

**Charakterisierung der *Nicotiana tabacum*
bZIP-Transkriptionsfaktoren BZI-2, BZI-3 und BZI-4
als Heterodimerisierungspartner von BZI-1**

Dissertation

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

vorgelegt von
Anne Strathmann
aus Salzkotten

Göttingen, 2003

D 7

Referent: PD Dr. W. Dröge-Laser

Korreferent: PD Dr. G. Hinz

Tag der mündlichen Prüfung: 2. Juli 2003

In Wirklichkeit erkennen wir nichts;
denn die Wahrheit liegt in der Tiefe.
Demokrit

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	6
1.1 Transkriptionsfaktoren	6
1.2 Basische Leucin-Zipper Transkriptionsfaktoren	7
1.3 Der bZIP-Transkriptionsfaktor BZI-1	9
1.3.1 BZI-1 ist an der Auxinantwort der Pflanze beteiligt	10
1.3.2 BZI-1 ist an der Blütenentwicklung und der Regulation einer antherenspezifischen Invertase beteiligt	13
1.3.3 BZI-1 ist in Signalwege der pflanzlichen Pathogenantwort eingebunden	14
1.3.4 BZI-1 heterodimerisiert mit anderen bZIP-Transkriptionsfaktoren	15
1.4 Zielsetzung der Arbeit	17
2 Material	19
2.1 Organismen	19
2.1.1 Bakterien	19
2.1.2 Hefe (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	19
2.1.3 Pflanzen	19
2.2 Nukleinsäuren	20
2.2.1 Plasmide	20
2.2.2 cDNA-Expressionsbank	22
2.2.3 Hybridisierungssonden	22
2.2.4 Oligonukleotide	22
2.3 Größenstandard	23
2.3.1 DNA-Größenstandard	23
2.3.2 Protein-Größenstandard	23
2.4 Antiseren	24
2.5 Nährmedien und Zusätze	24
2.5.1 Pflanzenmedien	24
2.5.2 Bakterienmedien	25
2.5.3 Hefemedien	25
2.5.4 Zusätze	25
2.6 Allgemeine Puffer und Lösungen	26
2.7 Geräte	26
2.8 Verbrauchsmittel	27
2.9 Chemikalien	28
2.10 Radiochemikalien	29
2.11 Kits	29
2.12 Enzyme	30
3 Methoden	31
3.1 Bakterien- und Hefekulturen	31
3.1.1 Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	31
3.1.2 Anzucht von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	31
3.1.3 Anzucht von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
3.2 Pflanzenkulturen	31

3.2.1 Kultivierung von Tabakpflanzen in Sterilkultur	31
3.2.2 Kultivierung von Tabakpflanzen in Erde	31
3.2.3 Anzucht und Kultivierung von Tabaksuspensionskulturen	31
3.3 Induktion von Tabak-Blattscheiben	32
3.4 Epinastie-Test	32
3.5 Molekulargenetische Methoden	32
3.5.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	32
3.5.2 Qiaprep	33
3.5.3 Phenol-Chloroform Extraktion	33
3.5.4 Ethanolfällung von DNA aus wässrigen Lösungen	33
3.5.5 Isolierung von DNA aus Tabak	33
3.5.6 Isolierung von RNA aus Tabak	33
3.5.7 <i>In vitro</i> Synthese von RNA	33
3.5.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	34
3.5.9 Auftrennung von DNA in Agarosegelen	34
3.5.10 Auftrennung von RNA in denaturierenden Agarosegelen	34
3.5.11 Restriktionsspaltung von DNA	35
3.5.12 Dephosphorylierung von DNA-Enden	35
3.5.13 Klenow-“fill-in”	35
3.5.14 Hybridisierung von Oligonukleotiden	35
3.5.15 Ligation von DNA-Fragmenten	35
3.5.16 Isolierung unbekannter cDNA-Abschnitte	36
3.5.17 Isolierung unbekannter genomischer DNA-Abschnitte	36
3.5.18 Radioaktive Markierung von DNA	36
3.5.18.1 End-Markierung durch die Polynucleotidkinase	36
3.5.18.2 Markierung durch die Klenow-Polymerase	36
3.5.19 Polymerase Kettenreaktion	37
3.5.20 Sequenzierung	37
3.5.21 Herstellung und Transformation kompetenter <i>Escherichia coli</i>	38
3.5.21.1 Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i>	38
3.5.21.2 Transformation von <i>Escherichia coli</i>	38
3.5.22 Herstellung und Transformation kompetenter Agrobakterien	38
3.5.22.1 Herstellung kompetenter Agrobakterien	38
3.5.22.2 Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	38
3.5.23 Arbeiten mit Hefe	39
3.5.23.1 Herstellung und Transformation kompetenter Hefezellen	39
3.5.23.2 Durchführung eines Hefe Screens	39
3.5.24 Blau-Weiß-Selektion	39
3.5.25 Northern Blot Analyse	39
3.5.25.1 Transfer der RNA auf Nylonmembran	40
3.5.25.2 Hybridisierung der Northern Blot Membran	40
3.5.25.3 Rehybridisierung	40
3.5.26 Transformation von <i>Nicotiana tabacum</i>	41
3.5.26.1 Stabile Transformation von <i>Nicotiana tabacum</i>	41
3.5.26.2 Transformation von BY-2 Tabakzellsuspensionsprotoplasten	41
3.5.27 Gelretardationsanalysen (GRA)	42
3.5.28 Chromatin-Immunoprecipitation	43
3.5.28.1 Chromatinpräparation	43
3.5.28.2 Immunoprecipitation	43
3.6 Proteinchemische Methoden	43

3.6.1 Herstellung denaturierender Gesamtzellextrakte aus Pflanzen	44
3.6.2 Herstellung denaturierender Gesamtzellextrakte aus Hefe (Printen und Spargue, 1994)	44
3.6.3 Isolierung von Proteinen aus Tabak-Kallussuspensionskulturen	44
3.6.4 Western Blot Analyse	44
3.6.4.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	44
3.6.4.2 Proteintransfer auf PVDF-Membranen	45
3.6.4.3 Immunodetektion mit dem ECL+ System	45
3.6.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten	45
3.6.6 Messung der β -Glukuronidase (GUS)-Aktivität	46
3.6.7 „Far Western“-Analyse	46
3.6.8 <i>In vitro</i> Protein Translation	46
3.6.9 oNPG-Test	47
3.7 Konstruktion der verwendeten Plasmide	47
3.7.1 Konstruktion des Plasmids pSK-BZI-3	47
3.7.2 Konstruktion des Plasmids pSK-BZI-4	48
3.7.3 Konstruktion des Plasmids pSK-BZI-2	48
3.7.4 Konstruktion des Vektors pBIN-BZI-2	48
3.7.5 Konstruktion des Plasmids pBIN-BZI-3	48
3.7.6 Konstruktion des Plasmids pBIN-BZI-4	48
3.7.7 Konstruktion des Plasmids pHBT-BZI-2	49
3.7.8 Konstruktion des Plasmids pHBT-BZI-3	49
3.7.9 Konstruktion des Plasmids pHBT-BZI-4	49
3.7.10 Konstruktion des Plasmids pGBT-BZI-2c	49
3.8 Längenbestimmungen	49
3.8.1 Längenbestimmung der Blütenorgane	49
3.8.2 Bestimmung des Internodienabstandes	50
3.8.3 Längenbestimmung des Sprosses einer Tabakpflanze	50
3.9 Mathematische Formeln	50
3.9.1 Formel zur Berechnung des Mittelwertes	50
3.9.2 Formel zur Berechnung der Standardabweichung	50
3.10 Verwendete Computerprogramme zur Sequenzanalyse	50
4 Ergebnisse	51
4.1 Isolierung und Charakterisierung von BZI-1 Interaktionspartnern unter Verwendung des Yeast Two Hybrid Systems	51
4.1.1 BZI-1 ist ein Transkriptionsaktivator in Hefe	52
4.1.2 BZI-1 interagiert mit BZI-2, BZI-3 und BZI-4 in Hefe	53
4.1.3 Die Interaktion von BZI-1 mit BZI-2, BZI-3 und BZI-4 kann <i>in vitro</i> bestätigt werden	55
4.1.4 Isolierung des <i>BZI-3</i> Volllängen Klons	56
4.1.5 Isolierung des <i>BZI-4</i> Volllängen Klons	59
4.1.6 Der <i>BZI-2</i> Klon	61
4.1.7 BZI-2 ist ein Aktivator der Genexpression in Hefe	63
4.2 Expressionsanalyse der Gene <i>BZI-2</i> , <i>BZI-3</i> und <i>BZI-4</i> in Tabakpflanzen	64
4.2.1 Organspezifische Expression von <i>BZI-2</i> , <i>BZI-3</i> und <i>BZI-4</i>	64
4.2.2 Stimuluspezifische Expression von <i>BZI-2</i> , <i>BZI-3</i> und <i>BZI-4</i>	66
4.2.2.1 Die Expression von <i>BZI-2</i> wird durch Licht reguliert	66
4.2.2.2 Die <i>BZI-2</i> Expression wird durch Zucker reguliert	69
4.2.2.3 Die <i>BZI-2</i> Expression geht nach Verwundung zurück	70

4.2.2.4 Die <i>BZI-3</i> Expression wird durch Kälte induziert	70
4.3 Herstellung und Charakterisierung von Pflanzen mit erhöhtem <i>BZI-2</i> , <i>BZI-3</i> und <i>BZI-4</i> Gehalt	72
4.3.1 Konstitutive Überexpression von <i>BZI-4</i> in transgenen Pflanzen	72
4.3.2 Konstitutive Überexpression von <i>BZI-3</i> in transgenen Pflanzen	76
4.3.3 Konstitutive Überexpression von <i>BZI-2</i> in transgenen Pflanzen	76
4.3.4 Induzierbare Expression von <i>BZI-2</i> , <i>BZI-3</i> und <i>BZI-4</i> in transgenen Pflanzen	78
4.4 Analyse der Regulation potentieller Zielgene durch die <i>BZI</i> -Proteine	81
4.4.1 Untersuchung der Beteiligung der <i>BZI</i> -Proteine an der Genregulation im Rahmen der Auxinantwort	81
4.4.1.1 <i>BZI-3</i> -Oex Pflanzen zeigen eine verringerte Auxinantwort	81
4.4.1.2 Die <i>BZI</i> -Proteine binden an das E1-Element im Tabak <i>GH3</i> Promotor <i>in vitro</i>	84
4.4.1.3 <i>GH3</i> ist ein Zielgen von <i>BZI-1</i> <i>in vivo</i>	87
4.4.1.4 Analyse der Aktivierungseigenschaften von <i>BZI-1</i> in Protoplasten	90
4.4.1.5 Analyse der Aktivierungseigenschaften von <i>BZI-2</i> in Protoplasten	91
4.4.1.6 Analyse der Aktivierungseigenschaften von <i>BZI-3</i> in Protoplasten	92
4.4.1.7 Analyse der Aktivierungseigenschaften von <i>BZI-4</i> in Protoplasten	93
4.4.1.8 Überexpression von <i>BZI-2</i> , <i>BZI-3</i> und <i>BZI-4</i> hat keinen Effekt auf die <i>GH3</i> Transkription nach Auxingabe	94
4.4.2 Untersuchung der Beteiligung der <i>BZI</i> -Proteine an der Genregulation im Rahmen der Blütenentwicklung	95
4.4.2.1 Ektopische Überexpression von <i>BZI-3</i> und <i>BZI-4</i> führt zu einer Verkleinerung der Blütenorgane	95
4.4.2.2 <i>BZI-1-ΔN</i> und <i>BZI-4</i> -Oex Pflanzen zeigen eine veränderte Blütenstandsmorphologie	97
4.4.2.3 Die <i>NIN88</i> Expression wird in <i>BZI-4</i> -Oex Pflanzen reprimiert	97
4.4.2.4 <i>BZI-4</i> bindet an eine G-Box im <i>NIN88</i> Promotor	99
4.4.3 Isolierung eines Promotorfragmentes von <i>BZI-4</i>	101
5 Diskussion	104
5.1 <i>BZI-2</i> , <i>BZI-3</i> und <i>BZI-4</i> lassen sich der Gruppe S der bZIP-Transkriptionsfaktoren zuordnen	104
5.2 Die für die <i>BZI</i> -Transkriptionsfaktoren codierenden Gene weisen spezifische Expressionsmuster auf	109
5.3 Der Gruppe C bZIP-Transkriptionsfaktor <i>BZI-1</i> heterodimerisiert spezifisch mit den <i>BZI</i> -Transkriptionsfaktoren der Gruppe S	112
5.4 Die spezifische Bindung der Homo- und Heterodimere an bestimmte <i>cis</i> -Elemente in den Promotoren der Zielgene kann die Zielgenspezifität bewirken	116
5.5 Die Genexpression der Zielgene hängt von den Aktivierungseigenschaften der <i>BZI</i> -Transkriptionsfaktoren ab	118
5.6 Die <i>BZI</i> -Transkriptionsfaktoren spielen eine Rolle im Rahmen der Auxinantwort der Pflanze	121
5.7 <i>BZI-1</i> und <i>BZI-4</i> sind an der Regulation der <i>NIN88</i> Expression beteiligt	124
5.8 <i>BZI-1</i> , <i>BZI-3</i> und <i>BZI-4</i> sind an der Regulation der Blütenentwicklung beteiligt	125
5.9 Die Genexpression von Zielgenen kann auf verschiedenen Ebenen durch die <i>BZI</i> -Transkriptionsfaktoren reguliert werden	126

6. Zusammenfassung	128
7. Literatur	130
8. Anhang	144
8.1 Vektorkarten der im Rahmen dieser Arbeit erstellten Plasmide	144
8.2 Darstellung der berechneten coiled-coiled Wahrscheinlichkeiten für die Leucinzipper-Bereiche	145
8.3 Sequenz des <i>NIN88</i> Promotors	146
8.4 Abkürzungen	147
8.5 Präfixe	149
8.6 Einheiten	149
8.7 Nukleotide	150
8.8 Aminosäuren	150

1 Einleitung

1.1 Transkriptionsfaktoren

Pflanzen wachsen fest an ihren Standort gebunden. Anders als Tiere können sie sich daher einer veränderten Umwelt nicht durch Flucht entziehen. Umso stärker sind sie den externen Faktoren, die aus der Umwelt auf sie einwirken, ausgesetzt. Das sind sowohl abiotische Einflüsse, wie Licht, Bodenqualität, mechanische Reizung, Gravitation, Temperatur und Feuchtigkeit als auch biotische Einflüsse wie Fraßfeinde, Pathogenbefall und Konkurrenz. Des Weiteren wirken auch interne Stimuli auf die Pflanze ein, wie Metabolitgehalt, Wachstumsregulatoren und Hormone. In Abhängigkeit von dem Entwicklungsstadium, der inneren Uhr und den Informationen, die sie aus ihrer Umwelt erhält, muss die Pflanze ihre Physiologie und ihre Morphologie an die wechselnden äußeren und inneren Bedingungen anpassen, um überlebensfähig zu bleiben (zur Übersicht siehe Casal, 2002). Die Perzeption, Integration und Verarbeitung der verschiedenen Informationen sind für die Koordination der Entwicklung und die Umweltabhängigen Reaktionen der Pflanze wichtig. Auf zellulärer Ebene werden diese Signale in Signaltransduktionswegen integriert und verarbeitet. Von diesen Signaltransduktionswegen wird auch die Aktivität von Transkriptionsfaktoren reguliert, diese steuern die Genexpression ihrer Zielgene. Transkriptionsfaktoren binden an spezifische *cis*-Elemente der DNA in den Promotorbereichen der Zielgene und können dort die Genexpression entweder aktivieren oder hemmen (Johnson und McKnight, 1989; Triezenberg, 1995; Hanna-Rose und Hansen 1996; Herschbach und Johnson, 1993). Transkriptionsfaktoren sind modular aufgebaut (Frankel und Kim, 1991; Siberil *et al.*, 2001). Sie sind durch bestimmte Domänen gekennzeichnet, die für die Funktion der Transkriptionsfaktoren wichtig sind. Neben einer DNA-Bindedomäne kann man Domänen unterscheiden, die die Transkriptionsaktivierung oder Repression, und die Interaktion mit anderen Proteinen vermitteln (Keegan *et al.*, 1986; Frankel und Kim, 1991). Transkriptionsfaktoren werden anhand ihrer konservierten DNA-Bindedomänen in verschiedene Familien eingeteilt. Wichtige ubiquitäre Transkriptionsfaktor-Familien sind Helix-turn-helix Proteine, Zink-Finger Proteine, Helix-loop-Helix Proteine und basische Leucizipper Proteine

(zur Übersicht über Transkriptionsfaktoren siehe Riechmann *et al.*, 2000; Riechmann und Ratcliff, 2000).

