (1997): The Snf1 protein kinase and its activating subunit, Snf4, interact with distinct domains of the Sip1/Sip2/Gal83 component in the kinase complex. *Molecular and Cellular Biology*, 17, 2099-2106.

Johnson C., Boden E., Desai M., Pascuzzi P. and Arias J. (2001): In vivo target promoter-binding activities of a xenobiotic stress-activated TGA factor. *The Plant J*, 28, 237-43.

Jupin I. and Chua N.H. (1996): Activation of the CaMV as-1 cis-element by salicylic acid: differential DNA-binding of a factor related to TGA1a. *The EMBO Journal*, 15 (20), 5679-89.

Kagaya Y., Hobo T., Murata M., Ban A. and Hattori T. (2002): Abscisic acid-induced transcription is mediated by phosphorylation of an abscisic acid response element binding factor, TRAB1. *The Plant Cell*, 14 (12), 3177-89.

Kaminaka H., Nake C., Epple P., Dittgen J., Schütze K., Chaban C., Holt B.F., Merkle T., Schäfer E., Harter K. and Dangl J.L. (2006): bZIP10-LSD1 antagonism modulates basal defense and cell death in *Arabidopsis* following infection. *The EMBO Journal*, 25, 4400–4411.

Kang S.G., Price J., Lin P.C., Hong J.C. and Jang J.C. (2010): The *Arabidopsis* bZIP1 Transcription Factor Is Involved in Sugar Signaling, Protein Networking, and DNA Binding. *Mol Plant*.

Kaplan F. and Guy C.L. (2005): RNA interference of *Arabidopsis* beta-amylase8 prevents maltose accumulation upon cold shock and increases sensitivity of PSII photochemical efficiency to freezing stress. *The Plant Journal*, 44 (5), 730-43.

Kirby J. and Kavanagh T.A. (2002): NAN fusions: a synthetic sialidase reporter gene as a sensitive and versatile partner for GUS. *The Plant J.*, 32 (3), 391-400.

Kobayashi Y., Murata M., Minami H., Yamamoto S., Kagaya Y., Hobo T., Yamamoto A. and Hattori T. (2005): Abscisic acid-activated SNRK2 protein kinases function in the gene-regulation pathway of ABA signal transduction by phosphorylating ABA response element-binding factors. *The Plant Journal*, 44 (6), 939-49.

Koch K.E. (1996): Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.*, 47, 509-540.

Kolbe A., Tiessen A., Schluemann H., Paul M., Ulrich S. and Geigenberger P. (2005): Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase. *PNAS*, 102, 11118-11123.

Koncz C. and Schell J. (1986): The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue specific expression chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Gen Genet*, 204, 383-396.

Kuchin S., Treich I. and Carlson M. (2000): A regulatory shortcut between the Snf1 protein kinase and RNA polymerase II holoenzyme. *PNAS*, 97 (14), 7916-20.

Kusano T., Berberich T., Harada M., Suzuki N. and Sugawara K. (1995): A maize DNA-binding factor with a bZIP motif is induced by low temperature. *Mol Gen Genet*, 248, 507-17.

Kyhse-Anderson J. (1984): Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Meth*, 10.

Laby R.J., Kim D. and Gibson S.I. (2001): The *ram1* Mutant of *Arabidopsis* Exhibits Severely Decreased α -Amylase Activity. *Plant Physiology*, 127, 1798–1807.

Laemmli U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.

Lam H.M., Hsieh M.H. and Coruzzi G.M. (1998): Reciprocal regulation of distinct asparagines synthetase genes by light and metabolites in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 16, 345-353.

Lam H.M., Peng S.-Y. and Coruzzi G.M. (1994): Metabolic Regulation of the Gene Encoding Glutamine-Dependent Asparagine Synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 106, 1347-1357.

Lam H.M., Wong P., Chan H.-K., Yam K.-M., Chen L., Chow C.-M. and Coruzzi G.M. (2003): Overexpression of the ASN1 Gene Enhances Nitrogen Status in Seeds of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 132, 926–935.

Landschulz W. H., Johnson P. F. and McKnight S. L. (1988): The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science*, 240, 1759-64.

Lao N.T., Schoneveld O., Mould R.M., Hibberd J.M., Gray J.C. and Kavanagh T.A. (1999): An *Arabidopsis* gene encoding a chloroplast-targeted beta-amylase. *The Plant Journal*, 20 (5), 519-27.

Lara P., Onate-Sánchez L., Abraham Z., Ferrándiz C., Díaz I., Carbonero P., Vicente-Carbajosa J. (2003): Synergistic activation of seed storage protein gene expression in *Arabidopsis* by ABI3 and two bZIPs related to OPAQUE2. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 21003-11.

Le Guill C., Parent J.-L., Rola-Pleszczynski M. and Stankova J. (1994): Analysis of recombinant plasmids by a modified alkaline lysis method. *Anal biochem*, 219, 164.

Lea P.J. and Mifflin B.J. (1980): Transport and metabolism of asparagines and other nitrogen compounds within the plant. In *PK Stumpf EE Conn, The Biochemistry of Plants Academic Press, New York*, 569-607.

Lee S.J., Lee M.Y., Yi S.Y., Oh S.K., Choi S.H., Her N.H., Choi D., Min B.W., Yang S.G. and Harn C.H. (2002): PPI1: a novel pathogen-induced basic regionleucine zipper (bZIP): transcription factor from pepper. *Mol Plant Microbe Interaction*, 15, 540-8.

Lejay L., Tillard P., Lepetit M., Olive F., Filleur S., Daniel-Vedele F. and Gojon A. (1999): Molecular and functional regulation of two NO₃- uptake systems by N- and C-status of *Arabidopsis* plants. *The Plant J.*, 18 (5), 509-19.

Lejay L., Wirth J., Pervent M., Cross J.M., Tillard P. and Gojon A. (2008): Oxidative pentose phosphate pathway-dependent sugar sensing as a mechanism for regulation of root ion transporters by photosynthesis. *Plant Physiol.*, 146 (4), 2036-53.

Lender J. (2009): Charakterisierung der *Arabidopsis* Kinasen KIN10 und KIN11 als regulatoren von bZIP Transkriptionsfaktoren. *Diplomarbeit*.

Less H. and Galili G. (2009): Coordinations between gene modules control the operation of plant amino acid metabolic networks. *BMC Syst. Biol.*, 3, 1-18.

Li X.F., Li Y.J., An Y.H., Xiong L.J., Shao X.H., Wang Y. and Sun Y. (2009): AKINbeta1 is involved in the regulation of nitrogen metabolism and sugar signaling in *Arabidopsis*. *J Integr Plant Biol.*, 51 (5), 513-20.

Li Y., Le, K.K., Walsh S., Smith C., Hadingham S., Sorefan K., Cawley G. and Bevan M.W. (2006): Establishing glucose- and ABA-regulated transcription networks in *Arabidopsis* by microarray analysis and promoter classification using a Relevance Vector Machine. *Genome Res*, 16, 414-427.

Lin J.-F. and Wu S.-H. (2004): Molecular events in senescing *Arabidopsis* leaves. *The Plant Journal*, 39, 612-628.

Liu Y., Xu X., Singh-Rodriguez S., Zhao Y. and Kuo M.H. (2005): Histone H3 Ser10 phosphorylation-independent function of Snf1 and Reg1 proteins rescues a gcn5-mutant in HIS3 expression. *Mol Cell Biol.*, 25 (23), 10566-79.

Lloyd J.R., Kossmann J. and Ritte G. (2005): Leaf starch degradation comes out of the shadows. *Trends in Plant Science*, 10 (3), 130-7.

Lo W.S., Duggan L., Emre N.C., Belotserkovskya R., Lane W.S., Shiekhattar R. and Berger S.L. (2001): Snf1 - a histone kinase that works in concert with the histone acetyltransferase Gcn5 to regulate transcription. *Science*, 293 (5532), 1142-6.

Lo W.S., Gamache E.R., Henry K.W., Yang D., Pillus L. and Berger S.L. (2005): Histone H3 phosphorylation can promote TBP recruitment through distinct promoter-specific mechanisms. *The EMBO Journal*, 24 (5), 997-1008.

Lumbreras V., Alba M.M., Kleinow T., Koncz C. and Pagès M. (2001): Domain fusion between SNF1-related kinase subunits during plant evolution. *EMBO Reports*, 2, 55-60.

Lunn J.E., Feil R., Hendriks J.H., Gibon Y., Morcuende R., Osuna D., Scheible W.R., Carillo P., Hajirezaei M.R. and Stitt M. (2006): Sugar-induced increases in trehalose 6-phosphate are correlated with redox activation of ADPglucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Journal*, 397, 139-148.

Lupas A. (1996): Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem Sci*, 21, 375-82.

Lynch M. and Katju V. (2004): The altered evolutionary trajectories of gene duplicates. *Trends Genet*, 20, 544-549.

Mackintosh R.W., Davies S.P., Clarke P.R., Weekes J., Gillespie J.G., Gibb B.J. and Hardie D.G. (1992): Evidence for a protein kinase cascade in higher plants. 3-Hydroxy-methylglutaryl-CoA reductase kinase. *Eur J Biochem*, 209, 923-931.

Martin C. and Smith A.M. (1995): Starch biosynthesis. *The Plant Cell*, 7 (7), 971-85.

Martínez-García J.F., Moyano E., Alcocer M.J. and Martin C. (1998): Two bZIP proteins from *Antirrhinum* flowers preferentially bind a hybrid C-box/G-box motif and help to define a new sub-family of bZIP transcription factors. *The Plant Journal*, 13 (4), 489-505.

Matt P., Schurr U., Krapp A. and Stitt M. (1998): Growth of tobacco in short day conditions leads to high starch, low sugars, altered diurnal changes of the *Nia* transcript and low nitrate reductase activity, and an inhibition of amino acid synthesis. *Planta*, 207, 27-41.

McDonell M.W., Simon M.N. and Studier F.W. (1977): Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J Mol Biol*, 110, 119-46.

Melan M.A., Dong X., Endara M.E., Davis K.R., Ausubel F.M. and Peterman T.K. (1993): An *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. *Plant Physiol.*, 101 (2), 441-50.

Melo-Oliveira R., Olivseira I.C. and Coruzzi G.M. (1996) *Arabidopsis* mutant analysis and gene regulation define a nonredundant role for glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation. *PNAS*, 93, 4718-4723.

Menkens A.E., Schindler U. and Cashmore A.R. (1995): The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins. *Trends Biochem Sci*, 20, 506-10.

Metallo S. J. and Schepartz A. (1997): Certain bZIP peptides bind DNA sequentially as monomers and dimerize on the DNA. *Nat Struct Biol*, 4, 115-7.

Mullis K.B. and Faloona F.A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 155, 335-50.

Murashige T. and Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15, 473-497.

Naar A.M., Lemon B.D. and Tjian R. (2001): Transcriptional coactivator complexes. *Annu Rev Biochem*, 70, 475-501.

Nakashima K., Satoh R., Kiyosue T., Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K. (1998): A gene encoding proline dehydrogenase is not only induced by proline and hypoosmolarity, but is also developmentally regulated in the reproductive organs of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 118, 1233-41.

Niu X. and Gultinan M.J. (1994): DNA binding specificity of the wheat bZIP protein EmBP-1. *Nucleic Acids Res*, 22, 4969-78.

Noble S.M., Carnahan V.E., Moore L.B., Luntz T., Wang H., Ittoop O.R., Stimmel J.B., Davis-Searles P.R., Watkins R.E., Wisely G.B., LeCluyse E., Tripathy A., McDonnell D.P. and Redinbo M.R. (2006): Human PXR forms a tryptophan zipper-mediated homodimer. *Biochemistry*, 45 (28), 8579-89.

Nooden L.D., Guiamet J.J. and John I. (1997): Senescence mechanisms. *Physiol. Plant*, 101, 746-753.

Oliveira I.C. and Coruzzi G.M. (1999): Carbon and amino acids reciprocally modulate the expression of glutamine synthetase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 121, 301-310.

O'Shea E.K., Rutkowski R. and Kim P.S. (1989): Evidence that the leucine zipper is a coiled coil. *Science*, 243, 538-42.

Osuna D., Usadel B., Morcuende R., Gibon Y., Blasing O.E., Hohne M., Gunter M., Kamlage B., Trethewey R., Scheible W.R. and Stitt M. (2007): Temporal responses of transcripts, enzyme activities and metabolites after adding sucrose to carbon-deprived *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Journal*, 49, 463-491.

Oyama T., Shimura Y. and Okada K. (1997): The *Arabidopsis* HY5 gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. *Genes Dev*, 11, 2983-95.

Palenchar P.M., Kouranov A., Lejay L.V. and Coruzzi G.M. (2004): Genome-wide patterns of carbon and nitrogen regulation of gene expression validate the combined carbon and nitrogen (CN)-signaling hypothesis in plants. *Genome Biol.*, 5 (11), R91.

Paul M.J. (2008): Trehalose 6-phosphate: a signal of sucrose status. *Biochem Journal*, 412, e1-2.

Pickett F.B. and Meeks-Wagner D.R. (1995): Seeing double: appreciating genetic redundancy. *The Plant Cell*, 7 (9), 1347-56.

Pilot G., Stransky H., Bushey D.F., Pratelli R., Ludewig U., Wingate V.P.M. and Frommera W.B. (2004): Overexpression of GLUTAMINE DUMPER1 Leads to Hypersecretion of Glutamine from Hydathodes of Arabidopsis Leaves. *The Plant Cell*, 16, 1827–1840.

Polge C. and Thomas M. (2007): SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? *Trends Plant Sci.*, 12 (1), 20-8.

Pontier D., Miao Z.H. and Lam E. (2001): Trans-dominant suppression of plant TGA factors reveals their negative and positive roles in plant defense responses. *The Plant Journal*, 27, 529–538.

Price J., Laxmi A., St Martin S.K. and Jang J.C. (2004): Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 16, 2128-2150.

Quirino B.F., Noh Y.S., Himelblau E. and Amasino R.M. (2000): Molecular aspects of leaf senescence. *Trends Plant Sci.*, 7, 278-82.

Ramon M., Rolland F. and Sheen J. (2008): Sugar Sensing and Signaling. *The Arabidopsis Book* © 2008 American Society of Plant Biologists.

Ringli C. and Keller B. (1998): Specific interaction of the tomato bZIP transcription factor VSF-1 with a non-palindromic DNA sequence that controls vascular gene expression. *Plant Mol Biol.*, 37 (6), 977-88.

Roberts R.J. (1985): Restriction and modification enzymes and their recognition sequences. *Nucleic Acids Res*, 13, 165-200.

Rolland F., Baena-Gonzalez E. and Sheen J. (2006): Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu Rev Plant Biol.*, 57, 675-709.

Rolland F., Moore B. and Sheen J. (2002): Sugar sensing and signaling in plants. *The Plant Cell*, 14, 185-205.

Rook F., Gerrits N., Kortstee A., van Kampen M., Borrias M., Weisbeek P. and Smeekens S. (1998a): Sucrose-specific signalling represses translation of the *Arabidopsis* ATB2 bZIP transcription factor gene. *The Plant Journal*, 15, 253-63.

Rook F., Weisbeek P. and Smeekens S. (1998b): The light-regulated *Arabidopsis* bZIP transcription factor gene ATB2 encodes a protein with an unusually long leucine zipper domain. *Plant Mol Biol*, 37, 171-8.

Rugner A., Frohnmeyer H., Nake C., Wellmer F., Kircher S., Schafer E. and Harter K. (2001): Isolation and characterization of four novel parsley proteins that interact with the transcriptional regulators CPRF1 and CPRF2. *Mol Genet Genomics*, 265, 964-976.

Sambrook, Fritsch and Maniatis (1989): Molecular cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

Sanger F., Nicklen S. and Coulson A.R. (1977): DNA sequencing with chainterminating inhibitors. *PNAS*, 74, 5463-7.

Satoh R., Fujita Y., Nakashima K., Shinozaki K. and Yamaguchi-Shinozaki K. (2004): A novel subgroup of bZIP proteins functions as transcriptional activators in hypoosmolarity-responsive expression of the *ProDH* gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.*, 45 (3), 309-17.

Satoh R., Nakashima K., Seki M., Shinozaki K. and Yamaguchi-Shinozaki K. (2002): ACTCAT, a novel cis-acting element for proline- and hypoosmolarity-responsive expression of the *ProDH* gene encoding proline dehydrogenase in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 130 (2), 709-19.

Schaller F. (2001): Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signaling molecules. *J Exp Bot*, 52, 11-23.

Scheible W.R., Morcuende R., Czechowski T., Fritz C., Osuna D., Palacios-Rojas N., Schindelasch D., Thimm O., Udvardi M.K. and Stitt M. (2004): Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen. *Plant Physiology*, 136 (1), 2483-99.

Schewe T. and Kühn H. (1991): Do 15-lipoxygenases have a common biological role? *Trends Biochem. Sci.*, 16, 369-373.

Schindler U., Beckmann H. and 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. *The Plant Cell*, 4 (10), 1309-19.

Schindler U., Terzaghi W., Beckmann H., Kadesch T. and Cashmore A.R. (1992): DNA binding site preferences and transcriptional activation properties of the *Arabidopsis* transcription factor GBF1. *The Embo Journal*, 11, 1275-89.

Schmidt M.C. and McCartney R.R. (2000): Beta-subunits of Snf1 kinase are required for kinase function and substrate definition. *The EMBO Journal*, 19 (18), 4936-43.

Schmidt R.J., Ketudat M., Aukerman M.J. and Hoschek G. (1992): Opaque-2 is a transcriptional activator that recognizes a specific target site in 22-kD zein genes. *The Plant Cell*, 4, 689-700.

Schüller H.J. (2003): Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet.*, 43 (3), 139-60.

Schurr U., Walter A. and Rascher U. (2006): Functional dynamics of plant growth and photosynthesis - from steady-state to dynamics - from homogeneity to heterogeneity. *Plant Cell Environment*, 29 (3), 340-52.

Schuster J. and Binder S. (2005): The mitochondrial branched chain aminotransferase (AtBCAT-1) is capable to initiate degradation of leucine, isoleucine and valine in almost all tissues in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 57, 241–254.

Schütze K., Harter K. and Chaban C. (2008): Post-translational regulation of plant bZIP factors. *Trends Plant Science*, 13 (5), 247-55.

Sheen J. (1993): Protein phosphatase activity is required for light-inducible gene expression in maize. *The EMBO Journal*, 12 (9), 3497-505.

Shimizu H., Sato K., Berberich T., Miyazaki A., Ozaki R., Imai R. and Kusano T. (2005): LIP19, a basic region leucine zipper protein, is a Fos-like molecular switch in the cold signaling of rice plants. *Plant Cell Physiol*, 46, 1623-1634.

Shirra M.K., Rogers .SE., Alexander D.E. and Arndt K.M. (2005): The Snf1 protein kinase and Sit4 protein phosphatase have opposing functions in regulating TATA-binding protein association with the *Saccharomyces cerevisiae* INO1 promoter. *Genetics*, 169 (4), 1957-72.

Siberil Y., Doireau P. and Gantet P. (2001): Plant bZIP G-box binding factors. Modular structure and activation mechanisms. *Eur J Biochem*, 268, 5655-66.

Sieciechowicz K.A., Joy K.W. and Ireland R.J. (1988): The metabolism of asparagine in plants. *Phytochemistry*, 27, 663-671.