1.2 Basische Leucinzipper Transkriptionsfaktoren

Basische Leucinzipper (bZIP) Transkriptionsfaktoren sind ubiquitär in allen Organismen verbreitet. Gemeinsames Merkmal der bZIP Proteine ist eine basische DNA-Bindedomäne und ein sogenannter Leucinzipper (Landschulz *et al.*, 1988; Vinson *et al.*, 1989; Ellenberger, 1994). Der Leucinzipper ist eine Proteindomäne, in der sich im Abstand von sieben Aminosäuren (eine Heptade) ein Leucin oder eine andere hydrophobe Aminosäure, wie Valin, Isoleucin, Methionin oder Phenylalanin, wiederholt. Die sieben Aminosäuren einer heptaden Wiederholung bilden zwei α -helicale Umdrehungen der Helix (Abb. 1.1B). Die Aminosäurepositionen werden in der Nomenklatur nach Mc Lachlan und Steward (1975) a, b, c, d, e, f und g genannt. Die Position d in dieser Nomenklatur entspricht dem Leucin. Der Leucinzipperbereich bildet eine amphipatische α -Helix aus, und kann mit der α -Helix eines zweiten Proteins eine coiled-coil Konformation bilden (Baxevanis und Vinsen, 1993; Lupas, 1996), und so eine Proteindimerisierung (Homo- oder Heterodimere) ermöglichen (Landschulz *et al.*, 1988; O'Shea *et al.*, 1989, Vinson *et al.*, 2002). Für das Protein GCN4 konnte gezeigt werden, dass sich zwei Monomere aneinander lagern, indem die Aminosäuren an Position d, dem Leucin und Position a, über elektrostatische Wechselwirkungen ein internes hydrophobes Zentrum bilden (Abb. 2.1C). Die amphipatischen Eigenschaften der α -Helix erlauben polaren oder geladenen Aminosäuren an Position e und g eines bZIP-Proteins, mit den Aminosäuren an den korrespondierenden Positionen eines anderen bZIP-Proteins über Wasserstoffbrückenbindungen oder hydrophile Wechselwirkungen zu interagieren. Eine Dimerisierung wird verhindert, wenn sich die Aminosäuren an Position e und g abstoßen oder aus sterischen Gründen keine Interaktion möglich ist. Auf diese Art und Weise kann eine Spezifität der Dimerisierung erreicht werden (zur Übersicht siehe Siberil *et al.*, 2001, Vinson *et al.*, 2002). Die Interaktion zweier bZIP-Moleküle führt zu einer Konformationsänderung des Dimers, so dass die basische Domäne im Bereich der großen Furche Kontakt zur DNA erhält (Vinson *et al.*, 1993), wie in Abbildung 1.1 A dargestellt. Die basische Domäne vermittelt neben der DNA Bindung auch die Kernlokalisierung, da sie eine

bipartive Kernlokalisierungssequenz (Nuclear Localisation Sequences, NLS) umfasst (van der Krol und Chua, 1991; Varagona und Raikhel, 1994).

BZIP-Proteine binden im allgemeinen an *cis*-Elemente mit einem ACGT-Kernmotiv. Für die spezifische DNA-Bindung sind aber auch die dieses Motiv flankierenden Sequenzen von großer Bedeutung (Zur Übersicht siehe Izawa *et al.*, 1993 und Foster *et al.*, 1994). Pflanzliche bZIP-Proteine binden an palindromische Sequenzen wie die C-Box (GACGTC), die G-Box (CACGTG) und die A-Box (TACGTA), hier kann jedes Monomer eine Halbseite besetzen. Aber auch *cis*-Elemente, die nicht palindromisch aufgebaut sind, werden von bZIP-Proteinen besetzt, wie die hybride G/C-Box (GACGTG). Auch *cis*-Elemente, die vom ACGT-Kern-Element abweichen können von bZIP-Proteinen gebunden werden (de Pater *et al.*, 1994).

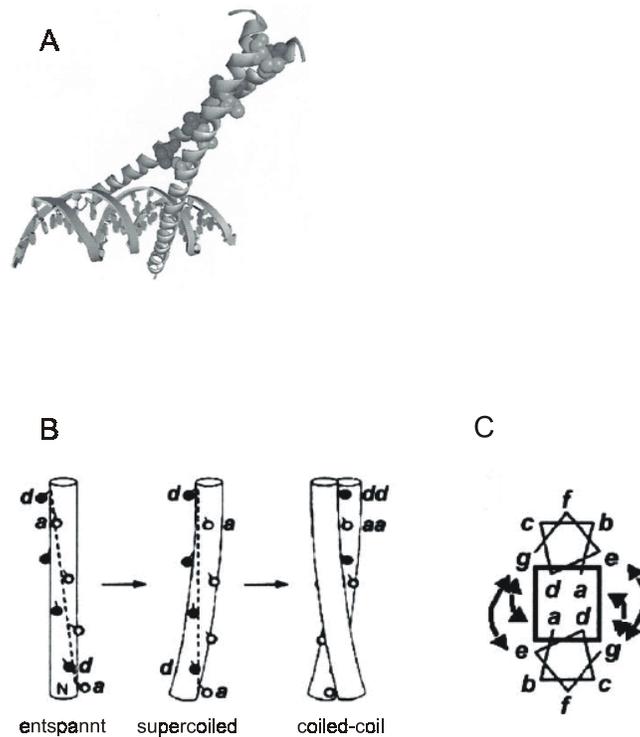


Abb. 1.1: Darstellung der Strukturen von bZIP-Proteinen. **A:** Dreidimensionales Modell eines Dimers des bZIP-Transkriptionsfaktors GCN4 aus Hefe bei Bindung an DNA (aus: Siberil *et al.*, 2001). **B:** Der Effekt der periodischen Wiederholung von Leucin auf die Ausbildung von coiled-coil Strukturen der α -Helices. **C:** Anordnung der Aminosäuren zweier Leuzinzipper-Monomere in einem Helix-Umlauf. Elektrostatische Wechselwirkungen der Aminosäuren an Position a und d (dem Leucin) bilden ein internes hydrophobes Zentrum, das durch das Rechteck schematisch dargestellt wird. Die Dimerisierung wird auch von den Wechselwirkungen der Aminosäuren an Position e und g beeinflusst (nach Lupas, 1996).

In der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand), deren Genom vollständig sequenziert ist, konnten 75 Mitglieder der bZIP-Transkriptionsfaktorfamilie beschrieben werden (Jakoby *et al.*, 2002). Die 75 in *Arabidopsis thaliana* identifizierten bZIP-Proteine werden aufgrund von Homologien im bZIP Bereich und in weiteren Domänen in zehn Gruppen eingeteilt (Jakoby *et al.*, 2002). Diese Proteine sind an der Regulation von verschiedenen biologischen Prozessen, wie Pathogenabwehr, Licht- und Stressantwort, Samenreifung und Blütenentwicklung beteiligt.

1.3 Der bZIP-Transkriptionsfaktor BZI-1

Das BZI-1 Protein aus Tabak weist die typischen Merkmale eines bZIP-Transkriptionsfaktors auf. Neben einer basischen DNA-Bindedomäne kann man einen Leucinzipper-Bereich über 8 heptamere Wiederholungen unterscheiden. Das Protein ist, wie BZI-1-GFP Fusionsproteine gezeigt haben, bevorzugt im Kern lokalisiert, bindet an DNA (Heinekamp *et al.*, 2002) und kann die Expression von Reportergenen in transienten Assays aktivieren (Heinekamp, 2002).

BZI-1 läßt sich in Anlehnung an die Einteilung der bZIP-Proteine aus *Arabidopsis thaliana* (Jakoby *et al.*, 2002) der Gruppe C zuordnen. Diese zeichnet sich durch eine sehr lange Leucinzipperdomäne über bis zu 9 Wiederholungen aus. BZI-1 zeigt die stärksten Homologien zu *A.t.* BZIP63 (Jakoby *et al.*, 2002). Auch in einer Reihe weiterer Pflanzenspezies findet man BZI-1 homologe Proteine, wie CPRF-2 aus Petersilie (Weisshaar *et al.*, 1991), OHP1 und OHP2 aus Mais (Pysh *et al.*, 1993), BLZ2 aus Gerste (Onate *et al.*, 1999) und REB aus Reis (Nakase *et al.*, 1997). Es handelt sich mit großer Wahrscheinlichkeit um orthologe Proteine, die Domänenstruktur ist konserviert. Neben der basischen Domäne und dem Leucinzipper können vier weitere Proteindomänen (DI bis DIV) unterschieden werden. Auf genomischer Ebene ist die Exon-Intron-Struktur konserviert (Heinekamp *et al.*, 2002). Auch das Expressionsmuster der Transkripte dieser Gene stimmt überein, sie werden ubiquitär exprimiert.

1.3.1 BZI-1 ist an der Auxinantwort der Pflanze beteiligt

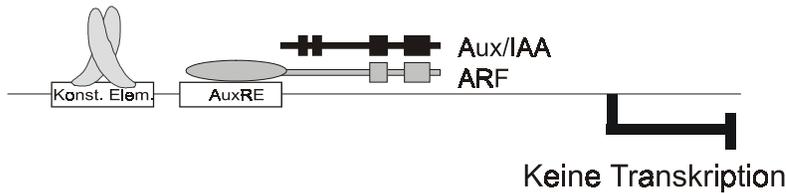
Zur funktionellen Charakterisierung von BZI-1 in der Pflanze wurden transgene Pflanzen hergestellt (Heinekamp *et al.*, 2002). Dazu werden die Genkonstrukte unter der Kontrolle des 35S-Promotors exprimiert. Eine Überexpression des gesamten BZI-1 Proteins führt zu keiner phänotypischen Veränderung. Pflanzen, die ein trunkiertes BZI-1 Derivat ohne den Aminoterminus exprimieren (BZI-1- Δ N), zeigen einen pleiotropen Phänotyp mit verringerter Apikaldominanz, verkürzten Internodien und gewellten, dunkelgrünen Blättern. Bei BZI-1- Δ N handelt es sich um ein dominant-negativ wirkendes Konstrukt. Diesem Protein fehlt die aminoterminale Aktivierungsdomäne (Heinekamp, 2002). Die Expression dieses Konstruktes wirkt sich massiv auf die Genexpression aus: das Protein kann weiterhin die DNA binden und die Bindestellen besetzen (Kuhlmann *et al.*, 2003), aber die Transkription nicht aktivieren (Heinekamp, 2002 und diese Arbeit). Diese reprimierende Wirkung auf die Transkription wirkt sich mit großer Wahrscheinlichkeit auch auf die Transkriptionsaktivierung der Zielgene durch BZI-1/BZI-1- Δ N Dimere und Heterodimere von BZI-1- Δ N mit anderen bZIP-Proteinen aus.

Der pleiotrope Phänotyp der BZI-1- Δ N-Pflanzen deutet auf eine Veränderung in der Hormonantwort hin. Regenerationsversuche von Blattscheiben auf Medium mit unterschiedlichen Auxin/Cytokiningehalten ergaben, dass die Auxinantwort verändert ist (Heinekamp, 2002): die BZI-1- Δ N Blattscheiben zeigen bei Gabe hoher Auxinkonzentrationen kein Wurzelwachstum. Auch die Kallusinduktion ist stark vermindert. Die Cytokininvermittelte Sprossbildung ist jedoch nicht betroffen. Die Auxingehalte in den Pflanzen sind unverändert. BZI-1 reguliert also nicht den Auxingehalt, sondern die Auxinantwort.

Auxin (Indol-3-Essigsäure) spielt bei einer Reihe pflanzlicher Entwicklungsprozesse eine wichtige Rolle. Dabei kann man Wirkungen auf die ganze Pflanze, wie Apikaldominanz, Tropismus, Wurzelbildung, Seneszenz und Wirkungen auf zellulärer Ebene, wie Zellstreckung, Teilung und Differenzierung unterscheiden. Die Vielzahl der Auxinwirkungen beruht auf einer komplexen Signalverarbeitung, die auf Umwelteinflüssen wie Licht (Beispiel Phototropismus), dem Entwicklungsstadium der Pflanze und dem Zusammenspiel mit anderen Signalmolekülen beruht (zur Übersicht siehe Swarup *et al.*, 2001, Vogler und Kuhlemeier, 2003). Es wurden zahlreiche Gene, wie die Aux/IAA, GH3 und SAUR Genfamilien isoliert, die in ihrer Transkription von Auxin reguliert werden. An der Regulation der Auxin induzierten Gene sind

zwei Proteinfamilien beteiligt, die Auxin Response Factors (ARF) und die Aux/IAA Proteine. In der Abbildung 1.2 ist die Auxin induzierte Genexpression schematisch dargestellt.

Ohne Auxininduktion:



Nach Auxininduktion:

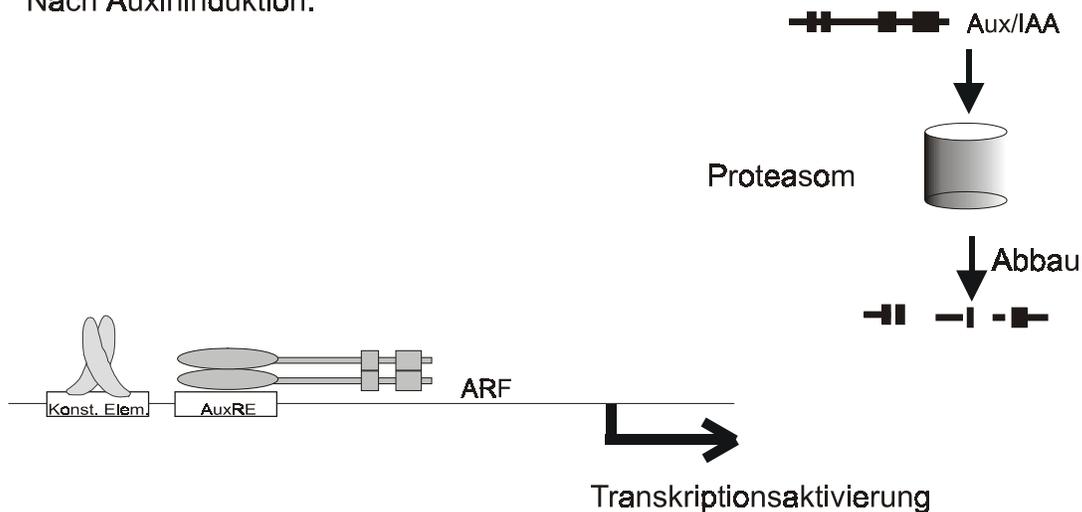


Abb. 1.2: Modell der Auxin induzierten Genexpression (modifiziert nach Hagen und Guifoye, 2002). Zur Erläuterung siehe Text.