Slocombe S.P., Beaudoin F., Donaghy P.G., Hardie D.G., Dickinson J.R. and Halford N.G. (2004): SNF1-related protein kinase (snRK1) phosphorylates class I heat shock protein. *Plant Physiol Biochem.*, 42 (2), 111-6.

Slocombe S.P., Laurie S., Bertini L., Beaudoin F., Dickinson J.R. and Halford N.G. (2002): Identification of SnIP1, a novel protein that interacts with SNF1-related protein kinase (SnRK1). *Plant Mol Biol.*, 49 (1), 31-44.

Smart C.M. (1994): Gene expression during leaf senescence. *New Phytol*, 126, 419-448.

Smith A.M. and Stitt M. (2007): Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant Cell Environment*, 30 (9), 1126-49.

Smith A.M., Zeeman S.C. and Smith S.M. (2005): Starch Degradation. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 56, 73–98

Smith H.O. and Wilcox K.W. (1970): A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*. Purification and general properties. *J Mol Biol*, 51, 379-91.

Smith S.M., Fulton D.C., Chia T., Thorneycroft D., Chapple A., Dunstan H., Hylton C., Zeeman S.C., and Smith A.M. (2004): Diurnal Changes in the Transcriptome Encoding Enzymes of Starch Metabolism Provide Evidence for Both Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of Starch Metabolism in Arabidopsis Leaves. *Plant Physiology*, 136, 2687–2699.

Solfanelli C., Poggi A., Loreti E., Alpi A. and Perata P. (2006): Sucrose-specific induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 140, 637-646.

Solomon M.J. and Varshavsky A. (1985): Formaldehyde-mediated DNA-protein crosslinking: a probe for in vivo chromatin structures. *PNAS*, 82, 6470-4.

Solomon M.J., Larsen P.L. and Varshavsky A. (1988): Mapping protein-DNA interactions in vivo with formaldehyde: evidence that histone H4 is retained on a highly transcribed gene. *Cell*, 53, 937-47.

Song Y.H., Yoo C.M., Hong A.P., Kim S.H., Jeong H.J., Shin S.Y., Kim H.J., Yun D.J., Lim C.O., Bahk J.D., Lee S.Y., Nagao R.T., Key J.L. and Hong J.C. (2008): DNA-binding study identifies C-box and hybrid C/G-box or C/A-box motifs as high-affinity binding sites for STF1 and LONG HYPOCOTYL5 proteins. *Plant Physiology*, 146 (4), 1862-77.

Southern E.M. (1979): Measurement of DNA length by gel electrophoresis. *Anal Biochem*, 100, 319-23.

Sparla F., Costa A., Lo Schiavo F., Pupillo P. and Trost P. (2006): Redox regulation of a novel plastid-targeted beta-amylase of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 141 (3), 840-50.

Sprenger-Haussels M. and Weisshaar B. (2000): Transactivation properties of parsley proline-rich bZIP transcription factors. *The Plant Journal*, 22, 1-8.

Stenzel I., Hause B., Miersch O., Kurz T., Maucher H., Weichert H., Ziegler J., Feussner I. and Wasternack C. (2003): Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 51, 895–911.

Stitt M. (1990): Fructose 2,6-bisphosphate as a regulatory metabolite in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 41, 153–185.

Strathmann A., Kuhlmann M., Heinekamp T. and Droge-Laser W. (2001): BZI-1 specifically heterodimerises with the tobacco bZIP transcription factors BZI-2, BZI-3/TBZF and BZI-4, and is functionally involved in flower development. *The Plant Journal*, 28, 97-408.

Stryer L., Berg J.M. and Tymoczko J.L. (2003): Biochemie. 5.Auflage. *Spektrum Verlag*.

Sugden C., Crawford R.M., Halford N.G. and Hardie D.G. (1999): Regulation of spinach SNF1-related (SnRK1) kinases by protein kinases and phosphatases is associated with phosphorylation of the T loop and is regulated by 5'-AMP. *The Plant Journal*, 19 (4), 433-9.

Sugden C., Donaghy P.G., Halford N.G. and Hardie D.G. (1999): Two SNF1-related protein kinases from spinach leaf phosphorylate and inactivate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, nitrate reductase, and sucrose phosphate synthase *in vitro*. *Plant Physiology*, 120 (1), 257-74.

Sulpice R., Pyl E.T., Ishihara H., Trenkamp S., Steinfath M., Witucka-Wall H., Gibon Y., Usadel B., Poree F., Piques M.C., Von Korff M., Steinhauser M.C., Keurentjes J.J., Guenther M., Hoehne M., Selbig J., Fernie A.R., Altmann T. and Stitt M. (2009): Starch as a major integrator in the regulation of plant growth. *PNAS*, 106 (25), 10348-53.

Swidzinski J.A., Sweetlove L.J. and Leaver C.J. (2002): A custom microarray analysis of gene expression during programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 30, 431-46.

Szemenyei H., Hannon M. and Long J.A. (2008): TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during *Arabidopsis* embryogenesis. *Science*, 319 (5868), 1384-6.

Takeda S., Mano S., Ohto M. and Nakamura K. (1994): Inhibitors of Protein Phosphatases 1 and 2A Block the Sugar-Inducible Gene Expression in Plants. *Plant Physiology*, 106 (2), 567-574.

Teng S., Keurentjes J., Bentsink L., Koornneef M. and Smeekens S. (2005): Sucrose-specific induction of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* requires the MYB75/PAP1 gene. *Plant Physiology*, 139, 1840-1852.

Thimm O., Blasing O., Gibon Y., Nagel A., Meyer S., Kruger P., Selbig J., Muller L.A., Rhee S.Y. and Stitt M. (2004): MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *The Plant Journal*, 37, 914-939.

Thomas P.S. (1980): Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *PNAS*, 77, 5201-5205.

Thompson J., Taylor C. and Wang T.W. (2000): Altered membrane lipase expression delays leaf senescence. *Biochem Soc Trans*, 28 (6), 775-7.

Thum K., Shin M., Palenchar P., Kouranov A. and Coruzzi G. (2004): Genome-wide investigation of light and carbon signaling interactions in *Arabidopsis*. *Genome Biology*, 5, R10.

Thum K.E., Shasha D.E., Lejay L.V. and Coruzzi G.M. (2003): Light- and Carbon-Signaling Pathways. Modeling Circuits of Interactions. *Plant Physiology*, 132, 440–452.

Tiessen A., Prescha K., Branscheid A., Palacios N., McKibbin R., Halford N.G. and Geigenberger P. (2003): Evidence that SNF1-related kinase and hexokinase are involved in separate sugar-signalling pathways modulating post-translational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in potato tubers. *The Plant Journal*, 35 (4), 490-500.

Toroser D., Plaut Z. and Huber S.C. (2000): Regulation of a plant SNF1-related protein kinase by glucose-6-phosphate. *Plant Physiology*, 123 (1), 403-12.

Usadel, B., Bläsing O.E., Gibon Y., Retzlaff K., Höhne M., Günther M. and Stitt M. (2008): Global transcript levels respond to small changes of the carbon status during progressive exhaustion of carbohydrates in *Arabidopsis* rosettes. *Plant Physiology*, 146, 1834-61.

Van der Graaff E., Schwacke R., Schneider A., Desimone M., Flüge U.I. and Kunze R. (2006): Transcription analysis of arabidopsis membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence. *Plant Physiology*, 141 (2), 776-92.

Vaughn M.W., Harrington G.N. and Bush D.R. (2002): Sucrose-mediated transcriptional regulation of sucrose symporter activity in the phloem. *PNAS*, 99, 10876-10880.

Vauquelin L.N. and Robiquet P.J. (1806): The discovery of a new plant principle in *Asparagus sativus*. *Annals de Chemie*, 88-93.

Vellosillo T., Martinez M., Lopez M.A., Vicente J., Cascon T., Dolan L., Hamberg M. and Castresana C. (2007): Oxylipins Produced by the 9-Lipoxygenase Pathway in *Arabidopsis* Regulate Lateral Root Development and Defense Responses through a Specific Signaling Cascade. *The Plant Cell*.

Vincent O. and Carlson M. (1999): Gal83 mediates the interaction of the Snf1 kinase complex with the transcription activator Sip4. *The EMBO Journal*, 18, 6672-6681.

Vincent O., Townley R., Kuchin S. and Carlson M. (2001): Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific beta subunits and a novel glucose signaling mechanism. *Genes Dev.*, 15 (9), 1104-14.

Vinson C., Myakishev M., Acharya A., Mir A. A., Moll J. R. and Bonovich M. (2002): Classification of human bZIP proteins based on dimerization properties. *Mol Cell Biol*, 22, 6321-35.

Wang Q., Monroe J. and Sjolund R.D. (1995): Identification and Characterization of a Phloem-Specific β -Amylase. *Plant Physiology*, 109, 743-750.

Wang R., Okamoto M., Xing X. and Crawford N.M. (2003): Microarray analysis of the nitrate response in Arabidopsis roots and shoots reveals over 1,000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, and sulfate metabolism. *Plant Physiol.*, 132 (2), 556-67.

Warden S.M., Richardson C., O'Donnell J. Jr, Stapleton D., Kemp B.E. and Witters L.A. (2001): Post-translational modifications of the beta-1 subunit of AMP-activated protein kinase affect enzyme activity and cellular localization. *Biochem J.*, 354, 275-83.

Weaver L.M., Gan S., Quirino B. and Amasino R.M. (1998): A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Mol Biol*, 37, 455-69.

Weckwerth W. (2003): Metabolomics in Systems Biology. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 54, 669-89.

Weltmeier F. (2005): Ein Netzwerk von heterodimerisierenden C/S1 AtbZIP Transkriptionsfaktoren und seine Funktion in Seneszenz, Stressantwort und Samenentwicklung. *Dissertation*.

Weltmeier F., Ehlert A., Mayer C.S., Dietrich K., Wang X., Schütze K., Alonso R., Harter K., Vicente-Carbajosa J. and Dröge-Laser W. (2006): Combinatorial control of proline dehydrogenase transcription by specific heterodimerisation of bZIP transcription factors. *The EMBO Journal*, 13, 3133-43.

Weltmeier F., Rahmani F., Ehlert A., Dietrich K., Schütze K., Wang X., Chaban C., Hanson J., Teige M., Harter K., Vicente-Carbajosa J., Smeekens S. and Dröge-Laser W. (2009): Expression patterns within the *Arabidopsis* C/S1 bZIP transcription factor network: availability of heterodimerization partners controls gene expression during stress response and development. *Plant Mol Biol*, 69, 107-119.

Wenzler H., Mignery G., Fisher L. and Park W. (1989): Sucrose-regulated expression of a chimeric potato tuber gene in leaves of transgenic tobacco plants. *Plant Mol. Biol.*, 13, 347-354.

White J., Chang S.Y. and Bibb M.J. (1990): A cassette containing the bar gene of *Streptomyces hygroscopicus*: a selectable marker for plant transformation. *Nucleic Acids Res*, 18, 1062.

Wiese A., Elzinga N., Wobbes B. and Smeekens S. (2004): A conserved upstream open reading frame mediates sucrose-induced repression of translation. *The Plant Cell*, 16, 1717-1729.

Williams M.E., Foster R. and Chua N.H. (1992): Sequences Flanking the Hexameric G-Box Core CACGTG affect the Specificity of Protein Binding. *The Plant Cell*, 4, 485-496.

Woods A., Cheung P. C. F., Smith F. C., Davison M. D., Scott J., Beri R. K. and Carling D. (1996): Characterisation of AMP-activated protein kinase β and γ subunits: assembly of the heterotrimeric complex in vitro. *J. Biol. Chem.*, 271, 10282–10290.

Woods A., Munday M.R., Scott J., Yang X., Carlson M. and Carling D. (1994): Yeast SNF1 is functionally related to mammalian AMP-activated protein kinase and regulates acetyl-CoA carboxylase *in vivo*. *J Biol Chem.*, 269 (30), 19509-15.

Yakir E., Hilman D., Hassidim M. and Green R.M. (2007): CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1 transcript stability and the entrainment of the circadian clock in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 145, 925-932.

Yokoyama R., Hirose T., Fujii N., Aspuria E.T., Kato A. and Uchimiya H. (1994): The rolC promoter of *Agrobacterium rhizogenes* Ri plasmid is activated by sucrose in transgenic tobacco plants. *Mol. Gen. Genet.*, 244, 15-22.

Yoo S.D., Cho Y.H. and Sheen J. (2007): *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat Protoc.*, 2 (7), 1565-72.

Yu T.S., Kofler H., Häusler R.E., Hille D., Flügge U.I., Zeeman S.C., Smith A.M., Kossmann J., Lloyd J., Ritte G., Steup M., Lue W.L., Chen J. and Weber A. (2001): The *Arabidopsis* *sex1* mutant is defective in the R1 protein, a general regulator of starch degradation in plants, and not in the chloroplast hexose transporter. *The Plant Cell*, 13, 1907–1918.

Yu T.S., Zeeman S.C., Thorneycroft D., Fulton D.C., Dunstan H., Lue W.L., Hegemann B., Tung S.Y., Umemoto T., Chapple A., Tsai D.L., Wang S.M., Smith A.M., Chen J. and Smith S.M. (2005): alpha-Amylase is not required for breakdown of transitory starch in *Arabidopsis* leaves. *J Biol Chem.*, 280 (11), 9773-9.

Zeeman S.C. and Smith S.M. and Smith A.M. (2007): The diurnal metabolism of leaf starch. *Biochem. J.*, 401, 13–28.

Zhang Y., Fan W., Kinkema M., Li X. and 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*, 96 (11), 6523-8.

Zhang Y., Primavesi L.F., Jhurrea D., Andralojc P.J., Mitchell R.A., Powers S.J., Schlupepmann H., Delatte T., Winkler A. and Paul M.J. (2009): Inhibition of Snf1-related protein kinase (SnRK1) activity and regulation of metabolic pathways by trehalose 6-phosphate. *Plant Physiology*.

8 Anhang

8.1 Zusätzliche Informationen

8.1.1 Northern Analyse der Expression der Lipoxygenasen *LOX3*, *LOX4*, *LOX5* und *LOX6*

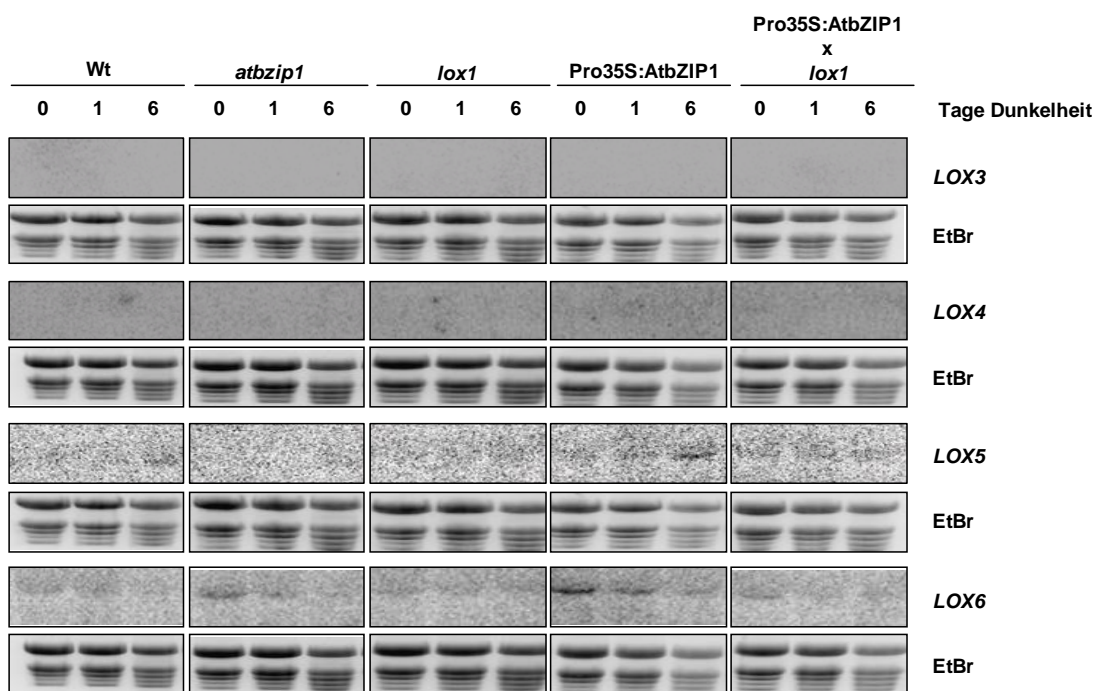


Abb. 8.1: Northern Analyse der Expression von *LOX3*, *LOX4*, *LOX5* und *LOX6*

Pflanzen wurden 3-4 Wochen im Langtag angezogen. Anschließend wurden die Pflanzen dunkel gestellt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils 8-10 Pflanzen pro Linie geerntet und zusammen aufgearbeitet. Daraus wurde RNA gewonnen und im Northern mit Sonden für die oben angegebenen Gene untersucht. EtBr: Ethidiumbromid-Färbung der verwendeten RNA-Gele zum Nachweis der gleichmäßigen Beladung.

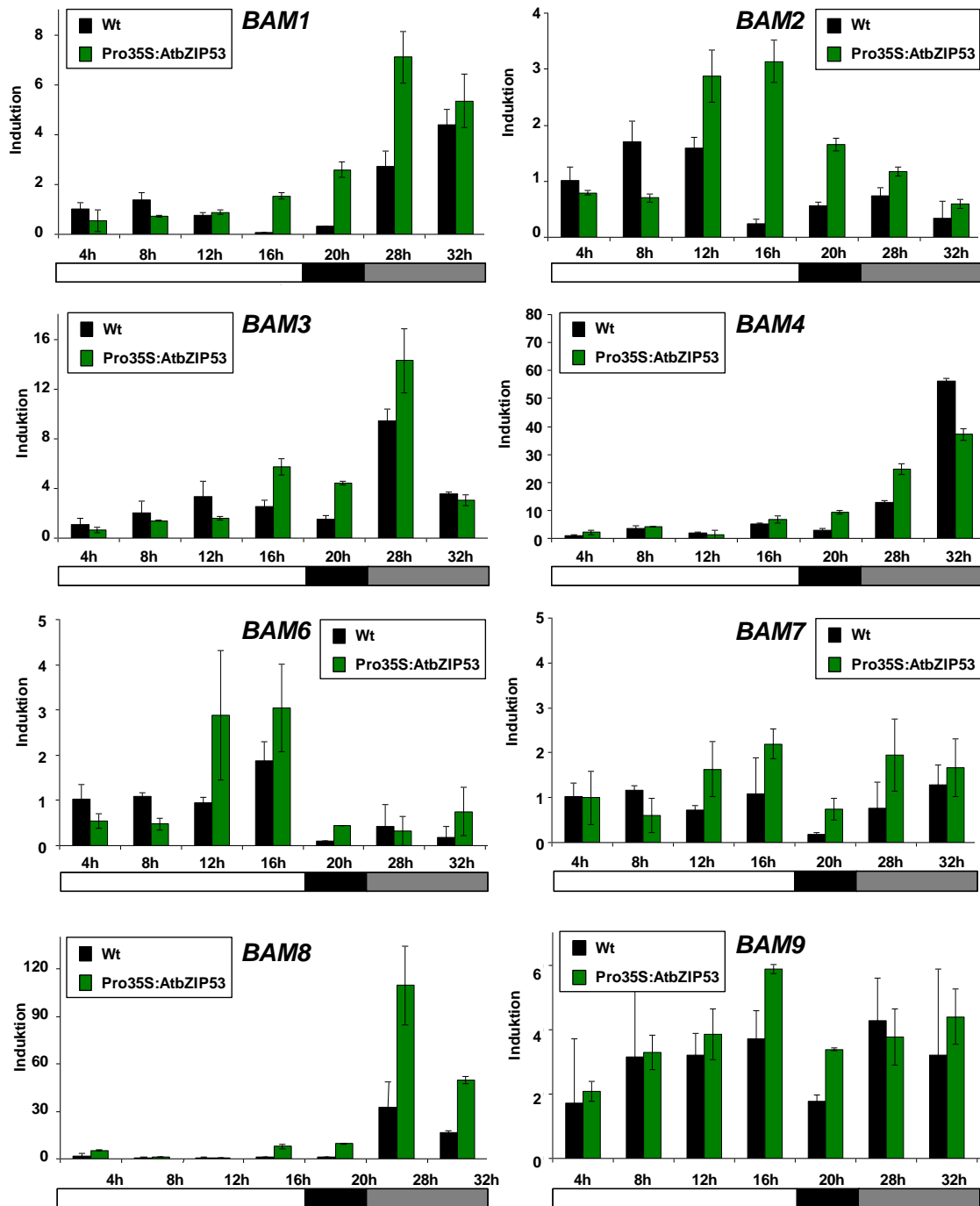
8.1.2 Expression der β -Amylasen *BAM1-4* und *BAM6-9*