ARF-Proteine binden an „Auxin Responsive Elements“ (AuxRE, Consensussequenz: TGTCTC) in den Promotorbereichen der von Auxin regulierten Genen. Neben einer DNA-Binderegion zeichnen sich ARF-Proteine durch die Domänen III und IV aus, die sowohl die Homodimerisierung mit anderen ARF-Proteinen als auch die Heterodimerisierung mit Aux/IAA Proteinen ermöglichen. In *Arabidopsis thaliana* konnten 23 ARF-Proteine beschrieben werden (Zur Übersicht siehe Hagen und Guilfoyle, 2002), die zum Teil aktivierend auf die Transkription der regulierten Gene wirkten, zum anderen Teil aber auch die Transkription reprimieren (Ulmasov *et al.*, 1999; Liscum und Reed, 2002). Im *Arabidopsis thaliana* Genom konnten 29 Aux/IAA-

Proteine isoliert werden. Die Expression der Aux/IAA-Proteine wird durch Auxin induziert (Abel und Theologis 1995; Abel *et al.*, 1996). Aux/IAA-Proteine sind Repressoren der Auxin-induzierten Genexpression (Abel *et al.*, 1994; Ulmasov *et al.*, 1997; Tiwari *et al.*, 2001, Tiwari *et al.*, 2003). Sie tragen die gleichen Domänen III und IV wie die ARF-Proteine. Über diese Domänen wird die Heterodimerisierung zwischen ARF-Proteinen und Aux/IAA-Proteinen vermittelt. Diese Heterodimere reprimieren die Transkription der Auxin regulierten Gene, da die Heterodimere zwar an die DNA binden, aber nicht aktivierend wirken (Tiwari *et al.*, 2003). Aux/IAA-Proteine werden *in vivo* sehr schnell nach Auxingabe im Proteasom abgebaut (Tiwari *et al.*, 2001; Worley *et al.*, 2000; Gray *et al.*, 1999; Gray und Estelle, 2000; Gray *et al.*, 2001). Dann können ARF-Proteine als Homo- oder Heterodimere mit anderen ARF-Proteinen an die *cis*-Elemente binden und die Transkription der Zielgene entweder reprimieren oder aktivieren.

BZI-1- Δ N reprimiert die Transkription des auxininduzierbaren *GH3* Gens aus Tabak (Heinekamp, 2002). Der Promotor des *GH3* Gens aus der Sojabohne ist gut charakterisiert. Die Fragmente D1 und D4 beinhalten hybride *cis*-Elemente, die jeweils aus einem AuxRE und einem konstitutiven Element mit G-Box Ähnlichkeit bestehen (Ulmasov *et al.*, 1995). Die Auxininduzierbarkeit wird dabei wie oben beschrieben durch das Zusammenwirken von ARF und Aux/IAA Proteinen an den AuxRE erreicht. Die Expressionsstärke wird durch konstitutive Promotorelemente moduliert, die neben den AuxRE liegen. Die hier bindenden Transkriptionsfaktoren wurden bisher noch nicht identifiziert (Ulmasov *et al.*, 1995; Hagen und Guilfoyle, 2002). Das E1-Fragment ist ähnlich wie das D1- und D4-Fragment aufgebaut, sie enthält eine hybride G/C-Box und ein AuxRE. Das E1-Fragment kann eine Auxinresponsivität auf einen Minimalpromotor übertragen (Liu *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1997). Die bZIP-Transkriptionsfaktoren *G.m.* SGBF1 und *G.m.* SGBF2 binden *in vitro* an die G/C-Box im *G.m.* *GH3* Promotor. Der Promotor des Tabak-*GH3* Gens ist konserviert zum Soja-*GH3* Gen (Perrot-Rechenmann, persönliche Mitteilung). Es ist daher interessant zu untersuchen, ob BZI-1 an die konsitutiven Elemente im *GH3*-Promotor bindet und so direkt die Transkription von *GH3* reguliert.

1.3.2 BZI-1 ist an der Blütenentwicklung und der Regulation einer antherenspezifischen Invertase beteiligt

BZI-1 spielt eine wichtige Rolle bei der Blütenentwicklung (Heinekamp, 2002). Die Blüten der BZI-1- Δ N Pflanze sind in ihren Organgrößen reduziert. Die männliche Fertilität der BZI-1- Δ N-Pflanze ist beeinträchtigt, die Pollenentwicklung ist gestört. Diese Beobachtung korreliert mit der Tatsache, daß die Expression einer antherenspezifischen Invertase, der *NIN88* (Goetz *et al.*, 2001), herabgesetzt ist. Die *NIN88* ist ein Schlüsselenzym für die Ernährung des Pollens. Bei der Apoplastischen Phloementladung wird die Saccharose über einen Saccharosetransporter in den Apoplasten freigesetzt. Hier wird die Saccharose durch an die Zellwand gebundene Invertasen, die *NIN88* ist ein Beispiel für eine antherenspezifische Invertase dieses Typs, in die Monomere Glucose und Fructose hydrolysiert. Diese Einfachzucker können über Hexosetransporter in die Sink-Zelle aufgenommen werden. Reduktion der *NIN88* Expression durch einen Antisenseansatz in Tabak führt zu einer Unterversorgung des Pollens mit Zuckern und damit zu degenerierten, infertilen Pollen (Goetz *et al.*, 2001). Dieser Phänotyp stimmt mit dem bei BZI-1- Δ N Pflanzen beobachteten Pollenphänotyp überein (Heinekamp *et al.*, 2002).

Neben der metabolischen Bedeutung haben Zucker in der Pflanze auch eine wichtige Funktion als Signalmoleküle. Am Beispiel des Embryos von *Vicia faba* konnte gezeigt werden, dass die Umstellung von Hexosen auf Saccharoseernährung von der Invertaseaktivität abhängt. Die Differenzierung des Embryos ist dabei von der Art des Zuckers, der für die Ernährung genutzt wird, abhängig. Solange Hexosen zur Ernährung des Embryos dienen, teilen sich die Zellen weiter. Ab einem bestimmten Zeitpunkt wird aber nur noch Saccharose an den Embryo geliefert. Das führt zu einer abrupten Änderung im Entwicklungsprogramm: die Zellteilungsaktivität wird gestoppt, und die Kotyledonen breiten sich aus (Weber, 1997). Die Zugabe von Hexosen kann die Zellteilung künstlich wieder aktivieren (Weber, 1996). Es konnte in *Vicia faba* gezeigt werden, daß ein Zuckergradient direkt mit der mitotischen Aktivität der Zellen korrespondiert (Borisjuk *et al.*, 1998). In *Arabidopsis thaliana* wird die Genexpression des D-Typ Cyclins von Zuckern reguliert (Riou-Khamlichi *et al.*, 2000). Zucker wirken sich als Signalmoleküle also direkt auf die Zellteilung aus, dabei spielt die Regulation der Invertaseaktivität eine wichtige Rolle. In der Karotte hat man durch einen Antisense-Ansatz den Gehalt an der Zellwandinvertase drastisch reduziert. Das führt zu winzigen Samen, da das Endosperm sich nicht entwickelt

(Cheng *et al.*, 1996). Tabakpflanzen, die eine Hefeinvertase im Apoplasten oder in der Vakuole exprimieren, zeigen spontane Lesionen, die denen einer Hypersensitiven Reaktion entsprechen (von Schaewen *et al.*, 1990; Sonnewald *et al.*, 1991). Für diese Pflanzen konnte eine konstitutive Expression von an der Pathogenabwehr beteiligter Gene und die Akkumulation von Salicylsäure, einem wichtigen Signalmolekül für die Induktion einer SAR („Systemic aquired resistance“), gezeigt werden. Die Pflanzen zeigen auch eine höhere Resistenz gegen das virale Pathogen PVY (Herbers *et al.*, 1996). Invertasen sind also Schlüsselenzyme für die Regulation von Metabolismus, Wachstum, Entwicklung und Stressantwort der Pflanze (zur Übersicht siehe Sturm, 1999).

1.3.3 BZI-1 ist in Signalwege der pflanzlichen Pathogenantwort eingebunden

BZI-1 ist an der Pathogenantwort der Pflanze beteiligt: *in vitro* und *in vivo* konnte gezeigt werden, daß BZI-1 nach Pathogenbefall serinspezifisch durch eine cytosolische Kinase phosphoryliert wird (Dröge-Laser *et al.*, 1997; Kuhlmann *et al.*, 2003). Die Vermehrung des Bakterienstamms *Pseudomonas syringae* pv *ptsi*, ist in BZI-1- Δ N Pflanzen im Vergleich zu Wildtyppflanzen reduziert. BZI-1- Δ N Pflanzen tragen das N-Resistenzgen. Sie können also durch eine Hypersensitive Reaktion (HR) die Ausbreitung von Tabak-Mosaik-Viren (TMV) begrenzen. Wenn BZI-1- Δ N Pflanzen mit TMV infiziert werden, sind die Lesionen, im Gegensatz zu Lesionen auf Wildtyppflanzen, nicht lokal begrenzt. Das ganze Blatt wird nekrotisch (Kuhlmann *et al.*, 2003).

Es konnte eine Interaktion von BZI-1 mit dem Ankyrin-Repeat-Protein ANK1 in Hefe gezeigt werden. Die ANK1-Transkription nimmt nach Pathogenbefall ab (Kuhlmann *et al.*, 2003). Die Reduktion des ANK1-Proteins *in planta* durch einen RNAi Ansatz führt wahrscheinlich zu einem höherem Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies in den Blättern. Pflanzen mit einem schwachen RNAi-Phänotyp zeichnen sich durch eine verstärkte Pathogenabwehr aus. Nach Infektion mit TMV zeigt diese Pflanze eine erhöhte Resistenz (Böttner, 2003). Bei ANK1 könnte es sich um einen Regulator der BZI-1 Aktivität handeln. BZI-1 interagiert über die α -helikale Domäne D1, einer zwischen den bZIP-Proteinen der Familie C konservierten Domäne, mit ANK1. Nach

Pathogen-Infektion kommt es zur Abnahme des Gehaltes an *ANK1* Transkript. Wenn auch der ANK1 Proteingehalt nach Pathogenbefall zurückgehen würde, könnte BZI-1 aus der Bindung mit ANK1 freigesetzt werden und dann seine Zielgene aktivieren.

1.3.4 BZI-1 heterodimerisiert mit anderen bZIP-Transkriptionsfaktoren

Die Dimerisierung von Transkriptionsfaktoren mit Proteinen der gleichen Familie kann Einflüsse auf die DNA-Bindungseigenschaften, das Aktivierungspotential und die Lokalisation haben (Lamb und McKnight, 1991; zur Übersicht siehe Schwechheimer und Bevan, 1998). Für die bZIP-Transkriptionsfaktoren CPRF1, CPRF2, einem möglichen BZI-1 Ortholog, und CPRF3 aus *Petersilie* konnte gezeigt werden, daß sie bevorzugt Heterodimere bilden (Armstrong *et al.*, 1992). CPRF4a bildet sowohl Homodimere als auch Heterodimere mit CPRF1, eine Heterodimerisierung mit CPRF2 findet nicht statt (Kircher *et al.*, 1998). Die Proteine CPRF6 und CPRF7, die der Gruppe S zugeordnet werden können, heterodimerisieren mit CPRF2 (Rügner *et al.*, 2001). Auch die GBF-Proteine zeigen ein differenziertes Dimerisierungsverhalten: GBF1, GBF2 und GBF3 hetero- und homodimerisieren (Schindler *et al.*, 1992). GBF4 homodimerisiert nicht, bildet aber Heterodimere mit GBF2 und GBF3 (Menkens und Cashmore, 1994). Auch im tierischem System gibt es viele Beispiele für selektive Heterodimerisierung von bZIP-Proteinen. So konnte für die Säugetier Transkriptionsfaktoren c-Jun und c-Fos die Heterodimerisierung gezeigt werden (Halazonetis *et al.*, 1988). Die Mitglieder der „small“-Maf-Transkriptionsfaktorfamilie heterodimerisieren mit c-Fos, aber nicht mit c-Jun. Darüber hinaus bilden sie aber auch Homodimere (Kataoka *et al.*, 1995).

In einem Yeast Two Hybrid Screen konnten mit BZI-1 als Köder drei weitere bZIP-Proteine isoliert werden, die mit BZI-1 heterodimerisieren (Strathmann *et al.*, 2001). Diese drei Proteine zeichnen sich durch ihr geringes Molekulargewicht (unter 20 kD), ihren extrem kurzen Aminoterminus und Carboxyterminus, und einem sehr langen Leucinzipper über acht bis neun Leucin-Wiederholungen aus. In Anlehnung an die Klassifizierung in *Arabidopsis thaliana* lassen sie sich zur Gruppe S der bZIP-Transkriptionsfaktoren zählen (Jacoby *et al.*, 2002).

Bei BZI-2 handelt es sich um ein Protein mit einem Molekulargewicht von 19 kD. Es weist hohe Homologien zu ATB2 (Rook *et al.*, 1998a) aus *Arabidopsis thaliana* auf, 58 % der Aminosäuren

sind identisch. *ATB2* wird vor allem in Sink-Organen exprimiert. Wenn etiolierte oder dunkeladaptierte Keimlinge belichtet werden, steigt die Transkription der *ATB2*-RNA an. Die *ATB2* mRNA zeichnet sich durch einen 547 bp langen 5'-untranslatierten Bereich aus, in dem sich vier offene Leserahmen (uORFs, „upstream Open Reading Frames“) befinden. In einem Versuchsansatz wurden transgene Pflanzen hergestellt, die ein GUS-Reportergen unter der Kontrolle des *ATB2*-Promotors mit dem 5'-untranslatierten Bereich exprimierten. Hier konnte gezeigt werden, daß die uORFs eine posttranskriptionelle Repression der GUS-Expression durch Saccharose vermitteln. Deletion der uORFs führte zu einer Aufhebung der Saccharoserepression. Es wird angenommen, daß *ATB2* eine Rolle bei der Regulation der Kohlenhydratverteilung spielt (Rook *et al.*, 1998b).

Die Regulation von Genen durch Zucker ist ein weit verbreitetes Phänomen (Zur Übersicht siehe Rolland *et al.*, 2002, Pego *et al.*, 2000). Im Jahr 1990 konnte erstmals in Maismesophyllprotoplasten gezeigt werden, dass Kohlenhydrate sich direkt auf die Transkription von Genen, die an der Photosynthese beteiligt sind, auswirken, und über diesen Mechanismus die Photosyntheserate reguliert wird (Sheen, 1990). Glucose und Fructose wirken sich in physiologischen Mengen hemmend auf die Expression der Photosynthesegene aus (Jang und Sheen, 1994). Neben den Photosynthesegenen werden eine Reihe anderer, am Metabolismus und der Source-Sink-Verteilung der Metabolite beteiligter Gene durch Zucker reguliert (zur Übersicht siehe Koch, 1996; Smeeckens und Rook, 1997; Rolland *et al.*, 2002, Roitsch, 1999).

Neben dem Transkriptionsfaktor *BZI-2* wurde ein partieller Klon eines weiteren bZIP-Transkriptionsfaktors, *BZI-3*, im Yeast Two Hybrid Screen isoliert. *BZI-3* weist starke Homologien zu einer Gruppe von kälteinduzierbaren Transkriptionsfaktoren in verschiedenen Spezies, wie *O.s.* *LIP19* (Aguan *et al.*, 1993) *Z.m.* *mLIP15* (Kusano *et al.*, 1995) und *N.t.* *TBZ17* (Kusano *et al.*, 1998) Für *mLIP15* konnte gezeigt werden, daß neben Kältestreß auch Salzstreß, erhöhte Absicinsäurekonzentrationen und Anaerobiose zu einer Akkumulation der Transkriptmengen führen (Kusano *et al.*, 1995). Für *LIP19* konnte ebenfalls ein Anstieg der Transkriptmenge durch osmotischen Streß und Absicinsäure gezeigt werden.