Abb. 8.2: Die Expression der β -Amylasen in *Pro35S:AtbZIP53* Pflanzen und Wildtyp

Wildtyp und *Pro35S:AtbZIP53* Pflanzen wurden 3-4 Wochen im Langtag angezogen und danach dunkel gestellt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils 8-10 Pflanzen geerntet und zusammen aufgearbeitet. Die cDNA wurde mit Hilfe von quantitativer Real-Time PCR und Primern für die β -Amylasen untersucht. Angegeben sind die relativen Werte im Vergleich zur Expression nach 4 Stunden Dunkelheit von je zwei Replikaten nach Abgleich mit dem Haushaltsgen *Ubiquitin*. Der Versuch wurde mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt. weißer Balken: normale Lichtphase (16h), schwarzer Balken: normale Nacht (8h), grauer Balken: verlängerte Nacht.

8.1.3 Expression von AtbZIP1 und AtbZIP53 in Wildtyp, AtbZIP1 und AtbZIP53 Überexpremierern und Doppelmutante

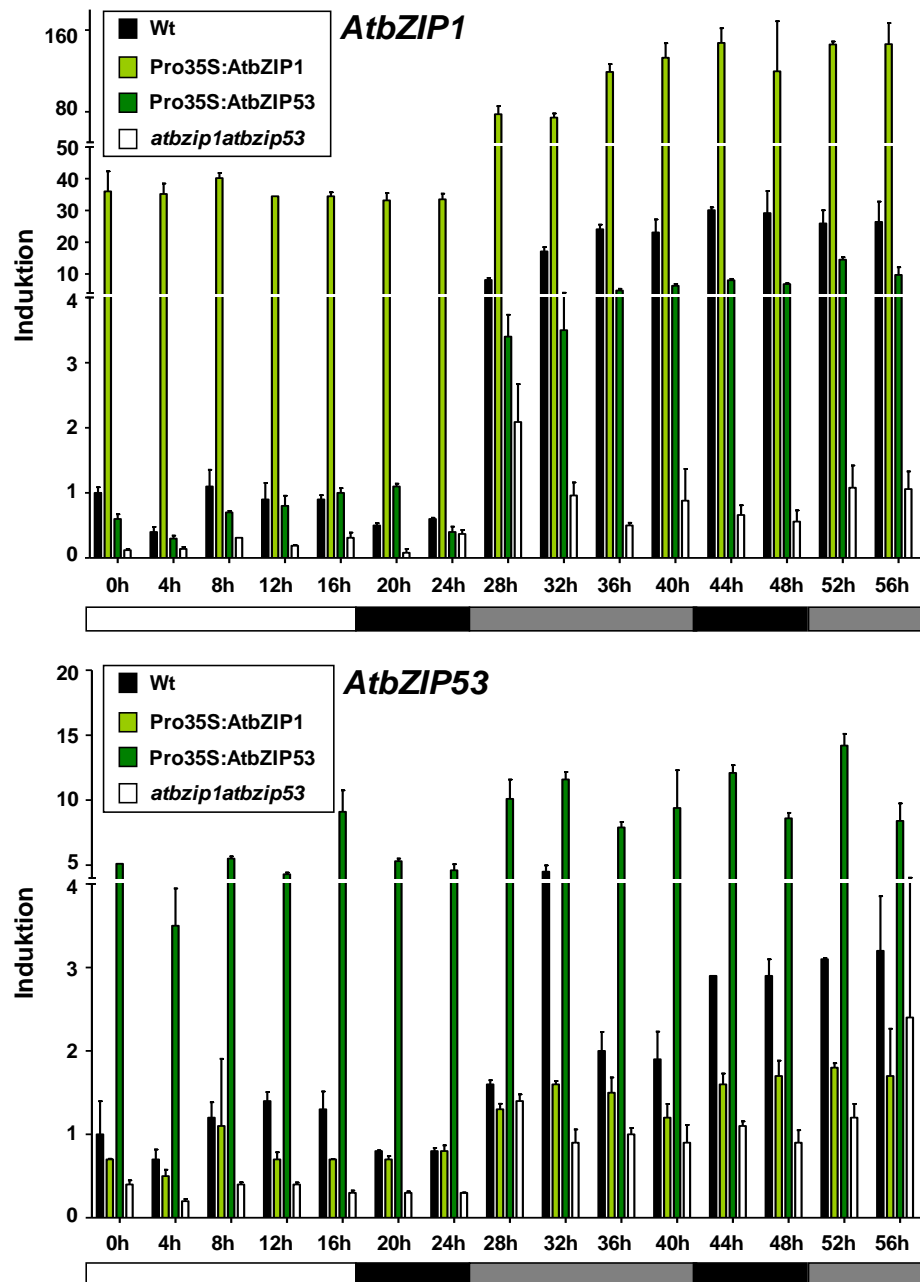


Abb. 8.3: Detaillierte qPCR-Analyse der Expression von AtbZIP1 und AtbZIP53 in Wildtyp, Überexpremierern und Doppelmutante während der verlängerten Nacht

Die Pflanzen wurden 3-4 Wochen im Langtag angezogen und danach dunkel gestellt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils 8-10 Pflanzen geerntet und zusammen aufgearbeitet. Die Expression von AtbZIP1 und AtbZIP53 wurde mit Hilfe der qPCR untersucht. Angegeben sind die relativen Werte im Vergleich zur Expression nach 0 Stunden Dunkelheit von je zwei Replikaten nach Abgleich mit dem Haushaltsgen *Ubiquitin*. Zur besseren Übersicht ist die y-Achse bei AtbZIP1 zweimal (bei 4facher und 50 facher Induktion) und bei AtbZIP53 einmal (bei 4facher Induktion) unterbrochen. weißer Balken: normale Lichtphase (16h), schwarzer Balken: normale Nacht (8h), grauer Balken: verlängerte Nacht

8.1.4 Aminosäuresequenz von AtbZIP1

Serine und Threonin können theoretisch durch Kinasen phosphoryliert werden. Sie sind in der folgenden Aminosäuresequenz von AtbZIP1 rot dargestellt. Das Serin an Stelle 133, das für die Protoplastenversuche durch Alanin ausgetauscht wurde, da die umgebenden Aminosäuren dem in Huang und Huber (2001) beschriebenen SnRK-Phosphorylierungsmotiv ähneln, ist zusätzlich gelb hinterlegt.

MANAEK**TSSGSD**IDEKKRKRKLS**NR**ESARR**SRL**KKQKLMED**TI**HEI**SSL**ERRIKE
 N**S**ERCRAVKQRLD**SV**ETENAGLR**SE**KIWL**SS**YVSDLENMIAT**TS**LT**TQ**SGGGD
 CVDDQNANAGIAVGDCRR**TP**WKL**S**CGSLQPMAS**FK**T

8.1.5 Aminosäuresequenz von AtbZIP53

Serine und Threonin können theoretisch durch Kinasen phosphoryliert werden. Sie sind in der folgenden Aminosäuresequenz von AtbZIP53 rot dargestellt. Das Serin an Stelle 140, das für die Protoplastenversuche durch Alanin ausgetauscht wurde, da die umgebenden Aminosäuren dem in Huang und Huber (2001) beschriebenen SnRK-Phosphorylierungsmotiv ähneln, ist zusätzlich gelb hinterlegt.

M**GS**LQM**Q****TS**PESDNDPRYAT**VT**DERKRRKRMIS**NR**ESARR**S**RMRKQKQLGDLIN
 EV**TLL**KNDNAK**IT**EQVDEAS**SK**KYIEMES**SK**NNVLRAQ**AS**EL**TD**RRL**SL**NS**V**LEM
 VEEI**SG**QALDIPEIPES**MQ**NPWQMPCPMQPIRA**S**ADMFDC

8.1.6 Aminosäuresequenz von AtbZIP63

Von AtbZIP63 existieren insgesamt drei Splicing Varianten. Für alle gezeigten Versuche in dieser Arbeit wurde die Splicing Variante AtbZIP63.2 verwendet. Sie ist die längste der drei Varianten. Serine und Threonin können theoretisch durch Kinasen phosphoryliert werden. Sie sind in der folgenden Aminosäuresequenz von AtbZIP63 rot dargestellt. Die Serine an Stelle 29, 59, 261 und 300 sind *in vivo* phosphoryliert (persönliche Mitteilung M. Teige, Universität Wien) und wurden für die Protoplastenversuche durch Alanin ersetzt. Sie sind zusätzlich gelb hinterlegt.