Der dritte im Yeast Two Hybrid Screen isolierte Klon, *BZI-4*, war ebenfalls ein partieller Klon. *BZI-4* zeigt Homologien zu einer Reihe von kleinen bZIP-Transkriptionsfaktoren der Familie S (Jacoby *et al.*, 2001). Die größten Homologien bestehen zu dem bZIP-Protein *CPRF6* aus *Petroselinum crispum* (Rügner *et al.*, 2001).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Homo- und Heterodimerisierung von BZI1 mit BZI-2, BZI-3 und BZI-4 kann eine wichtige Regulationsmöglichkeit für die spezifische Zielgenaktivierung sein.

Man kann verschiedene Ebenen der Genregulation durch die spezifischen Wirkungen der BZI-Dimere unterscheiden. In Abbildung 1.3 ist ein Schema der Regulationsebenen dargestellt. In dieser Arbeit soll zunächst die Verteilung der BZI-Transkripte in den einzelnen Organen und nach verschiedenen Stimuli in Northern Blot Analysen untersucht werden. Die Verteilung der BZI-Proteine ist ein wichtiges Kriterium, welche Dimere gebildet werden können, denn nur wenn die Proteine gemeinsam an einem Ort und zu einem Zeitpunkt exprimiert werden, ist eine Dimerisierung auch möglich.

Ein weiteres wichtiges Regulationskriterium ist die spezifische Interaktion von bestimmten bZIP-Proteinen. Nur wenn eine Interaktion möglich ist, können sich spezifische Dimere bilden. Deswegen soll in dieser Arbeit getestet werden, ob BZI-1 selektiv mit den BZI-Proteinen der Gruppe S interagiert, oder ob die Interaktion unspezifisch ist.

Möglicherweise binden unterschiedliche Dimere an unterschiedliche *cis*-Elemente. Das kann eine wichtige Regulationsmöglichkeit der genspezifischen Wirkung der einzelnen Homo- und Heterodimere sein. In dieser Arbeit soll daher die Bindung verschiedener Homo- und Heterodimere an verschiedene ACGT-Elemente *in vitro* mit Gel Retardationsanalysen und *in vivo* in transienten Analysen und mit Chromatin Immunopräzipitation untersucht werden.

Die Expression der Zielgene hängt desweiteren von den Aktivierungs- bzw. Repressoreigenschaften der einzelnen Homo- und Heterodimere ab. Daher sollen diese Effekte der verschiedenen Dimere auf die Transkription in transienten Assays analysiert werden.

Die genannten Regulationsmechanismen können sich auf die Expression der Zielgene auswirken. Im Rahmen dieser Arbeit sollen potentielle Zielgene bestimmt werden und die Regulation der Expression durch die BZI-Proteine in Northern Blot Analysen untersucht werden. Um die Funktion der Proteine BZI-2, BZI-3 und BZI-4 Proteine aufzuklären, sollen transgene Pflanzen hergestellt werden, die die Proteine BZI-2, BZI-3 und BZI-4 ektopisch überexprimieren. Durch die Überexpression eines der Proteine greift man massiv in die Verteilung des Proteins, und daraus resultierend in die Genregulation der Zielgene ein. Die Pflanzen sollen phänotypisch und

auf Northern Blot Ebene untersucht werden, um Hinweise auf die Rolle der Proteine in der Pflanze zu erhalten.

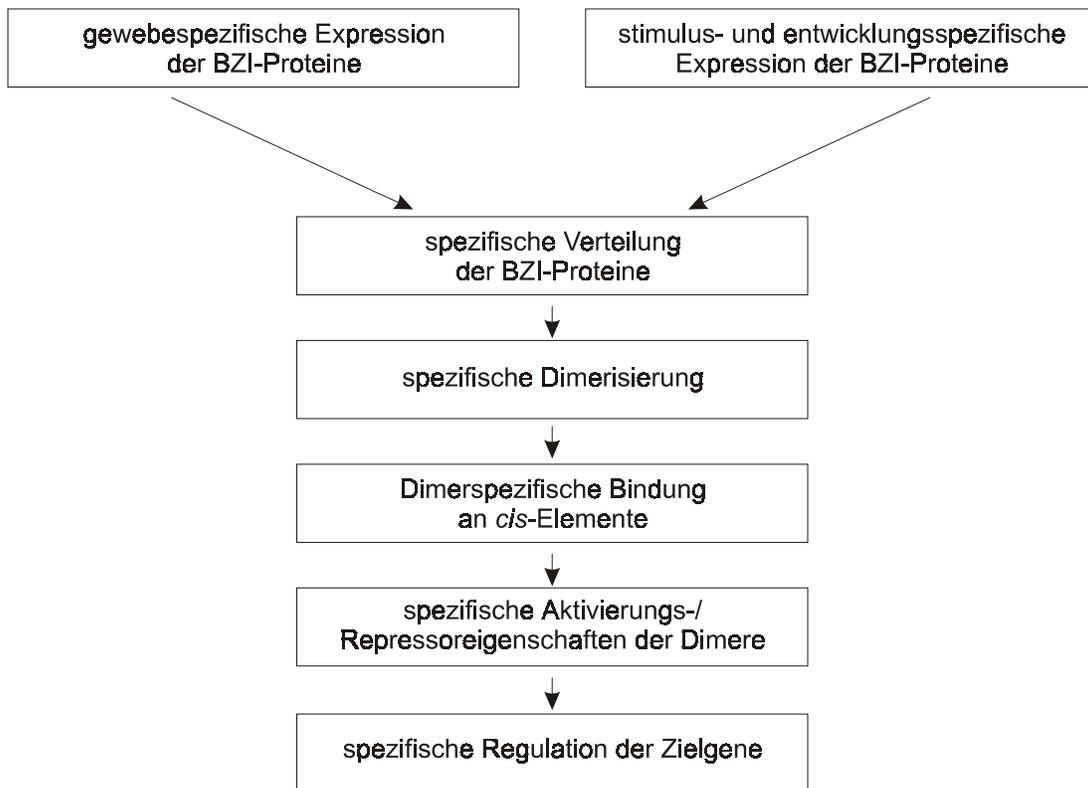


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Regulationsebenen für die spezifische Genaktivierung durch bZIP Dimere.

2 Material

2.1 Organismen

2.1.1 Bakterien

Stamm	Eigenschaften	Referenz
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA 4404	pAL4404, Sm ^r	Hoekema <i>et al.</i> , 1983
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	recA1 relA1 thi-1 Δ lacU169 ϕ 80 (lacZ Δ M15) hsdR17(r _k -m _k ⁺)	Hanahan, 1983

2.1.2 Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*)

Stamm	Eigenschaften	Referenz
PJ69-4a	<i>MATa</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3, 112</i> , <i>gal4Δ</i> , <i>gal80Δ</i> , <i>LYS2::GAL1-HIS3</i> , <i>GAL2-ADE</i> , <i>2 met 2::GAL7-lacZ</i>	James <i>et al.</i> , 1996

2.1.3 Pflanzen

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

Pflanze	Kultivar	Eigenschaften	Referenz
CHS8-GUS (Wildtyp)	Xanthi	pchs8:: <i>gus</i> ; Km ^r	Schmid <i>et al.</i> (1990)
BZI-1-Oex	Xanthi	Ausgangspflanze: CHS8-GUS Tx:: <i>BZI-1</i> ; Km ^r , Hyg ^r	Heinekamp, 2002
BZI-1-HA Δ N	Xanthi	Ausgangspflanze: CHS8-GUS Tx:: <i>HA-BZI-1-ΔN</i> ; Km ^r , Hyg ^r	Heinekamp, 2002
BZI-2-Oex	Xanthi	Ausgangspflanze: CHS8-GUS Tx:: <i>BZI-2</i> ; Km ^r , Hyg ^r	diese Arbeit
BZI-3-Oex	Xanthi	Ausgangspflanze: CHS8-GUS Tx:: <i>BZI-3</i> ; Km ^r , Hyg ^r	diese Arbeit
BZI-4-Oex	Xanthi	Ausgangspflanze: CHS8-GUS Tx:: <i>BZI-4</i> ; Km ^r , Hyg ^r	diese Arbeit
Hö20.20	SNN	CaMV 35S:: <i>TetR</i> ; Km ^r	Höfgen, unveröffentlicht
HöBZI-2	SNN	Ausgangspflanze: Hö20.20 TX:: <i>BZI-2</i> ; Km ^r , Hyg ^r	diese Arbeit
HöBZI-3	SNN	Ausgangspflanze: Hö20.20 Tx:: <i>BZI-3</i> ; Km ^r , Hyg ^r	diese Arbeit

HöBZI-4	SNN	Ausgangspflanze: Hö20.20 Tx.:BZI-3; Km ^r , Hyg ^f	diese Arbeit
BY-2	Bright Yellow 2 <i>Nicotiana tabacum</i> Suspensionskultur		Haasen <i>et al.</i> , 1999

2.2 Nukleinsäuren

2.2.1 Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pBIN-BZI-2	pBinHygTx-Derivat, enthält das <i>BZI-2</i> -Gen unter Kontrolle des Tx-Promotors	diese Arbeit
pBIN-BZI-3	pBinHygTx-Derivat, enthält das <i>BZI-3</i> -Gen unter Kontrolle des Tx-Promotors	diese Arbeit
pBIN-BZI-4	pBinHygTx-Derivat, enthält das <i>BZI-4</i> -Gen unter Kontrolle des Tx-Promotors	diese Arbeit
pBinHygTx	pBINHyg-Derivat, enthält den Tx-Promotor und den Terminator <i>pA-NOS</i> , binärer Pflanzentransformationsvektor; <i>km^R</i>	Rieping <i>et al.</i> , 1994
pBluescript II SK	Für <i>in vitro</i> Transkription geeigneter Vektor; <i>lacZα</i> , <i>amp^R</i>	Stratagene
pBZI-1	pUCA7Tx -Derivat, enthält das <i>BZI-1</i> -Gen; <i>amp^R</i>	Heinekamp, 2002
pBZI-1-ΔN	pUC18-Derivat, enthält das <i>BZI-1-ΔN</i> -Gen unter Kontrolle des Tx-Promotors; <i>pANOS</i>	Dröge-Laser, unveröffentlicht
pGAD424	<i>GAL4</i> ₍₇₆₈₋₈₈₁₎ AD, <i>LEU2</i> , <i>amp^R</i>	Bartel <i>et al.</i> , 1993
pGAD-BZI-1-ΔN	<i>GAL4</i> ₍₇₆₈₋₈₈₁₎ AD-Fusion mit HA-BZI-1, <i>LEU2</i> , <i>amp^R</i>	Strathmann <i>et al.</i> , 2001
pGAD-BZI-2	pGAD424-Derivat, über <i>EcoRI</i> und <i>SalI</i> wurde eine <i>BZI-2</i> cDNA inseriert	Strathmann <i>et al.</i> , 2001
pGAD-BZI-3	pGAD424-Derivat, über <i>EcoRI</i> und <i>SalI</i> wurde ein <i>BZI-3</i> cDNA-Fragment inseriert	Strathmann <i>et al.</i> , 2001
pGAD-BZI-4	pGAD424-Derivat, über <i>EcoRI</i> und <i>SalI</i> wurde ein <i>BZI-4</i> cDNA-Fragment inseriert	Strathmann <i>et al.</i> , 2001
pGAD-CPRF5	<i>GAL4</i> ₍₇₆₈₋₈₈₁₎ AD-Fusion mit TGA2.2, <i>LEU2</i> , <i>amp^R</i>	Rügner <i>et al.</i> , 2001
pGAD-CPRF6	<i>GAL4</i> ₍₇₆₈₋₈₈₁₎ AD-Fusion mit CPRF5, <i>LEU2</i> , <i>amp^R</i>	Rügner <i>et al.</i> , 2001
pGAD-CPRF7	<i>GAL4</i> ₍₇₆₈₋₈₈₁₎ AD-Fusion mit CPRF6, <i>LEU2</i> , <i>amp^R</i>	Rügner <i>et al.</i> , 2001
pGAD-TGA2.1	<i>GAL4</i> ₍₇₆₈₋₈₈₁₎ AD-Fusion mit TGA2.1, <i>LEU2</i> , <i>amp^R</i>	Thurow, 2001
pGAD-TGA2.2	<i>GAL4</i> ₍₇₆₈₋₈₈₁₎ AD-Fusion mit TGA2.2, <i>LEU2</i> , <i>amp^R</i>	Thurow, 2001
pGBT9	<i>GAL4</i> ₍₁₋₁₄₇₎ DNA-BD, <i>TRP1</i> , <i>amp^R</i>	Bartel <i>et al.</i> , 1993

pGBT-BZI-1	GAL4 ₍₁₋₁₄₇₎ DNA-BD-Fusion mit BZI-1 <i>LEU2</i> , <i>amp^R</i>	Strathmann <i>et al.</i> , 2001
pGBT-BZI-1 ₂₃₈₋₄₅₀	GAL4 ₍₁₋₁₄₇₎ DNA-BD-Fusion mit HA-BZI-1 ₂₃₈₋₄₅₀ , <i>LEU2</i> , <i>amp^R</i>	Strathmann <i>et al.</i> , 2001
pGBT-BZI-1 ₃₁₂₋₄₅₀	GAL4 ₍₁₋₁₄₇₎ DNA-BD-Fusion mit BZI-1 ₃₁₂₋₄₅₀ , <i>LEU2</i> , <i>amp^R</i>	Strathmann <i>et al.</i> , 2001
pGBT-BZI-1 ₇₃₋₂₄₂	GAL4 ₍₁₋₁₄₇₎ DNA-BD-Fusion mit HA-BZI-1 ₇₃₋₂₄₂ , <i>LEU2</i> , <i>amp^R</i>	Strathmann <i>et al.</i> , 2001
pGBT-BZI-1-ΔN	GAL4 ₍₁₋₁₄₇₎ DNA-BD-Fusion mit HA-BZI-1-ΔN <i>LEU2</i> , <i>amp^R</i>	Strathmann <i>et al.</i> , 2001
pGBT-BZI-2c	GAL4 ₍₁₋₁₄₇₎ DNA-BD-Fusion mit BZI-2, <i>LEU2</i> , <i>amp^R</i>	diese Arbeit
pGEM-P-BZI4	pGEM-T Derivat, enthält das RAGE-Fragment von <i>BZI-4</i>	diese Arbeit
pGEM-T	pGEM-5Zf(+)-Derivat, mit <i>EcoRV</i> linearisiert und ddT-Überhängen an den 3'-Enden versehen, Klonier- und Sequenziervektor für PCR-Produkte; <i>amp^R</i> , <i>lacZα</i>	Promega
pHB4xE1-gus	pHB-Derivat, kodiert für das GUS-Reportergen unter der Kontrolle von 4 x E1 und Minimalpromotor	Heinekamp, unveröffentlicht
pHBT	pHBT-sGFP-Derivat, Entfernung des sGFP Gens durch <i>NcoI/NotI</i> -Verdau, Klenow fill in und Religation.	Heinekamp, 2002
pHBT-BZI-1	pHBT-Derivat, enthält das <i>BZI-1</i> -Gen	Heinekamp, 2002
pHBT-BZI-1-ΔN	pHBT-Derivat, enthält das <i>BZI-1-ΔN</i> -Gen	Heinekamp, 2002
pHBT-BZI-2	pHBT-Derivat, enthält das <i>BZI-2</i> -Gen	diese Arbeit
pHBT-BZI-3	pHBT-Derivat, enthält das <i>BZI-2</i> -Gen	diese Arbeit
pHBT-BZI-4	pHBT-Derivat, enthält das <i>BZI-2</i> -Gen	diese Arbeit
pHBT-sGFP	pHBT-sGFP-Derivat (Sheen, unveröffentlicht), enthält das <i>sGFP-S65T</i> -Gen zwischen dem HBT-Promotor und dem <i>NOS</i> -Terminator, zusätzliche <i>KpnI</i> und <i>EcoRI</i> Schnittstellen vor der <i>BamHI</i> Schnittstelle; <i>amp^R</i>	Nickolov, 2003
pSK-BZI-1	pBluescript II SK-Derivat, enthält das <i>BZI-1</i> Gen	Heinekamp, unveröffentlicht
pSK-BZI-2	pBluescript II SK-Derivat, enthält das <i>BZI-2</i> Gen	diese Arbeit
pSK-BZI-3	pBluescript II SK-Derivat, enthält das <i>BZI-3</i> Gen	diese Arbeit
pSK-BZI-4	pBluescript II SK-Derivat, enthält das <i>BZI-4</i> Gen	diese Arbeit
pTD1	SV large T-antigen ₍₈₄₋₇₀₈₎ in pGAD3F, <i>LEU2</i> , <i>amp^R</i>	Li <i>et al.</i> , 1993; Chien <i>et al.</i> , 1991
pTTN.t.-GH3-Gus	pTTL-GUS-Derivat, enthält den <i>GH3</i> Promotor	Heinekamp, unveröffentlicht
pUC57-T	pUC57-Derivat, mit <i>EcoRV</i> linearisiert und ddT-Überhängen an den 3'-Enden versehen. Klonier- und Sequenziervektor für PCR-Produkte; <i>lacZα</i> , <i>amp^R</i>	MBI Fermentas

pUCA7Tx	PUC-Derivat mit TX-Promotor, pAocs, Amp ^r	Gatz <i>et al.</i> , 1992
pUC-NBZI3	pUC57-T-Derivat, enthält das 5'-RACE <i>BZI-3</i> Fragment	diese Arbeit
pUC-NBZI4	pUC57-T-Derivat, enthält das 5'-RACE <i>BZI-4</i> Fragment	diese Arbeit
pVA3	murine p53 ₍₇₂₋₃₉₀₎ in pAS2-1, <i>TRP1</i> , <i>amp^R</i>	Iwabuchi <i>et al.</i> , 1993

2.2.2 cDNA-Expressionsbank

Die cDNA-Expressionsbank wurde aus Tabak-Blatt-mRNA hergestellt (Rieping und Gatz, unveröffentlicht). Die Insertion der cDNAs in den Vektor pGAD424 erfolgte über die Schnittstellen *EcoRI* und *Sall*.

2.2.3 Hybridisierungssonden

Alle hier aufgelisteten Fragmente stammen aus *Nicotiana tabacum*.

Sonde	Eigenschaften	Referenz
<i>BZI-1</i>	<i>XhoI</i> / <i>PstI</i> Fragment (459 Bp) der <i>BZI-1</i> -cDNA	Heinekamp, 2002
<i>BZI-2</i>	<i>XbaI</i> / <i>Acc65I</i> Fragment (512 Bp) der <i>BZI-2</i> -cDNA	diese Arbeit
<i>BZI-3</i>	<i>XbaI</i> / <i>Acc65I</i> Fragment (349 Bp) der <i>BZI-3</i> -cDNA	diese Arbeit
<i>BZI-4</i>	<i>XbaI</i> / <i>Acc65I</i> Fragment (485 Bp) der <i>BZI-4</i> -cDNA	diese Arbeit
<i>GH3</i>	0,9 kb PCR-Fragment des <i>GH3</i> -Gens unter Verwendung der Primer <i>N.t.GH3</i> upper und <i>N.t.GH3</i> lower	Roux und Perrot-Rechenmann, 1997
<i>NIN88</i>	0,5 kb <i>MunI</i> Fragment der <i>Nin88</i> -cDNA	Goetz <i>et al.</i> , 2001

2.2.4 Oligonukleotide

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

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'
AP1	GTAATACGACTCACTATAGGGC
AP2	ACTATAGGGCACGCGTGGT
M13 reverse	GAGCGGATAACAATTTTCACACAGG
M13 universal	AGGGTTTCCCAGTCACGACGTT
<i>N.t.GH3</i> lower	CAAATAACCCATGTTTGGCATG
<i>N.t.GH3</i> upper	CCTCACTAGCTCTGGAACGTCAG
NIN88Gfw	GATTAATTTTAAAGCACGTGGCACCCCTGAATACTAGAAGCCTT
NIN88Gmutfw	GATTAATTTTAAAGATTTTCGGCACCCCTGAATACTAGAAGCCTT
NIN88Gmutrev	CCTAAAGGCTTCTAGTATTCAGGGTGCCGAAATCTTTAAATT
NIN88Grev	CCTAAAGGCTTCTAGTATTCAGGGTGCCACGTGCTTTAAATT
NIN88T/Gfw	TAGGGGCACTAGATGAGCAGAATAACGTGTTCTCGTCGCGTA
NIN88T/Gmutfw	TAGGGGCACTAGATGAGCAGAATATTTTCGTTCTCGTCGCGTA

NIN88T/Gmutrev	TTTTTACGCGACGAGAACGAAATATTCTGCTCATCTAGTGCC
NIN88T/Grev	TTTTTACGCGACGAGAACACGTTATTCTGCTCATCTAGTGCC
NT_GH3-fw	AATTCGGGTTATGTAGACGTGGTTGGACCCATTTTGTCCA
NT_GH3mutfw	AATTCGGGTTATGTAGACGATTTTGGACCCATTTTGTCCA
NT_GH3mutrev	TGGACAAAATGGGGTCCAAAATCGAATACATAACCCGAATT
NT_GH3-rev	TGGACAAAATGGGGTCCAACCACGTCTACATAACCCGAATT
nup	AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT
pB2-E	CAAGAATTCATGGCTTCATCAAGTGGAACATC
pB2-S	CCTGTCGACGGTCTGGCTAATCAGTACTGC
p-gh3-cip-fw	CTCGTAGGAGGTCATGTAGCATG
p-gh3-cip-rev	GTTTGTGTTGGAATTAGATAACGAAGG
pN3-4	AAGGTACCTAGGATGGCTTTGACACAGCAACC
pN3-5	TATCTAGAGAACTGCAGAGCAGCAGCTC
pN4-4	AAGGTACCTAGGATGTCAGCTTTAAGGCAGTGC
pN4-5	TATCTAGAGCCTGTAAAGACAACCAAATCGACG
pPMT1	GGAAGTCATATCTACCAACAC
pPMT2	GCCATAATGCGCTAAACTCTG
pRN31	CATCGAGGGTGAGGTAGTTTCTTCC
pRN32	CAGTCAGTTCTGCCATTTGAGCCC
pRN41	CGGCTTCAGCAAAGGATCAGCAGCATC
pRN42	GCATGTGCCTTCAACACATTATTCTGTGC
SMART II Ol..	AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCGGG
up long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT
up short	CTAATACGACTCACTATAGGGC

2.3 Größenstandard

2.3.1 DNA-Größenstandard

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

λ PstI (λ -DNAgespalten mit *Pst*I)
 MBI Fermentas Generuler™ 100 bp Ladder Plus
 MBI Fermentas Generuler™ 1 kb Ladder
 MBI Fermentas Generuler™ DNA Ladder Mix

2.3.2 Protein-Größenstandard

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

2.4 Antiseren

Bezeichnung	Spezifität	Eigenschaft	Verdünnung	Referenz
α HA	HA-Epitoptag (AS: YPYDVPDYA)	monoklonal, aus Maus	1 : 800	Santa Cruz
anti rabbit Ig	Kaninchen-Immunglobulin	polyklonal, aus Esel, Peroxidase gekoppelt	1 : 10000	Amersham
α BZI-1	BZI-1	polyklonal, aus Kaninchen	1 : 2000	Kuhlmann, 2002
α BZI-2	BZI-2-Peptid (AS: DHNQEEPYSFNFAQNEP)	polyklonal, aus Kaninchen	1 : 2000	diese Arbeit
α BZI-3	BZI-3-Peptid (AS: QLQNQNVLWREKID)	polyklonal, aus Kaninchen	1 : 2000	diese Arbeit
α BZI-4	BZI-4-Peptid (AS: KIEETTERYTV)	polyklonal, aus Kaninchen	1 : 2000	diese Arbeit

2.5 Nährmedien und Zusätze

2.5.1 Pflanzenmedien

B5- Infektionsmedium	3,5 g/l Gamborgs B5 Medium 30 g/l Saccharose 3,15 mM NH_4NO_3 2,35 mM Mes pH 5,7 mit KOH
Kallusinduktions- medium:	4,59 g/l Murashige und Skoog Medium 30 g/l Saccharose 7 g/l Select-Agar pH 5,7 mit KOH nach dem Autoklavieren Zugabe von Kinetin (Endkonzentration 0,1 mg/l) und NAA (Endkonzentration 0,5 mg/l)
MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962)	4,59 g/l Murashige und Skoog Medium 20 g/l Saccharose 7 g/l Select-Agar pH 5,7 mit KOH
Suspensionskultur- medium	4,59 g/l Murashige und Skoog Medium 30 g/l Saccharose 0,9 g/l Myo-Inositol 0,9 g/l Thiamin pH 5,7 mit KOH

3.5.2 Bakterienmedien

dYT	20 g/l Trypton 10 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl pH 7,0 mit NaOH
LB	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl pH 7,0 mit NaOH
YEB	10 g/l Beefextrakt 2 g/l Hefeextrakt 5 g/l Pepton 5 g/l Saccharose 2 mM MgSO ₄ pH 7,0 mit NaOH

2.5.3 Hefemedien

SD	6,7 g/l Nitrogen base 0,61 g/l Complete Supplement Mixture 20 g/l Glucose pH 5,8 Nach dem Autoklavieren Zugabe der Aminosäuren- Stammlösungen (20x Stocks)
YPD	20 g/l Difco Pepton 10 g/l Hefeextrakt 20 g/l Glucose pH 5,8

Festmedium: Zugabe von 15 g Bacteriological Agar je Liter Flüssigmedium.

2.5.4 Zusätze

Substanz	Endkonzentration	Stammlösung
2,4 D	versuchsabhängig	1,1 mg/ml 70 % Ethanol
6-BAP	versuchsabhängig	1,0 mg/ml 70 % Ethanol
Adenin	10 mg/l	200 mg/l
Ampicillin	100 mg/l	100 mg/ml H ₂ O
Cefotaxim	500 mg/l	250 mg/ml H ₂ O
Chlortetracyclin	10 mg/l	1 mg/ml H ₂ O
Histidin	20 mg/l	400 mg/l
Hygromycin B	40 mg/l	50 mg/ml Methanol
IPTG	50 mg/l	23,8 mg/ml H ₂ O
Kanamycin	50 mg/l	50 mg/ml H ₂ O
Kinetin	versuchsabhängig	1,0 mg/ml 70 % Ethanol

Leucin	100 mg/l	2000 mg/l
NAA	versuchabhängig	1,0 mg/ml DMSO
Tryptophan	50 mg/l	1000 mg/l
X-Gal	40 mg/l	20 mg/ml DMF

2.6 Allgemeine Puffer und Lösungen

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

2.7 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller/Lieferant
Autoklav	3870 ELV	Tuttnauer
Bioimager (Phosphoimager)	BAS-1000	Fuji
Elektroporationsgerät	Gene Pulser II	BIORAD
Feinwaage	1207 MP2	Sartorius
Fluorometer	Cytofluor™ II	Perseptive
Geldokumentationsstation		MWG Biotech
Gelelektrophoresekammer, horizontal		Werkstatt der Universität
Gelelektrophoresekammer, vertikal	Joey™ JGC-4,	AGS
Geltrockner	Phero-Temp	Biotec-Fischer
Heizblock		Boekel Scientific
Heizrührer	RCT-Basic	IKA Labortechnik
Hybridisierungsschrank	Hy-St-1	Bachofer
Hybridisierungswasserbad	Belly Dancer	Stovall

Inkubationsschrank		WTC Binder
Klimaschrank		Percival Scientific
Kühlzentrifuge / Rotor	Sorvall RC 5BPlus / SS34	DuPont
Netzgeräte	EC 250-90, EC 105	EC Apparatus Corp.
PCR-Gerät	MiniCycler TM PTC-150	MJ Research
Peristaltikpumpe	Cyclo 1	Roth
pH-Meter	HI 9321	Hanna Instruments
Photometer	720 LC	Kontron
RNA-/DNA-Calculator	GenQuant II	Pharmacia
Semi-Dry-Blot-Apparatur		Werkstatt der Universität
Sequenzanalysegerät	ABI Prism 310	Perkin-Elmer
Speed vac	SK 100	Sarvant
Spektralphotometer für Microtiterplatten	MRX Dynex Plate Reader	Dynex
Sterilbank	Microflow Laminar	Nunc
Tischzentrifuge	Biofuge pico	Heraeus
Tischzentrifuge, kühlbar	5403	Eppendorf
Ultraschallgerät	Soniprep 150	Scientific Instruments
Ultrazentrifuge	Centrikon T-1065	Kontrom
UV-Transilluminator	FLX-20 M	Vilber Lourmat
Vakuumpumpe		Brand
Vortex	L46	Labinco BV
Waagen	SPO51, SAC62	Scaltec
Wasseraufbereitungsanlage	Option 4, Maxima	ELGA
Zentrifuge, Ausschwingrotor	Universal 16A	Hettich

2.8 Verbrauchsmittel

Produkt	Hersteller/Lieferant
Carborundum	Aldrich
Elektroporationsküvetten	BioRad
Filter Cellulose-Nitrat (Porengröße 0,1 und 0,2 µm)	Sartorius
Fließpapier 3MM	Schleicher & Schuell
Gläser zur sterilen Pflanzenanzucht	Weck
Glasmaterialien	Brand, Schott
Glasperlen (425-600 µm)	Sigma
Kunststoff-Einwegmaterial	Eppendorf, Greiner, Sarstedt
Micro Spin TM G25 Column	Pharmacia
Microtiterplatten	Nunc, Roth
Nylon-Membran Hybond TM -N	Amersham Life Science
Parafilm N	American National Can
PVDF-Transfer-Membran Immobilon TM -P	Millipore
Röntgenfilme Cronex	DuPont

2.9 Chemikalien

Produkt	Hersteller
2,4 Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D)	Sigma
4-Methylumbelliferyl (4-MU)	Sigma
4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid (4-MUG)	Roth; Duchefa
6-Benzylaminopurin (6-BAP)	Sigma
Agar Bacteriological	GIBCO BRL Life Technol.
Agarose SeaKem LE	Biozym
Aminosäuren	Sigma
Ammoniumpersulfat	Amresco
Ampicillin	AGS
Aprotinin	Sigma
Benzamidin	Sigma
BioRad-Protein-Assay	BioRad
Bromphenolblau-Natriumsalz	Roth
BSA (Bovine Serum Albumine)	Roth
Cefotaxim	Duchefa
Chloroform	Merck
Chlortetracyclin	Sigma
Complete Supplement Mixture (CSM)	Bio 101
Difco Pepton	Difco
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
dNTPs	Roth, MBI Fermentas
EDTA	AppliChem
Ethanol absolut	Merck
Ethidiumbromidlösung 1%	Roth
Gamborg's B5-Medium	Sigma
Glucose	Roth
Harnstoff	Roth
Heringssperma-DNA (HSP)	Boehringer Mannheim
Hydroxyethyl-Cellulose	Fluka
Hygromycin	Duchefa
IPTG	BioTech Trade
Kaliumacetat (KAc)	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Roth
Kanamycin	Sigma
Leupeptin	Sigma
Lithiumacetat (LiAc)	Sigma
Magnesiumchlorid	AppliChem
Milchpulver	Glücksklee
Murashige & Skoog-Medium	Duchefa
Natriumdodecylsulfat (SDS)	GIBCO BRL Life Technol.
o-Nitrophenyl β -D-Galactopyranosid (oNPG)	Sigma
Pepstatin A	Sigma
Pepton	Roth
Phenol	AppliChem/Roth
Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid (PMSF)	Sigma

Polyethylenglycol (PEG) 4000	Fluka
Röntgenfilm Entwickler LX24	Kodak
Röntgenfilm Fixierer AL4	Kodak
Rotiphorese Gel 30 (30 % PAA)	Roth
Rotiphorese Gel 40 (40 % PAA)	Roth
Select Agar	GIBCO BRL Life Technol.
Select Yeast Extract	GIBCO BRL Life Technol.
Sephadex G-50	Pharmacia
β -Mercaptoethanol	Roth
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamidin)	Roth
Thiamin-HCl	Sigma
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Roth
Triton X-100	Roth
Trypton	Oxoid
TWEEN 20	Sigma
X-Gal	BioTech Trade
Yeast Nitrogen Base without amino acids	Difco
α -Naphthalinessigsäure (NAA)	Sigma

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

3.10 Radiochemikalien

Für die in dieser Arbeit dargestellten Experimente wurde [α - 32 P] dATP mit der spezifischen Aktivität von 800 Ci/mmol, sowie [γ - 33 P] ATP mit der spezifischen Aktivität von 3000 Ci/mmol verwendet. Für die radioaktive Markierung von Proteinen wurde 35 S-Methionin mit einer spezifischen Aktivität von 1000 Ci/mmol benutzt.