MEKVFSDDEISGNHHWSVNGMTSLNRSASEWAFNRFIQESSAAADDGESTTAC
GVSVSPPNVPVDSEERYAFLKSKLNLACAAVAMKRGTFIKPQDTSGRSDNGG
ANESEQASLASSKATPMMSSAITSGSELGDEEEADGETNMNPTNVKRVKRMML
SNRESARRSRRRKQAHLSELETQVSQLRVENSKLMKGLTDVTQTFNDASVENR
VLKANIETLRAKVKMAEETVKRLTGFNPMFHNMPQIVSTVSLPSETNSPDTTTS
SQVTTPEIISSGNKGKALIGCKMNRRTASMRRVESLEHLQKRIRSVGDQ

8.1.7 ACGT Elemente in den Promotoren der untersuchten Aminosäuregene

Tabelle 8.1: Alle in dieser Arbeit untersuchten Gene des Aminosäuremetabolismus enthalten ACGT Elemente in ihren Promotoren

Die ersten 1000bp der Promotoren vor dem Beginn des Start-Codons wurden auf das Vorhandensein von ACGT-ähnlichen Motiven hin untersucht. Angegeben sind Name und AGI Code der untersuchten Gene sowie die Sequenz und Bezeichnung der ACGT-Elemente.

Gene	AGI code	ACGT-like elements (-1000 bp promoter region)	Box
<i>ANS</i>	At3g16150	-882 attACGTaag -873 -776 ttgACGTata -767 -752 ataACGTaga -743 -511 ctgACGTgga -502 -361 ataACGTttc -352	A C/A T/A C/G T
<i>ASN1</i>	At3g47340	-731 ttaACGTttt -722 -557 aacACGTgta -548 -377 cggACGTcgt -368 -354 aacACGTgga -345 -167 tctACGTgca -158	T G2 C G1 A/G
<i>ASP3</i>	At5g11520	-841 tcaACGTggt -832 -480 tatACGTtga -471 -122 cttACGTggc -113	T/G A/T A/G
<i>BCAT2</i>	At1g10070	-804 aaaACGTtgt -795 -770 ctgACGTggc -761 -749 acaACGTggt -740 -712 aagACGTtga -703 -633 ccaACGTggc -624 -337 gacACGTcta -328 -164 cttACGTggt -155	T C/G T/G C/T T/G G/C A/G
<i>GDH2</i>	At5g07440	-974 ctaACGTgga -965 -737 tccACGTccc -728 -282 ctgACGTagg -273 -273 gatACGTcaa -264	T/G G/C C/A A/C
<i>GLNS</i>	At5g37600	-157 ttcACGTcac -148	G/C
<i>PepCK</i>	At5g65690	-738 aaaACGTgct -729 -524 caaACGTgaa -515 -467 tgcACGTaaa -458 -423 tcaACGtaat -414 -334 ataACGTgag -325 -76 tatACGTgta -67	T/G T/G G/A T/A T/G A/G
<i>ProDH</i>	At3g30775	-842 cACTCATcct -833 -714 gACTCATcct -705 -683 ctgACGTcct -674 -572 ataACGTagc -563 -197 aaaACGTgta -188 -171 tttACGTgct -162	ACT2 ACT1 C T/A T/G A/G

8.1.8 Charakterisierung der AtbZIP Einzel- und Mehrfachmutanten

Tabelle 8.2: In dieser Arbeit verwendete Einzel- und Mehrfach-Mutanten
 Angegeben sind die SALK-Nr., der Insertionsort der T-DNA und ob es sich laut Real-Time Analysen um einen Knock-Out oder Knock-Down handelt.

Mutante	SALK Nr.	Insertion in	Knock down / Knock out
<i>atbzip1</i>	SALK_059343	ORF	Knock out
<i>atbzip53</i>	SALK_069883	5'UTR	Knock down
<i>atbzip1 atbzip53</i>	SALK_059343 SALK_069883	ORF 5'UTR	Knock out Knock down
<i>atbzip1 atbzip53 atbzip9 atbzip63</i>	SALK_059343 SALK_069883 SALK_093416 SALK_066531	ORF 5'UTR 3. Exon 5'UTR	Knock out Knock down Knock out Knock down
<i>atbzip1 atbzip53 tbzip10 atbzip25</i>	SALK_059343 SALK_069883 SALK_106031 SALK_119931	ORF 5'UTR 3. Exon 1. Exon	Knock out Knock down Knock out Knock out

8.2 Tabellarische Darstellung der Originaldaten aus der Aminosäuremessung

Die folgenden Tabellen zeigen die Mittelwerte (Mean) und Standardabweichungen (SD) der einzelnen Aminosäuregehalte in ng AS / mg Trockengewicht.

Mittelwerte (Mean) und Standardabweichungen (SD)						
[ng/mg Trockengewicht]	Alanin		Aminobuttersäure		Arginin	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Wt 0d	4,13	0,56	2,07	0,37	14,13	13,29
Wt 1d	8,05	3,25	1,61	0,54	16,88	5,13
Wt 4d	4,73	0,64	3,03	0,17	30,80	7,62
Wt 6d	5,46	0,43	3,40	0,09	50,78	19,91
Pro35S:bZIP1 0d	3,30	0,23	1,95	0,72	11,32	0,81
Pro35S:bZIP1 1d	4,87	0,65	2,08	0,05	11,55	1,01
Pro35S:bZIP1 4d	2,88	0,54	3,41	0,04	28,76	4,10
Pro35S:bZIP1 6d	2,96	1,09	3,49	1,59	28,93	8,65
Pro35S:bZIP53 0d	3,40	0,31	2,81	1,27	37,12	2,51
Pro35S:bZIP53 1d	4,53	0,40	1,93	0,11	23,74	11,72
Pro35S:bZIP53 4d	2,08	0,21	3,23	0,02	105,20	7,92
Pro35S:bZIP53 6d	1,36	0,34	3,37	0,23	134,13	10,10
<i>atbzip1 atbzip53 0d</i>	5,10	0,01	1,60	0,47	8,41	2,32
<i>atbzip1 atbzip53 1d</i>	6,43	0,67	1,26	0,10	8,17	0,28
<i>atbzip1 atbzip53 4d</i>	5,76	0,68	1,91	0,53	22,21	3,41
<i>atbzip1 atbzip53 6d</i>	5,86	0,90	1,86	0,18	30,39	2,51

[ng/mg Trockengewicht]	Asparagin		Aspartat		Citrullin	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Wt 0d	19,22	10,36	9,30	0,79	2,12	0,72
Wt 1d	44,66	7,65	11,66	3,47	2,27	0,11
Wt 4d	143,06	12,67	6,36	0,08	1,24	0,14
Wt 6d	280,86	124,35	11,52	7,98	1,00	0,15
Pro35S:bZIP1 0d	16,08	1,48	5,48	1,19	1,15	0,50
Pro35S:bZIP1 1d	36,50	2,97	5,60	0,65	1,48	0,48
Pro35S:bZIP1 4d	121,76	23,36	3,94	0,02	0,50	0,19
Pro35S:bZIP1 6d	136,29	38,33	4,99	1,41	0,55	0,18
Pro35S:bZIP53 0d	118,80	0,39	9,43	2,69	3,55	0,13
Pro35S:bZIP53 1d	98,41	7,55	8,61	0,46	1,58	0,33
Pro35S:bZIP53 4d	500,29	6,11	10,77	0,50	1,96	0,57
Pro35S:bZIP53 6d	574,13	52,91	11,48	1,38	2,15	0,25
<i>atbzip1 atbzip53 0d</i>	12,10	1,80	4,86	0,68	0,66	0,38
<i>atbzip1 atbzip53 1d</i>	11,19	2,98	5,20	3,10	1,30	0,75
<i>atbzip1 atbzip53 4d</i>	45,92	0,43	1,88	0,14	0,69	0,08
<i>atbzip1 atbzip53 6d</i>	109,28	5,35	3,58	0,13	0,38	0,17

	GABA		Glutamat		Glutamin	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
[ng/mg Trockengewicht]						
Wt 0d	0,26	0,37	18,04	4,61	38,38	18,23
Wt 1d	1,37	0,14	24,75	16,43	61,00	11,13
Wt 4d	1,25	0,74	28,18	11,49	41,63	21,63
Wt 6d	4,16	0,76	33,85	26,88	42,08	16,92
Pro35S:bZIP1 0d	0,00	0,00	9,44	6,96	17,37	3,88
Pro35S:bZIP1 1d	0,00	0,00	24,13	0,04	24,73	4,05
Pro35S:bZIP1 4d	2,98	0,05	41,39	3,64	17,73	4,18
Pro35S:bZIP1 6d	3,08	1,53	35,30	11,80	16,71	4,77
Pro35S:bZIP53 0d	0,89	1,26	24,55	11,84	62,73	7,01
Pro35S:bZIP53 1d	1,36	0,34	14,58	1,11	47,15	20,61
Pro35S:bZIP53 4d	1,28	0,28	41,13	5,29	68,60	16,23
Pro35S:bZIP53 6d	1,90	0,16	46,73	5,77	63,88	1,22
<i>atbzip1 atbzip53 0d</i>	0,00	0,00	12,85	6,46	47,74	0,05
<i>atbzip1 atbzip53 1d</i>	0,00	0,00	4,35	4,39	27,97	13,34
<i>atbzip1 atbzip53 4d</i>	1,58	0,83	6,74	0,86	18,80	2,75
<i>atbzip1 atbzip53 6d</i>	2,65	0,16	17,67	2,13	46,21	3,95