2.11 Kits

Kit	Hersteller
BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin-Elmer
DNeasy Mini Kit	Qiagen
Enhanced Chemiluminescence Kit ECL™	Amersham
Oligotex™	Qiagen
pGEM®-T Vector System	Promega
Plasmid-Preparation Kit (Midi, Maxi)	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Rabbit Reticulocyte Lysate System	Promega
Rneasy Plant Mini Kit	Qiagen
SMART™ RACE cDNA Amplification Kit	Clontech
T7 Transcription Kit	MBI Fermentas
T-cloning Kit	MBI Fermentas
Universal GenomeWalker™ Kit	Clontech

2.12 Enzyme

Enzym	Hersteller
Advantage cDNA Polymerase Mix (50 X)	Clontech
Advantage Genomic Polymerase Mix (50 X)	Clontech
Alkalische Phosphatase (CIAP)	MBI Fermentas
Cellulase „Onozuka R-10“	Serva
Klenow-DNA-Polymerase	MBI Fermentas
Klenow-DNA-Polymerase (exo ⁻)	MBI Fermentas
Lysozym	Serva
Lyticase	Sigma
Macerozym R-10	Serva
Proteinase K	MBI Fermentas
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, NEB
RNase A (DNase frei)	Qiagen
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas
Taq-Polymerase	Q-BIOGENE

3 Methoden

3.1 Bakterien- und Hefekulturen

3.1.1 Anzucht von *Escherichia coli*

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

3.1.2 Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens*

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

3.1.3 Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae* erfolgte bei 30 °C für drei bis fünf Tage.

3.2 Pflanzenkulturen

3.2.1 Kultivierung von Tabakpflanzen in Sterilkultur

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

3.2.2 Kultivierung von Tabakpflanzen in Erde

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

3.2.3 Anzucht und Kultivierung von Tabaksuspensionskulturen

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

3.3 Induktion von Tabak-Blattscheiben

Zur Induktion der Genexpression im Tabakblattgewebe wurden ca. 4-6 Wochen alte in Erde kultivierte Tabakpflanzen verwendet. Für die Induktionsversuche wurden Blattscheiben (\varnothing 2,6 cm) mit einem Korkbohrer ausgestochen. Alle Induktionssubstanzen waren in 50 mM Kaliumphosphat bei einem pH-Wert von 5,8 gepuffert. Die Induktionschemikalien wurden unmittelbar vor dem Start des Versuches zugesetzt. Die Induktion des Blattgewebes erfolgte in Petrischalen und wurde durch Zugabe des Puffers mit der Induktionssubstanz gestartet. Die entnommenen Proben wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.4 Epinastie-Test

Ein einfacher Test, um die Reaktion einer Pflanze auf externe Auxingaben zu untersuchen, ist ein Test, der die epinastische Krümmung von Tabakstreifen in Medium mit und ohne Auxin untersucht (Keller und Van Volkenburgh, 1997). Dazu werden $10 \times 1,5$ mm große Streifen parallel zu den sekundären Blattadern mit einer Rasierklinge aus den Blättern ausgeschnitten und in Epinastie-Puffer (10 mM Saccharose, 10 mM KCl, 0,5 mM MES/Bis-Tris-Propan; pH 6,0) ohne oder mit Zugabe von $10\text{ }\mu\text{M}$ NAA für 24 h inkubiert. Das Auxin bewirkt ein Streckungswachstum der Oberflächen des Blattstreifens, die Krümmung beruht auf einem stärkeren Streckung der adaxialen Seite. Die Krümmung ist daher ein Maß für die Auxinsuszeptibilität der Zellen.

3.5 Molekulargenetische Methoden

3.5.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Bei der Mini-Lyse handelt es sich um eine schnelle Methode zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen. Die Methode folgt den Protokollen von Le Guillou *et al.* (1994) und Sambrook *et al.* (1989). Hierzu wurden die plasmidtragenden Zellen über Nacht in 5 ml selektivem dYT-Medium angezogen. Nach Zentrifugation (13000 rpm, 1 min, RT) wurden die Zellen in 100 μl Lösung I (50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris/HCl, pH 8,0) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 200 μl Lösung II (0,2 M NaOH, 1 % (w/v) SDS) und 200 μl Chloroform lysiert. Durch sofortiges vorsichtiges Schwenken erfolgte die Vermischung der Zusätze und die vollständige Lyse der gesamten Zellsuspension. Direkt danach wurden 150 μl eiskalte Lösung III (3 M Kaliumacetat, 5 % (v/v) Ameisensäure) hinzugefügt. Durch sofortiges Schwenken wurde eine schlagartige Neutralisierung der Suspension erzielt, die der effizienten Fällung chromosomaler DNA diene. Nach Zentrifugation (13000 rpm, 2 min, RT) wurde der Überstand mit 450 μl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1, v/v) versetzt und extrahiert. Zur Abtrennung der proteinhaltigen organischen Phase wurde 3 min zentrifugiert (13000 rpm, RT). Der wässrige Überstand mit der Plasmid-DNA wurde mit 900 μl 96 % Ethanol gefällt und mittels Zentrifugation (10 min, 13000 rpm, RT) pelletiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und nach kurzem Trocknen bei RT in 50 μl H_2O resuspendiert.

3.5.2 Qiaprep

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

3.5.3 Phenol-Chloroform Extraktion

Zur Aufreinigung von Nukleinsäurelösungen von Protein-Verschmutzungen, wurde die Phenol-Chloroform Extraktion benutzt. Dabei wird die Nukleinsäurelösung nacheinander mit einem Volumen Phenol, mit einem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1, v/v) und einem Volumen Chloroform ausgeschüttelt. Dazwischen wird jeweils zentrifugiert und die obere wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt. Die Proteine werden denaturiert und sammeln sich in der organischen Phase und in der Grenzschicht an. Die Nukleinsäuren können aus der wässrigen Phase durch eine Alkoholfällung isoliert werden.

3.5.4 Ethanolfällung von DNA aus wässrigen Lösungen

Um DNA aus wässrigen Lösungen von Salzen zu reinigen und um eine definierte Konzentration zu erreichen, wurde sie einer Ethanolfällung unterzogen. Dabei wurde der DNA-Lösung 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5,2 zugegeben und mit zwei Volumen 100 % Ethanol gemischt. Die DNA fällt aus, während Salze und Verunreinigungen gelöst bleiben. Die Fällung erfolgte bei -20 °C für mindestens zwei Stunden. Danach wurde die DNA für 20 Minuten bei 13.000 rpm pelletiert, mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in einem definierten Volumen H₂O gelöst.

3.5.5 Isolierung von DNA aus Tabak

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

3.5.6 Isolierung von RNA aus Tabak

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

3.5.7 *In vitro* Synthese von RNA

Für die *in vitro* Translation von Proteine benötigt man zunächst *in vitro* transkribierte RNA. Dazu werden zunächst die Ausgangsvektoren, die von der T7 RNA-Polymerase als Matritze erkannt werden, hier die pBluescript SK-Vektoren, per Restriktionsspaltung hinter dem zu transkribierenden Gen linearisiert. Es folgt die Transkription mit dem T7 Transkription Kit

der Firma MBI nach Anweisung, dazu wird 1 µg linearisierte DNA eingesetzt. Die RNA wird auf ihre Qualität in einem RNA-Gel überprüft.

3.5.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA in wässriger Lösung erfolgte photometrisch am GeneQuant II. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht einer Nukleinsäurekonzentration von 50 µg/ml dsDNA bzw. 40 µg/ml RNA bei einer Wellenlänge von 260 nm. Der Quotient der beiden Werte OD₂₆₀ : OD₂₈₀ stellt ein Maß für den Reinheitsgrad der Nukleinsäure dar. Zur Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA wurden 1:50 Verdünnungen gegen H₂O gemessen.

3.5.9 Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese (McDonell *et al.*, 1977; Southern, 1979) werden DNA-Moleküle nach ihrer Größe aufgetrennt. DNA ist aufgrund des Zucker-Phosphat-Rückgrats negativ geladen. Im elektrischen Feld wandert sie somit zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist um so größer, je kleiner die DNA-Moleküle sind. Die Geschwindigkeit hängt nicht von der Basensequenz, sondern von der Konformation ab. So weist circuläre DNA ein anderes Wanderungsverhalten auf als lineare DNA mit dem gleichen Molekulargewicht. Als Gelmatrix dient Agarose. Der Trennbereich ist abhängig von der Agarosekonzentration, da sie die Porengröße beeinflusst. Diese Poren verlangsamen die Wanderungsgeschwindigkeit der großen Moleküle, während niedermolekulare Substanzen die Matrix frei passieren können. Je höher die Agarosekonzentration, desto kleiner die Poren, desto besser werden kleine Moleküle aufgetrennt. Die Zugabe von Hydroxyethylcellulose (HEC) kann hohe Agarosekonzentrationen ersetzen. Zur Auftrennung großer Fragmente wird ein 0,7 %iges Gel benutzt. Kleine Fragmente, wie PCR-Produkte, werden in Gelen aufgetrennt, die 1 % Agarose und 0,7 % HEC enthalten.

Als DNA-Probenpuffer wurde 67 % (w/v) Saccharose, 50 mM EDTA, 0,42 % (w/v) Bromphenolblau, 0,42 % (w/v) Xylencyanol verwendet. Nach Beendigung des Gellaufs wurden die DNA-Moleküle durch 5 min Färben in einer Ethidiumbromidlösung (0,1 % (w/v)) und 5 min Wässern sichtbar gemacht. Dabei lagert sich Ethidiumbromid als interkalierendes Agens in die DNA ein. Die fluoreszierenden DNA-Fragmente können so auf dem Transilluminator unter kurzwelligem UV-Licht ($\lambda = 302 \text{ nm}$) betrachtet und fotografisch dokumentiert werden.

3.5.10 Auftrennung von RNA in denaturierenden Agarosegelen

RNA-Moleküle können durch Rückfaltung ihr Laufverhalten im Agarosegel erheblich verändern. Um eine größenabhängige Auftrennung zu gewährleisten, unterzieht man sie einer denaturierenden Agarosegelelektrophorese unter Verwendung von Formaldehyd und Formamid. Ein denaturierendes RNA-Gel wird hergestellt, indem man 1,4 g Agarose in 105 ml H₂O aufkocht und unter Rühren auf ca. 60 °C abkühlen läßt. Dann gibt man 14 ml 10 x MEN-Puffer (200 mM MOPS, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA; pH 7,0 mit NaOH) und 21 ml 37 % Formaldehyd hinzu. Der Laufpuffer besteht aus 1 x MEN. Die RNA-Proben wurden in Eppendorfgefäßen mit H₂O auf gleiche Konzentration zu einem Endvolumen von 30 µl aufgefüllt und mit 30 µl 2 x Denaturierungspuffer (20 % (v/v) MEN, 8 % (v/v) Glycerin, 56,7 % (v/v) Formamid, 5 % (v/v) Formaldehyd, 0,001 % (w/v) Bromphenolblau,

0,1 % (w/v) Ethidiumbromid, 4 mM EDTA pH 7,5) versetzt. Das Denaturieren der RNA-Proben erfolgte für 15 min bei 65 °C, bis zum Auftragen wurden diese auf Eis gelagert.

3.5.11 Restriktionsspaltung von DNA

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

3.5.12 Dephosphorylierung von DNA-Enden

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

3.5.13 Klenow-„fill-in“

Das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I besitzt eine 5'-3'-Polymerase und eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität. Es kann bei Vorhandensein eines DNA-Matrizenstranges die komplementäre Polymerisation von Nukleotiden an eine freie 3'-OH-Gruppe katalysieren. Diese Reaktion wurde verwendet, um nach Restriktionsspaltungen überstehende 5'-DNA-Enden aufzufüllen. Für eine Klenow-„fill-in“-Reaktion wurden 2 µg gespaltenes Plasmid, 1,5 mM dNTP-Mix und 2 U Klenow-DNA-Polymerase eingesetzt (10x Puffer: 500 mM Tris/HCl, pH 8,0, 50 mM MgCl₂, 10mM DTT) der Ansatz wurde für 15 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch 10 min Erhitzen auf 75 °C abgestoppt.

3.5.14 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Nach 10 min Kochen der komplementären Oligonukleotide zur Auflösung von Sekundärstrukturen erfolgt das Anlagern der komplementären Oligonukleotide durch langsames Senken der Temperatur. Die Temperatur wird jeweils in 15 min Inkubationsschritten von 65 °C, auf 37 °C, auf RT bis schließlich auf 4 °C herabgesetzt

3.5.15 Ligation von DNA-Fragmenten

Das Enzym T4-DNA-Ligase ist in der Lage, DNA-Fragmente mit überstehenden komplementären bzw. glatten Enden miteinander kovalent zu verknüpfen, sofern eines der beiden Fragmente eine endständige 5'-Phosphatgruppe trägt. Als Cosubstrat muß ATP in geeigneter Konzentration im Puffermedium vorliegen. Das zu inserierende DNA-Fragment wurde in 10-fachem molaren Überschuß zu der gespaltenen Vektor-DNA (ca. 50 fmol)

zugegeben. Die Ligation erfolgte im Ligationspuffer (40 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,5 mM ATP, pH 7, 8) mit 3 Units T4-DNA-Ligase. Bei „blunt-end“ Ligationen wurde zusätzlich 5 % (w/v) PEG 4000 in den Reaktionsansatz gegeben. Die Ligrationsansätze mit einem Endvolumen von 15 µl wurden für mindestens 1 h bei RT inkubiert.

3.5.16 Isolierung unbekannter cDNA-Abschnitte

Um die 5' Bereiche des BZI-3 und BZI-4 Klons zu isolieren, wurde eine 5'-RACE (5'-Rapid Amplification of cDNA Ends) durchgeführt. Dazu wurde das SMART™ RACE cDNA Amplification Kit der Firma Clontech nach der im User Manual beschriebenen Anweisung (Clontech 1999) benutzt.

3.5.17 Isolierung unbekannter genomischer DNA-Abschnitte

Für die Isolierung unbekannter genomischer DNA-Fragmente, die sich an eine bekannte Sequenz anschließen, im Rahmen dieser Arbeit die Isolierung eines BZI-4 Promotorabschnitts, wurde die Methode der Rapid Amplification of Genomic Ends (RAGE) nach Siebert *et al.*, (1995) benutzt. Dazu wurde das Universal GenomeWalker™ Kit der Firma Clontech nach Anleitung verwendet (Clontech, 2000).