	Glycin		Histidin		Hydroxy Lysin	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
[ng/mg Trockengewicht]						
Wt 0d	2,64	1,11	0,34	0,48	1,42	1,01
Wt 1d	1,00	0,46	1,69	0,31	1,03	0,80
Wt 4d	1,15	0,11	8,78	0,82	0,84	1,18
Wt 6d	1,58	0,83	12,65	1,34	1,10	1,55
Pro35S:bZIP1 0d	1,61	0,24	1,32	0,38	0,35	0,50
Pro35S:bZIP1 1d	0,99	0,20	1,94	0,35	1,25	1,76
Pro35S:bZIP1 4d	2,10	0,31	10,68	2,32	2,07	0,78
Pro35S:bZIP1 6d	1,38	0,47	14,23	2,85	0,20	0,28
Pro35S:bZIP53 0d	9,01	1,23	1,99	0,57	1,17	0,19
Pro35S:bZIP53 1d	1,06	0,00	1,87	0,12	1,62	0,81
Pro35S:bZIP53 4d	1,08	0,09	5,99	8,47	0,97	0,44
Pro35S:bZIP53 6d	1,15	0,22	28,55	3,99	0,67	0,27
<i>atbzip1 atbzip53 0d</i>	2,25	1,50	0,71	0,01	0,00	0,00
<i>atbzip1 atbzip53 1d</i>	0,88	0,28	1,17	0,45	0,00	0,00
<i>atbzip1 atbzip53 4d</i>	0,73	0,02	5,36	0,66	1,35	1,91
<i>atbzip1 atbzip53 6d</i>	0,76	0,03	7,35	0,26	0,00	0,00

[ng/mg Trockengewicht]	Isoleucin		Leucin		Lysin	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Wt 0d	0,86	0,12	0,83	0,22	0,99	0,54
Wt 1d	2,75	0,96	3,03	1,04	3,40	0,79
Wt 4d	9,45	1,65	6,30	0,33	5,68	0,67
Wt 6d	9,93	1,00	5,80	0,74	5,08	0,04
Pro35S:bZIP1 0d	0,31	0,43	0,16	0,23	1,04	0,27
Pro35S:bZIP1 1d	1,95	0,47	1,34	0,35	2,44	0,03
Pro35S:bZIP1 4d	3,71	0,73	1,83	0,46	2,32	0,26
Pro35S:bZIP1 6d	3,30	1,21	1,39	0,38	1,00	0,15
Pro35S:bZIP53 0d	0,77	0,48	0,64	0,39	1,26	0,21
Pro35S:bZIP53 1d	1,09	0,02	0,73	0,09	1,73	0,16
Pro35S:bZIP53 4d	3,77	0,21	1,89	0,07	5,44	0,06
Pro35S:bZIP53 6d	4,36	0,64	2,25	0,53	6,54	0,52
<i>atbzip1 atbzip53 0d</i>	0,30	0,43	0,40	0,57	0,75	0,10
<i>atbzip1 atbzip53 1d</i>	1,55	0,19	2,21	0,08	1,94	0,83
<i>atbzip1 atbzip53 4d</i>	6,77	0,48	5,26	0,21	5,69	0,19
<i>atbzip1 atbzip53 6d</i>	7,96	0,24	5,23	0,05	5,07	0,23

[ng/mg Trockengewicht]	Met/Cysta		Ornithin		Phenylalanin	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Wt 0d	0,58	0,08	0,78	0,32	0,70	0,03
Wt 1d	0,10	0,15	1,25	0,33	2,15	0,11
Wt 4d	0,07	0,11	1,33	0,12	22,89	0,12
Wt 6d	0,95	0,22	1,99	0,52	37,23	4,22
Pro35S:bZIP1 0d	0,00	0,00	0,67	0,28	0,88	0,42
Pro35S:bZIP1 1d	0,00	0,00	0,80	0,24	2,52	0,42
Pro35S:bZIP1 4d	0,00	0,00	0,57	0,81	27,34	0,71
Pro35S:bZIP1 6d	0,36	0,23	0,00	0,00	43,99	15,15
Pro35S:bZIP53 0d	0,00	0,00	2,06	0,53	1,82	0,97
Pro35S:bZIP53 1d	0,00	0,00	1,64	0,84	1,80	0,20
Pro35S:bZIP53 4d	0,73	0,08	3,03	0,34	43,05	3,47
Pro35S:bZIP53 6d	0,76	0,06	3,97	1,05	60,56	0,98
<i>atbzip1 atbzip53 0d</i>	0,00	0,00	0,60	0,09	0,39	0,55
<i>atbzip1 atbzip53 1d</i>	0,00	0,00	0,28	0,40	1,41	0,33
<i>atbzip1 atbzip53 4d</i>	0,00	0,00	1,66	0,06	11,93	2,01
<i>atbzip1 atbzip53 6d</i>	0,27	0,38	1,33	0,14	18,57	0,32

[ng/mg Trockengewicht]	Prolin		Threonin		Tryptophan	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Wt 0d	2,68	0,06	8,61	0,52	0,00	0,00
Wt 1d	1,63	0,19	10,79	4,30	0,00	0,00
Wt 4d	1,88	0,01	9,75	1,36	3,80	0,89
Wt 6d	1,27	0,23	10,99	2,89	6,30	0,28
Pro35S:bZIP1 0d	1,53	0,55	4,76	1,58	0,00	0,00
Pro35S:bZIP1 1d	1,14	0,01	7,58	0,99	0,00	0,00
Pro35S:bZIP1 4d	1,12	0,18	4,55	1,10	6,89	0,28
Pro35S:bZIP1 6d	1,19	0,34	3,65	1,28	7,95	4,72
Pro35S:bZIP53 0d	0,42	0,05	12,58	2,14	0,00	0,00
Pro35S:bZIP53 1d	0,59	0,05	6,98	1,18	0,00	0,00
Pro35S:bZIP53 4d	0,56	0,27	15,05	1,98	5,15	0,49
Pro35S:bZIP53 6d	0,91	0,08	11,32	4,04	8,56	0,07
<i>atbzip1 atbzip53 0d</i>	1,87		4,35	1,16	0,00	0,00
<i>atbzip1 atbzip53 1d</i>	1,81	0,07	3,28	1,76	0,00	0,00
<i>atbzip1 atbzip53 4d</i>	1,76	0,51	3,43	0,50	3,17	0,30
<i>atbzip1 atbzip53 6d</i>	1,30	0,14	7,35	0,26	3,60	0,79

[ng/mg Trockengewicht]	Tyrosin		Serin		Valin	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Wt 0d	0,35	0,50	17,50	3,12	1,99	0,20
Wt 1d	1,71	0,55	16,62	6,61	5,28	1,73
Wt 4d	3,41	0,91	22,95	1,58	21,67	2,15
Wt 6d	4,13	0,31	42,52	18,54	27,26	2,98
Pro35S:bZIP1 0d	0,19	0,27	12,05	5,06	1,57	0,36
Pro35S:bZIP1 1d	1,70	0,06	14,23	2,14	4,01	0,28
Pro35S:bZIP1 4d	1,97	0,44	23,94	4,65	15,15	1,17
Pro35S:bZIP1 6d	1,30	0,42	26,64	12,29	18,79	10,82
Pro35S:bZIP53 0d	0,81	0,24	21,47	3,42	1,86	0,80
Pro35S:bZIP53 1d	0,87	0,01	9,40	0,40	2,18	0,13
Pro35S:bZIP53 4d	1,49	0,16	33,25	3,40	11,37	0,85
Pro35S:bZIP53 6d	2,10	0,01	30,43	0,78	12,46	2,19
<i>atbzip1 atbzip53 0d</i>	0,30	0,43	15,09	4,13	1,17	0,04
<i>atbzip1 atbzip53 1d</i>	1,23	0,16	5,79	2,48	2,77	0,04
<i>atbzip1 atbzip53 4d</i>	2,91	0,05	7,94	0,06	14,04	1,38
<i>atbzip1 atbzip53 6d</i>	2,74	0,04	20,65	0,97	18,19	0,30

	Ammonium		Gesamte AS	
	Mean	SD	Mean	SD
[ng/mg Trockengewicht]				
Wt 0d	7,20	1,22	168,30	41,45
Wt 1d	12,15	1,07	247,78	51,42
Wt 4d	49,25	11,41	448,20	16,81
Wt 6d	122,47	29,12	776,10	235,34
Pro35S:bZIP1 0d	7,05	0,38	113,14	17,21
Pro35S:bZIP1 1d	18,25	9,87	193,37	8,38
Pro35S:bZIP1 4d	98,83	3,09	469,78	32,05
Pro35S:bZIP1 6d	158,86	61,61	559,47	181,09
Pro35S:bZIP53 0d	9,01	4,73	340,85	29,23
Pro35S:bZIP53 1d	12,33	5,32	258,24	48,25
Pro35S:bZIP53 4d	53,56	23,55	955,92	39,69
Pro35S:bZIP53 6d	70,63	4,10	1124,67	40,75
<i>atbzip1 atbzip53 0d</i>	8,33	5,21	136,81	16,18
<i>atbzip1 atbzip53 1d</i>	5,77	3,22	102,63	26,27
<i>atbzip1 atbzip53 4d</i>	27,83	1,60	210,83	10,66
<i>atbzip1 atbzip53 6d</i>	37,59	5,06	371,50	11,13