3.5.18 Radioaktive Markierung von DNA

3.5.18.1 End-Markierung durch die Polynukleotidkinase

Für die radioaktive Markierung von Oligonukleotiden wird das Enzym Polynukleotidkinase verwendet. Die PNK überträgt das γ -ständige radioaktive Phosphat (P³²) auf das synthetische Oligonukleotid. Der Reaktionsansatz enthält: 2 pmol Oligonukleotide, 10x Kinase-Puffer für die „forward reaction“ (MBI), 10 U T4-Polynukleotidkinase und 25 µCi γ -[P³²]ATP (Hartmann SCP-401 in einem Reaktionsvolumen von 10 µl. Der Ansatz wird 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die komplementären Oligonukleotide, wie unter 2.3.4 beschrieben, hybridisiert, eingesetzt werden je 1 nmol der Oligonukleotide in einem Reaktionsvolumen von 20 µl. Das radioaktiv markierte Fragment wird nun mittels Gelfiltration über Micro Spin™ G25 Column der Firma Pharmacia über eine Sephadexmatrix aufgereinigt. Nach der Aufreinigung wird das Fragment auf ein Volumen von 600-800 µl verdünnt und je Ansatz 4 µl (ca. 25 fmol mit 200-300 cpm) eingesetzt.

3.5.18.2 Markierung durch die Klenow-Polymerase

Für die Herstellung radioaktiv markierter Hybridisierungs sonden wird ein DNA-Fragment nach Restriktionsspaltung aus einem Agarosegel eluiert. Die Markierungsreaktion erfolgt nach der Random-Prime-Labeling-Methode nach Feinberg und Vogelstein (1983), bei der Hexanukleotide zufälliger Sequenz an die Matrizen-DNA binden: Die angelagerten Hexanukleotide dienen 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 Exonukleaseaktivität (exo⁻) mehr besitzt. Die Markierungsreaktion wird mit Hilfe des Megaprime™ DNA labelling system Kits von

Amersham Pharmacia vorgenommen. Die Durchführung erfolgt nach dem Protokoll des Herstellers.

3.5.19 Polymerase Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion ("polymerase chain reaction", PCR, Mullis und Faloona, (1987)) können unter Verwendung zweier gegenläufiger Primer spezifische Sequenzen eines DNA-Templates mittels einer DNA-Polymerase selektiv amplifiziert werden. Die als Matrize dienende Template-DNA wird zunächst denaturiert. Nach der Anlagerung der Primer an die komplementären Sequenzen der DNA-Einzelstränge synthetisiert die hitzestabile *Taq*-DNA-Polymerase in einer Primer-Verlängerungsreaktion komplementäre DNA-Stränge an der DNA-Matrize. Dieser Zyklus aus Denaturierung, Primeranlagerung (Annealing) und DNA-Synthese (Elongation) wird 25-35 mal wiederholt. Ein Standard-Ansatz enthält Matrizen-DNA (10 ng), je 10 pmol der Primer, dNTPs (0,2 mM je Nukleotid) und 2,5 u *Taq*-Polymerase in *Taq*-Puffer (10X: 100 mM Tris-HCl, pH 8,8; 500 mM KCl; 0,8% Nonidet P40; 15 mM MgCl₂). Die Amplifikation wird in einem Thermocycler mit folgendem Beispiel-Programm vorgenommen:

	Erste Denaturierung	4 min	94°C	
25-35 Zyklen	Denaturierung	1 min	94°C	
	Annealing	30 s	50-72°C	(Primer T _m)
	Elongation	1 min/kb	72°C	
	Finale Elongation	10 min	2°C	

3.5.20 Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgt mit Hilfe des BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits von Perkin Elmer. Das Prinzip der Sequenzierung beruht auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.*, (1977). Hier befindet sich in einem Ansatz zur Amplifikation der DNA nur ein Primer, wodurch diese linear abläuft. Neben den 4 Desoxynukleotiden befinden sich auch vier mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Didesoxynukleotide zur Termination der Polymerisation in dem Ansatz. Die durch die Amplifikation entstehenden, unterschiedlich großen und markierten Fragmente können nun mit Hilfe des Analysegerätes (Kapillarsequencer ABI Prism 310 von Applied Biosystems) über eine Kapillarmatrix aufgetrennt und detektiert werden.

Für die Reaktion der linearen PCR werden 170 fmol Plasmid-DNA, 5 pmol Primer und 2 µl RR-Mix in einem Endvolumen von 10 µl eingesetzt. Die Reaktion im Thermocycler besteht aus 25 Zyklen mit 10 s Denaturierung bei 95 °C, 5 s Annealing bei 50 °C und 4 min bei 60 °C Elongation. Die Fragmente werden durch eine Ethanol-Fällung von den nicht eingebauten Nukleotiden abgetrennt und in TSR (Template Suppression Reagent, Perkin Elmer) aufgenommen. Nach dem Denaturieren können sie in das Analysegerät appliziert werden. Die gewonnenen Rohdaten werden mit Hilfe des Chromas-Programms ausgewertet.

3.5.21 Herstellung und Transformation kompetenter *Escherichia coli*

3.5.21.1 Herstellung kompetenter *Escherichia coli*

Für die Herstellung kompetenter Zellen nach einer modifizierten Methode von Inoue *et al.* (1990) wurden Bakterien des *E. coli*-Stammes DH5 α verwendet. 0,8 ml einer Übernachtskultur wurden in 40 ml LB-Medium überimpft. Die Anzucht der Kultur erfolgte bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5. Jeweils 10 ml der Kultur wurden in Greiner-Röhrchen überführt und abzentrifugiert (5 min, 6000 x g, 4 °C). Das Pellet wurde in 5 ml 50 mM CaCl₂ (4 °C) resuspendiert, für 30 min auf Eis inkubiert und abzentrifugiert (5 min, 6000 x g, 4 °C). Die Zellen wurden in 2 ml 50 mM CaCl₂ (4 °C) und 0,4 ml 87 % Glycerin aufgenommen und nach aliquotieren (je 200 μ l) in Eppendorfgläsern in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aufbewahrung erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C.

3.5.21.2 Transformation von *Escherichia coli*

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

3.5.22 Herstellung und Transformation kompetenter Agrobakterien

3.5.22.1 Herstellung kompetenter Agrobakterien

Für die Herstellung kompetenter Zellen wurden Agrobakterien des Stammes LBA 4404 verwendet. 5 ml einer Agrobakterienflüssigkultur wurden abzentrifugiert (5 min, 5000 rpm, RT) und dreimal durch Resuspendieren und erneutes Abzentrifugieren in sterilem Wasser gewaschen. Das Pellet wurde in 500 μ l sterilem Wasser aufgenommen und in 100 μ l Aliquots in flüssigem N₂ eingefroren.

3.5.22.2 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. Nach der Zugabe der zu transformierenden DNA zu den kompetenten Zellen wurde der Transformationsansatz in sterile Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand: 2 mm) überführt. Die Elektroporation erfolgte am GenePulser mit 2,5 kV, 25 μ F, 400 Ω . Der Transformationsansatz wurde anschließend in ein Eppendorfgläs überführt und mit 1 ml LB-Medium aufgefüllt. Die Regeneration der Agrobakterien erfolgte für 2 h bei 28 °C, danach wurden sie auf YEB-Selektionsmedium ausplattiert.

3.5.23 Arbeiten mit Hefe

3.5.23.1 Herstellung und Transformation kompetenter Hefezellen

Die Kompetenz von Hefezellen zur DNA-Aufnahme läßt sich durch das Alkalimetallion Li^+ induzieren. Dabei ist desweiteren PEG erforderlich. Wahrscheinlich kommt es zu Spannungsänderungen an der Membran durch Wechselwirkungen zwischen dem negativ geladenen PEG, dem monovalenten Ion Li^+ und der Zelloberfläche. Die höchste Transformationseffizienz läßt sich in Zellen erreichen, die sich in der Mitte der logarithmischen Wachstumsphase befinden (Ito *et al.*, 1983). Durch Zugabe von DMSO (Hill *et al.*, 1991) läßt sich die Transformationseffizienz deutlich steigern. Die Herstellung und Transformation kompetenter Hefezellen erfolgte wie im Clontech Yeast Protocols Handbook (1996) beschrieben.

3.5.23.2 Durchführung eines Hefe Screens

Um Proteininteraktionspartner von BZI-1 zu isolieren, wurde ein Hefescreen mit einer Tabak-Blatt cDNA-Bank durchgeführt. Die Herstellung und Transformation der kompetenten Hefezellen, die das Bait (Köder)-plasmid enthielten erfolgte wie im Clontech Yeast Protocols Handbook (1996) beschrieben. Die Hefezellen wurden mit dem pGAD-cDNA-Fusionsplasmid transformiert. Die Selektion erfolgte wie im Clontech Yeast Protocols Handbook (1996) beschrieben.

3.5.24 Blau-Weiß-Selektion

Eine wesentliche Erleichterung zur Identifizierung von *E. coli*-Kolonien, welche nach Transformation ein rekombinantes Plasmid tragen, bietet die Blau-Weiß-Selektion. Sie wird z. B. bei der Klonierung von PCR-Produkten mit den Vektoren pUC57-T oder pGEM-T eingesetzt. Das Verfahren beruht auf der α -Komplementation des Enzyms β -Galaktosidase. Die ersten 146 N-terminalen Aminosäuren (α -Peptid) können zusammen mit einem inaktiven Enzym, dem die Aminosäuren 11-41 fehlen, eine funktionierende β -Galaktosidase bilden. Das aktive Enzym hydrolysiert z.B. das Substrat X-Gal, das daraufhin durch Luftoxidation eine blaue Färbung zeigt. Bakterienstämme mit dem inaktiven Enzym können durch Aufnahme eines Plasmids, das die für das α -Peptid codierende DNA trägt, X-Gal umsetzen. Als Induktor der Genexpression wurde IPTG eingesetzt. Die zur Blau-Weiß-Selektion eingesetzten Agarplatten wurden kurz vor Gebrauch mit jeweils 50 μl der X-Gal und der IPTG-Stammlösungen beschichtet. Wird die das α -Peptid codierende Sequenz durch Einbau von fremder DNA unterbrochen, so bleiben die Bakterienkolonien weiß. Bakterienklone, die kein rekombinantes Plasmid aufgenommen haben und somit das α -Peptid synthetisieren, sind an ihrer Blaufärbung zu erkennen.

3.5.25 Northern Blot Analyse

Im Northern Blot Verfahren (Sambrock *et al.*, 1989) wird die zu analysierende RNA durch eine denaturierende Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und mittels Kapillar-Blot auf eine Nylonmembran transferiert. Bei allen in dieser Arbeit gezeigten Northern Blot Analysen

wurden jeweils 10-15 µg RNA eingesetzt. Die auf der Membran immobilisierte RNA kann nun durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden analysiert werden.

3.5.25.1 Transfer der RNA auf Nylonmembran

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

3.5.25.2 Hybridisierung der Northern Blot Membran

Durch Behandlung 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. Bei einer detektierbaren Strahlung auf dem Filter von ca. 100 cps ist der Filter auswertbar. Die Methode ist modifiziert nach Church und Gilbert, (1984). Die zu analysierende Membran wird in einer Hybridisierungsröhre 30 min bei 65 °C in einer Hybridisierungslösung (0,5 M Na-Phosphatpuffer, 1mM EDTA, 7 % SDS) inkubiert. Die Sonden-DNA wird 10 min bei 100 °C denaturiert und 5 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe der Sonden-DNA zu ca. 10 ml Hybridisierungslösung in der Hybridisierungsröhre erfolgt die Hybridisierung bei 65 °C ü.N. im Roller. Zur Abtrennung unspezifisch gebundener Sonden-DNA wird die Membran zweimal mit 2 x SSC (20x SSC: M NaCl, 0,3 M Na-Citrat) / 0,1% SDS und einmal mit 1x SSC/0,1% SDS und optional mit 0,5x SSC/0,1% SDS für 15' – 30 min gewaschen. 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. 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.

3.5.25.3 Rehybridisierung

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

3.5.26 Transformation von *Nicotiana tabacum*

3.5.26.1 Stabile Transformation von *Nicotiana tabacum*

Sämtliche im Rahmen dieser Arbeit erstellten transgenen Pflanzen entstanden mit Hilfe des *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Gentransfers. Eine Pflanze bildet bei Befall mit dem Bodenbakterium *Agrobacterium tumefaciens* Tumore, die sogenannten Wurzelhalsgallen. *A. tumefaciens* besitzt durch sein Ti-Plasmid (Tumor-induzierendes Plasmid) die Fähigkeit, eigenes genetisches Material (Transfer-DNA, T-DNA) in verletzte Pflanzenzellen zu transferieren und in deren Genom einzubauen. Die T-DNA wird durch zwei „border“-Sequenzen begrenzt. Nur die zwischen den border-Sequenzen liegende DNA wird ins Pflanzengenom transferiert. Durch die auf der T-DNA lokalisierten Gene produziert die Pflanzenzelle Phytohormone, die ein tumorartiges Wachstum des Gewebes hervorrufen, sowie Opine, die von den Agrobakterien als N- und C-Quelle genutzt werden. Durch bestimmte Veränderungen dieses Gentransfersystems ist es nun möglich, mit Hilfe von Agrobakterien Pflanzenzellen gezielt mit ausgewählten Genen zu transformieren. Dabei bedient man sich heute des binären Vektorsystems (Hoekema *et al.*, 1984). Die für den DNA-Transfer notwendigen Funktionen werden auf zwei Plasmide getrennt. Der gesamte T-DNA-Bereich des Ti-Plasmids wurde deletiert - damit ist es nicht mehr tumorinduzierend -, besitzt aber weiterhin die Fähigkeit, T-DNA in die Pflanze zu transferieren. Die *vir*-(Virulenz) Funktion liegt in dem verwendeten Stamm LBA 4404 auf dem Plasmid pAL4404. Eine modifizierte T-DNA wird auf einem kleinen zweiten Plasmid zur Verfügung gestellt. Dabei kann die DNA zwischen den border-Sequenzen durch Fremdgene mit einem Selektionsmarker (z.B. Resistenz gegen die Antibiotika Hygromycin oder Kanamycin) ausgetauscht werden. Durch Infektion von Pflanzengewebe mit diesen gentechnisch veränderten Agrobakterien kann man einzelne transgene Pflanzenzellen erzeugen, die sich unter geeigneten Hormonbedingungen zunächst zu Kallusgewebe und schließlich zu neuen Pflanzensprossen entwickeln. Durch Regeneration auf antibiotikahaltigem Medium ist eine Selektion der transformierten Pflanzenzellen durch den Selektionsmarker auf der modifizierten T-DNA möglich.

Für die Transformation werden Blätter von in Sterilkultur gewachsenen Pflanzen verwendet. Die Mittelrippe wird entfernt und die Blätter in 2 cm² große Stücke zerteilt. Die Blattstücke werden mit 200 - 400 µl einer 2 Tage-Kultur der Agrobakterien im Dunklen bei RT in B5-Infektionsmedium kokultiviert. Nach 3 Tagen werden die Blattstückchen mit sterilem H₂O gründlich gewaschen und auf sterilem Filterpapier getrocknet. Die Blattscheiben werden anschließend auf das Pflanzenmedium mit Hormonen (1mg/l 6-Benzylaminpurin und 0,1 mg/l 1-Naphtyllessigsäure) zur Sprossbildung in Petrischalen ausgebracht. Zur Selektion der transgenen Zellen ist dem Medium Hygromycin zugesetzt. Das Wachstum der Agrobakterien wird durch Cefotaxim unterdrückt. Nach gelungener Sprossbildung werden die Sprosse auf hormonfreies MS-Selektionsmedium überführt und weiterkultiviert.

3.5.26.2 Transformation von BY-2 Tabakzellsuspensionsprotoplasten

Die Tabakzellen können drei Tage nach der Subkultivierung in frischem Medium benutzt werden. Zur Protoplastierung der Zellen werden 20 ml der Suspensionskultur in ein 50 ml Falconröhrchen überführt, und bei 400 x g für 5 min vorsichtig (Soft Start) pelletiert. Die Zellen werden sehr vorsichtig im Rücklauf resuspendiert und mit Osmotikum (0,5 % BSA, 0,01 % β-Mercaptoethanol, 0,05 M CaCl₂, 0,01 M Na-Acetat, 0,25 M Mannitol, pH 5,8) gewaschen. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt werden die Zellen in 40 ml

Enzymlyösung (Osmotikum mit zusätzlich 1 % Cellulase, 0,5 % Maceroenzym und 0,1 % Pectinase) aufgenommen und in drei Petrischalen über Nacht im Dunkeln inkubiert.