9 Abkürzungsverzeichnis

9.1 Allgemeine Abkürzungen

ABA	Abscisinsäure
ABI3	ABA insensitive 3
ADP	Adenosindiphosphat
AMPK	AMP-activated proteine kinases
<i>A.t.</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AtbZIP	<i>Arabidopsis thaliana</i> basischer Leucinzipper
AtbZIP-TF	<i>Arabidopsis thaliana</i> basischer Leucinzipper Transkriptionsfaktor
Amp	Ampicillin (resistent)
ANS	Asparaginase
ASN1	Asparagine Synthetase
ASP3	Aspartat Aminotransferase 3
ATP	Adenosintriphosphat
BAM	β-Amylase
BCAT	Branched chain amino acid transaminase
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
bZIP	basischer Leucinzipper
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAB	Chlorophyll A/B Binding Protein
CCA1	Circadien Clock Associated 1
cDNA	komplementäre DNA
ChIP	Chromatin Immunopräzipitation
CO ₂	Kohlendioxid
d.h.	das heißt
ddNTPs	Didesoxyribonucleotide
dNTP	Desoxyribonukleotide
DIN	dark induced
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Enhanced Chemilumineszenz
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere (et alii)
EtBr	Ethidiumbromid
etc.	und so weiter (et cetera)
EtOH	Ethanol
GDH2	Glutamat Dehydrogenase 2
GLNS	Glutamin Synthase
GUS	β-Glucuronidase
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure

HXK	Hexokinase
JA	Jasmonsäure
kb	kilo Basen(paare)
kDa	Kilodalton
KIN10	SnRK1-Kinase10
KIN11	SnRK1-Kinase11
LB	Luria-Bertani Broth
LEA	late embryogenesis abundant
LOX	Lipoxygenase
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Min.	Minuten
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NAN	Derivat des nanH-Gens, welches eine Sialidase codiert
OD	optische Dichte
OEX	Überexpression
o.g.	oben genannten
OMG	Orthomethylglukose
ORF	offener Leserahmen (Open Reading Frame)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PIPES	1,4-Piperazin-bis-(ethansulfonsäure)
Pro35S	35S-Promotor aus Cauliflower Mosaic Virus
ProDH	Prolin Dehydrogenase
PVDF	Polyvinylendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
SA	Salizylsäure
SAG	senescence associated gene
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodiumdodecylsulfate)
SNF1	Sucrose non-fermenting1
SnRK	Snf1 related kinases
SSC	Standard Saline Citrat Puffer
T6P	Trehalose-6-Phosphat
Taq	Thermus aquaticus (DNA-Polymerase aus T. aquaticus)
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris buffered saline
T-DNA	Transfer-DNA
TE	Tris-EDTA-Puffer
TF	Transkriptionsfaktor
Tm	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

u. a.	unter anderem
ü. N.	über Nacht
uORF	upstream open reading frame (offenes Leseraster im 5'-UTR)
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolettes Licht
v/v	Volumenprozent (volume per volume)
Vol.	Volumen
w/v	Gewichtsprozent (weight per volume)
Wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
YLS3	Yellow Leaf Specific 3
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
λ	Bakteriophage Lambda

9.2 Einheiten

Ω	Ohm
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
A	Ampère
D	Dalton
E	Einstein (1E = 1 Mol Photonen)
F	Farad
g	Gramm, Erdbeschleunigung
h	Stunde
l	Liter
M	Molar
min	Minute
ppb	parts per billion
s, sek	Sekunde
U	definierte Einheit der Enzymaktivität (unit)
V	Volt
W	Watt

9.3 Präfixe

k	kilo	(10^3)
m	milli	(10^{-3})
μ	mikro	(10^{-6})
n	nano	(10^{-9})
p	pico	(10^{-12})

9.4 Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein

D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

9.5 Nukleotide

A	Adenosin
C	Cytosin
G	Guanosin
T	Thymin
U	Uracil

Danksagung:

Wolfgang Dröge-Laser möchte ich an dieser Stelle dafür danken, dass ich diese Arbeit bei ihm schreiben durfte, und natürlich auch für die vielen hilfreichen Tipps und Tricks während der letzten vier Jahre. Frau Professor Gatz danke ich für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und für die Übernahme des Korreferats.

Unserem Kooperationspartner Klaus Harter (Universität Tübingen) danke ich für die Möglichkeit die Aminosäuregehalte messen zu können. Ein ganz besonderer Dank geht dabei an Bettina Stadelhofer, die für diese Messungen viel Zeit investiert hat und mir alles so ausführlich erklärte.

Bei Christina Chaban (Universität Tübingen) möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mir die AtbZIP63 Alanin Mutante zur Verfügung gestellt hat.

Wolfram Weckwerth (Universität Wien) und seiner Abteilung danke ich dafür, dass sie mir die Möglichkeit gegeben haben, am Metabolomics-Praktikum in Wien teilzunehmen, und mich daran anschließend eine Woche bei sich in der Abteilung für die Messung meiner Proben aufgenommen haben. Ein Besonderer Dank geht hier an Lena, die einige Abende im Labor verbringen musste, damit meine Proben noch übers Wochenende gemessen werden konnten.

Johannes Hanson (Universität Utrecht) möchte ich für die Einführung in die Array Auswertung und die ersten Einblicke in den Umgang mit R danken, die er uns im Rahmen eines Workshops in Utrecht gewährt hat.

Auch unseren Kooperationspartnern Sjef Smeekens, Markus Teige und Jesus Vicente-Carbajosa aus der bZIP-Gruppe danke ich für einen regen Informationsaustausch und schöne Aufenthalte in Madrid, Utrecht und Wien während unserer halbjährigen Treffen.

Ellen Hornung und Ivo Feussner (Universität Göttingen, Biochemie der Pflanze) möchte ich für die Zusammenarbeit bezüglich der *lox1* Mutante und der LOX1-Überexprimierer danken.

Ein ganz großer Dank geht auch an meine beiden Diplomandinnen Johanna und Laura. Die Zusammenarbeit mit euch hat mir viel Spaß gemacht.

Meinen Laborkollegen Christoph, Tim, Andrea, Caro, Nora und Jenny möchte ich für eine sehr schöne Zeit danken. Ihr habt mir bei all den kleinen und großen Problemen des Laboralltags geholfen, und ihn durch eine lockere Atmosphäre und viele gemeinsame Kaffeepausen, Grillabende etc. aufgeheitert. Von den Ehemaligen danke ich vor allem Fridtjof dafür, dass ich sein erfolgversprechendes Thema weiterführen durfte. Auch bei den Mitgliedern der AG Gatz möchte ich mich für die nette Zusammenarbeit bedanken.

Nicht zuletzt danke ich meiner Mutter und meiner Schwester für ihre Unterstützung und für die Planung des Urlaubs, auf den ich mich schon während der Schreibphase freuen konnte. Der größte Dank geht aber an meinen Freund Stefan, der mich die letzten Wochen bei sich aufgenommen hat, immer für mich da war und einfach zwischendurch auch mal auf andere Gedanken brachte. Ohne ihn hätte ich diese Arbeit sicher nicht so ruhig beenden können.

Lebenslauf:

Persönliche Daten:

Name: Katrin Dietrich
Geburtsdatum: 07.10.1980
Geburtsort: Wilhelmshaven
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1987-1988 Grundschole Worpswede
1988-1991 Paul-Sillus-Grundschole Jever
1991-1993 Orientierungsstufe Jever
1993-2000 Mariengymnasium Jever
Abschluss: Abitur, Note 2,1

Studium:

Oktober 2000 Beginn des Biologiestudiums an der Georg-August Universität Göttingen

Juli 2002 Vordiplom in den Fächern Botanik, Mikrobiologie, Chemie und Physik mit der Gesamtnote ‚Sehr gut‘

April 2005 Diplomprüfung in den Fächern Botanik, Biochemie und Mikrobiologie mit der Gesamtnote ‚Sehr gut‘

bis April 2006 Anfertigung der Diplomarbeit am Lehrstuhl für „Allgemeine und Entwicklungsphysiologie der Pflanze“ bei PD Dr. W. Dröge-Laser mit dem Thema: „Die Funktion der Transkriptionsfaktoren AtbZIP1 und AtbZIP53 aus *Arabidopsis thaliana* unter biotischen und abiotischen Stressbedingungen“; Note ‚Sehr gut‘

2006-2010 Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl für „Allgemeine und Entwicklungsphysiologie der Pflanze“ des Albrecht-von-Haller Instituts für Pflanzenwissenschaften der Georg-August-Universität zu Göttingen bei PD Dr. W. Dröge-Laser.

Bisherige Publikationen:

Weltmeier F., Ehlert A., Mayer C.S., Dietrich K., Wang X., Schütze K., Alonso R., Harter K., Vicente-Carbajosa J. and Dröge-Laser W. (2006): Combinatorial control of proline dehydrogenase transcription by specific heterodimerisation of bZIP transcription factors. *The EMBO Journal*, 13, 3133-43.

Alonso R., Oñate-Sánchez L., Weltmeier F., Ehlert A., Diaz I., Dietrich K., Vicente-Carbajosa J. and Dröge-Laser W. (2009): A pivotal role of the basic leucine zipper transcription factor AtbZIP53 in the regulation of seed maturation gene expression based on heterodimerisation and protein complex formation. *The Plant Cell*, 6, 1747-61.

Weltmeier F., Rahmani F., Ehlert A., Dietrich K., Schütze K., Wang X., Chaban C., Hanson J., Teige M., Harter K., Vicente-Carbajosa J., Smeekens S. and Dröge-Laser W. (2009): Expression patterns within the *Arabidopsis* C/S1 bZIP transcription factor network: availability of heterodimerization partners controls gene expression during stress response and development. *Plant Molecular Biology*, 69, 107-119.

Dietrich K., Weltmeier F., Ehlert A., Weiste C., Stahl M., Harter K. and Dröge-Laser W. Heterodimers of the *Arabidopsis* Transcription Factors bZIP1 and bZIP53 Reprogram Amino Acid Metabolism during Low Energy Stress. *Eingereicht bei The Plant Cell*.