Für die Transformation werden die Protoplasten bei 100 x g für 5 min zentrifugiert und in Osmotikum gewaschen, erneut zentrifugiert und in 10 ml W5 Medium aufgenommen, erneut zentrifugiert und in 5 ml W5 Medium aufgenommen. Dann werden die Ansätze vereinigt und die Anzahl der Protoplasten in einer Zählkammer bestimmt. Die Protoplasten werden dann für eine Stunde im Dunkeln inkubiert, abzentrifugiert und in MMM-Lösung (1 mM MgCl₂, 0,1 % MES, 0,5 M Mannitol; pH 5,8) aufgenommen, so daß eine Endkonzentration von 2 x 10⁶ Protoplasten pro ml resultiert.

Für die Transformation wird die DNA in Gewebekulturröhrchen vorgelegt, mit einer abgeschnittenen blauen Spitze werden dann 300 µl Protoplasten auf die DNA pipettiert und sorgfältig vermischt. Die Zugabe von 300 µl PEG-Lösung (40 % PEG 4000, 0,4 M Mannitol, 0,1 M Ca(NO₃)₂; pH 8) ermöglicht die Aufnahme der DNA in die Zellen. Nach 20 min wird dieser Vorgang durch die Zugabe von 10 ml W5 Medium gestoppt. Nach Pelletierung (100 x g/5 min) wird das Pellet in 700 µl MSF-Medium (1x MS-Salze, 100 mg/l myo-Inositol, 1 mg/l Thiamin, 0,2 mg/l 2,4-D, 2mg/l KH₂PO₄, 0,4 M Saccharose) aufgenommen und 20 h bei 20°C im Dunkeln inkubiert.

3.5.27 Gelretardationsanalysen (GRA)

DNA-Fragmente, an die Proteine gebunden sind, zeigen in einem nativen Polyacrylamidgel ein anderes Laufverhalten als ungebundene DNA. Der DNA-Proteinkomplex wandert aufgrund seines höheren Molekulargewichts langsamer, verglichen mit einem proteinfreien Fragment. Diese Verzögerung wird auch als "Shift" bezeichnet. Man kann sich dieses Phänomen zunutze machen um spezifische Bindungen von Proteinen an DNA-Fragmente zu charakterisieren. Hierzu wird das Fragment radioaktiv markiert und in einem geeigneten Puffer mit einem Proteinextrakt inkubiert. Nach abgeschlossener Elektrophorese kann das Gel getrocknet werden und eine Autoradiographie vorgenommen werden um das Bandenmuster auszuwerten. Die Bindereaktion eines Ansatztes erfolgt in einem Volumen von 20 µl. Dieses setzt sich zusammen aus 4 µl Puffer F+ (20 % Ficoll 40, 100 mM Hepes pH 7,9; 300 mM KCl, 10 mM DTT, 0,1 % PMSF), 2 µl Puffer D (20 mM Hepes, pH 7,9, 20 % Glycerin, 100 mM KCl, 0,5 mM EDTA, 0,25 % NP40, 2 mM DTT, 0,1 % PMSF), 4 µl radioaktiv markierten Oligonukleotiden (25 fmol), 2 µl pdIdC (1 µg/µl), 2 µl rekombinantes Protein oder 6 µl Proteinextrakt und H₂O, wobei das Proteinvolumen gegebenenfalls mit BSA (1mg/ml) abgeglichen wird. Die Bindereaktion erfolgt 30' bei RT und die Proben werden auf das native PAGE-Gel (10 ml 30 % PAA-Mix, 60 ml H₂O, 3,5 ml 10x TBE, 400 µl APS, 40 µl TEMED) aufgetragen. Als Laufpuffer dient 0,5 x TBE. Zur Kontrolle des Gellaufes wird die Spur des freien Fragmentes mit BPB-Mix versetzt. Die Elektrophorese erfolgt bis die BPB-Bande ca. 4/5 des Gels durchlaufen hat. Zur Detektion wird das Gel auf einem Geltdrockner 45' bei 80 °C unter Unterdruck getrocknet und mit Hilfe eines IP-Screens und des Bioimagers (BAS-1000 von Fuji) und der Programme PCBAS[®] 2.09 und TINA[®] 2.0 der Firma Raytest ausgewertet.

3.5.28 Chromatin-Immunoprecipitation

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

3.5.28.1 Chromatinpräparation

Zur Gewinnung der Kerne, die benötigt werden, um das Chromatin zu isolieren werden die Versuchspflanzen zunächst für 24 h ins Dunkel gestellt, um die Stärke zu mobilisieren. Zur Kreuzvernetzung der DNA-Proteinkomplexe (Solomon und Varshavsky, 1985; Solomon *et al.*, 1988) werden je 10 g Blattmaterial in Einmachgläser überführt und mit Crosslinkingpuffer (50 mM Kaliumphosphatpuffer, 1 Prozent Formaldehyd) überschichtet. Dann wird ein Vakuum angelegt, bis die Blätter mit dem Crosslinkingpuffer vollgesogen sind. Für 10 min wird bei Raumtemperatur inkubiert, dann werden die Blätter nacheinander 3x min in eiskalter 0,3 M Glycinlösung und dann 3x in 1x TBS gewaschen. Die Blätter werden dann trockengetupft und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Von jetzt an alle Schritte auf Eis durchführen.

Die Isolation der Kerne erfolgt wie von Robinson und Hinz (2001) beschrieben, zur Isolierung des Chromatins verfährt man wie bei Johnson *et al.* (2001) beschrieben.

3.5.28.2 Immunoprecipitation

Die Chromatin-Proteinkomplexe werden nun für die Immunopräzipitation eingesetzt. Dazu verfährt man wie bei Johnson *et al.* (2001) beschrieben. Die Waschschritte wurden verkürzt, es wurde nur mit NLB mit SDS und TBS jeweils 2 mal gewaschen. Nach der Behandlung mit RNase und Proteinase K erfolgt ein 16 h Schritt bei 65°C. Er dient zur Reversion des durch das Formaldehyd vermittelte Kreuzvernetzen der DNA-Proteinkomplexe (Solomon und Varshavsky, 1985; Solomon *et al.*, 1988). Nachdem die DNA mit einer Phenol-Chloroformfällung aufgereinigt wurde, kann sie in einer PCR getestet werden.

3.6 Proteinchemische Methoden

3.6.1 Herstellung denaturierender Gesamtzellextrakte aus Pflanzen

Das Blattgewebe wird unter N₂ (liq.) aufgemörsert, 50 – 200 mg des Pulvers im gefrorenen Zustand in ein Eppendorfgefäß eingewogen, mit der dreifachen Menge (w/v) Harnstoffextraktionspuffer (4 M Harnstoff, 16,6 % (v/v) Glycerin, 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 5 % (w/v) SDS, 0,5 % (w/v) Bromphenolblau) aufgenommen, gevortext und bei 65 °C für 10 min inkubiert. Nach 5' Inkubation werden die Eppendorfgefäße mehrmals invertiert. Anschließend wird der Rohextrakt 15 min bei 15000 rpm und RT zentrifugiert um Zelltrümmer und DNA abzutrennen. $\frac{2}{3}$ Volumen des Überstandes werden in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Proteinextrakte werden bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C gelagert. Vor Auftragung in der SDS-PAGE werden sie 5 min bei 65 °C inkubiert. Die Proben können direkt auf das Gel appliziert werden.

3.6.2 Herstellung denaturierender Gesamtzellextrakte aus Hefe (Printen und Spargue, 1994)

Die OD₆₀₀ von 5 ml Übernachtskultur von Hefe wird bestimmt. Anschließend werden die Zellen auf Eis abzentrifugiert und mit eiskaltem Wasser gewaschen. Das Pellet wird bei -70 °C schockgefroren. Die OD-Einheiten der Zellen werden gemäß der Formel

$$\text{OD-Einheit} = \text{OD}_{600} \times \text{Kulturvolumen}$$

berechnet. Pro 7,5 OD-Einheiten erfolgt die Zugabe von 100 µl auf 60 °C erwärmten Cracking-Puffer (8M Harnstoff, 5% SDS, 40 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,1 mM EDTA, 0,4 mg/ml Bromphenolblau; je 1 ml frische Zugabe von 10 µl β-Mercaptoethanol, 70 µl Proteinase-Inhibitorlösung (0,1 mg/ml Pepstatin A, 0,03 mM Leupeptin, 0,37 mg/ml Aprotinin, 25 µl 0,2 M PMSF). Pro 7,5 OD-Einheiten werden 80 µl Glasperlen zugefügt, und der Ansatz für eine Minute kräftig gevortext. Nach Zentrifugation für 5 min bei 14000 rpm bei 4 °C wird der Überstand in ein Eppendorfgefäß überführt. Das Pellet wird mit den Glasperlen für 5 min gekocht, anschließend kräftig gevortext und erneut abzentrifugiert. Dann werden die Überstände vereinigt. Nach 3 min Abkochen können sie direkt auf ein SDS-Gel aufgetragen werden.

3.6.3 Isolierung von Proteinen aus Tabak-Kallussuspensionskulturen

Die Zellen werden mit 700 µl Lösung 2 (225 mM Mannitol, 225 mM Sorbitol, 1nM MES, 50 mM CaCl₂; pH ,8) vermischt und abzentrifugiert (400 x g/10 min), die Protoplasten werden im Rücklauf resuspendiert, in Eppendorfgefäße überführt und mit Lösung 2 auf einen Milliliter aufgefüllt. Dann werden die Zellen pelletiert (5000 rpm / 10 min) und der Überstand verworfen. Die Zellen werden in GUS Extraktionspuffer aufgenommen und durch zweimaliges Gefrieren in flüssigen Stickstoff aufgebrochen. Nach Zentrifugation für 20 min bei 15000 rpm werden die Proteingehalte des Überstandes ermittelt und die β-Glucoronidase (GUS)-Aktivität quantitativ bestimmt.

3.6.4 Western Blot Analyse

3.6.4.1 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'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) zugefügt. In dieser Arbeit wurden SDS-Gele verwendet, die sich aus einem Trenngel aus 10 % (w/v) Acrylamid/Bis (19:1), 0,4 M Tris/HCl pH 8,8, 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % (v/v) TEMED, 0,1 % (w/v) APS sowie einem Sammelgel aus 5 % (w/v) Acrylamid/Bis (19:1), 125 mM Tris/HCl pH 6,8, 0,1 % (w/v) SDS, 0,2 % (v/v) TEMED, 0,1 % (w/v) APS zusammensetzen. Nach Beladen der Taschen des Gels mit je 10 µl Proteinextrakt aus denaturierten Harnstoffextrakten erfolgte der Gellauf bei 20 mA für 2 h. Als Laufpuffer diente 25 mM Tris, 190 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS.

3.6.4.2 Proteintransfer auf PVDF-Membranen

Der Transfer der im SDS-Gel aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte mittels der „Semi-Dry-Blotting“-Methode (Kyhse-Andersen, 1984). Dazu wurden drei Lagen Fließpapier in Transferpuffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris, 20 % (v/v) Methanol, 0,01 % (w/v) SDS) angefeuchtet und auf die Blottingapparatur aufgelegt. Die PVDF-Membran wurde in Methanol aktiviert, mit Transferpuffer äquilibriert und luftblasenfrei auf die Schicht Fließpapier gelegt. Das PAA-Gel wurde auf dem Filter positioniert und mit drei Lagen in Transferpuffer äquilibriertem Fließpapier bedeckt. Der Elektrotransfer lief für 45 min bei 5 mA/cm² Filterfläche. Nach dem Transfer wurde der Filter kurz in TBS gewaschen und zwischen zwei Lagen Fließpapier getrocknet. Die Membran wurde vor der Weiterbehandlung wieder mit Methanol aktiviert.

3.6.4.3 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. Das Absättigen freier Stellen auf der Membran (Blocken) erfolgte durch 1 h Inkubation mit 5 % Milchpulver in TBST. Danach erfolgte für 2 h die Inkubation mit 5 % Milchpulver in TBST und Primärantikörper. Die Membran wurde 3 x 10 min mit 1 x TBST zum Entfernen von nicht gebundenem Antikörper gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte in 5 % Milchpulver in TBST für 1 h. Nichtgebundener Antikörper wurde wieder entfernt durch 5 x 5 min Waschen mit 1 x TBS. Das ECL-Substratmix wurde frisch aus den Lösungen 1 und 2 im Verhältnis 1:1 angesetzt, für eine Membran (9,5 x 6,5 cm) wurden 3 ml Substratmix benötigt. Die Membran wurde mit der Proteinseite nach oben auf ein Stück Haushaltsfolie gelegt, und mit dem Substratmix 1 min inkubiert. Überschüssiger Substratmix wurde abgeschüttet und die Membran in Haushaltsfolie eingeschlagen. Die Detektion der Chemilumineszenzsignale erfolgte durch Exposition eines Röntgenfilms, je nach Signalstärke für 15 s bis 10 min. Der Autoradiographiefilm wurde dann für 1-5 min entwickelt, kurz gewässert und 3 min fixiert.

3.6.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford, (1976) beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums bei der photometrischen Analyse von Coomassie Brilliant Blue G250 von 465 nm nach 595 nm nach Bindung an die Aminogruppen von Proteinen. Ein adäquates Volumen 0,5-5 µl wird in eine Vertiefung einer 96-well-Mikrotiterplatte vorgelegt und mit 1:4 mit H₂O verdünntem Bradford-Reagenz (Roth) auf 200 µl aufgefüllt. Nach 5' Inkubation bei RT wird die OD₅₉₅ mit Hilfe des Spektralphotometers (MRX Dynex Plate Reader) bestimmt. Die Proteinkonzentration kann mit Hilfe einer, mit einem BSA-Standard (0, 1, 4 und 8 µg) erstellten Eichgerade ermittelt werden.

3.6.6 Messung der β -Glucuronidase (GUS)-Aktivität

Die β -Glucuronidase (GUS) ist das Genprodukt des *gus*-Reportergens. Das Enzym GUS ist in der Lage β -Glucuronide in D-Glucuronsäuren und einen aglyconischen Rest zu spalten. Setzt man das künstliche Substrat 4-Methylumbeliferyl- β -D-Glucuronid (4-MUG) ein, so erhält man nach der Hydrolyse das fluoreszierende Molekül Methylumbeliferon (MU). Durch die Stärke der Fluoreszenz in den Ansätzen lässt sich die umgesetzte Menge MU quantifizieren und die Aktivität der GUS bestimmen. Die Anregung des MU erfolgt bei 360 nm, die Messung der Emission bei 460 nm. Dazu werden 100 μ l einer geeigneten Verdünnung der Gesamtzellextrakte in Gus-Ex-Puffer (50 mM Na-Phosphatpuffer, 10 mM EDTA, 0,1 % (v/v) Triton X 100, 0,1 % (v/v) Sarkosyl und 0,05 % (v/v) β -Mercaptoethanol) mit 100 μ l 4 mM MUG versetzt und in einer Mikrotiterplatte bei 37 °C inkubiert. Nach 30 min (T1) wird die Reaktion der einen Hälfte des Reaktionsansatzes durch Zugabe von 100 μ l GUS-Stoppuffer (0,2 M Na₂CO₃) abgestoppt. Nach weiterer Inkubation für 37 °C über einen definierten Zeitraum (T2), in der Regel 1 h, wird auch die Reaktion in der anderen Hälfte des Reaktionsansatzes abgestoppt. Die Quantifizierung der Fluoreszenz erfolgt im CytoFluor II Plate Reader. Als Standard wurden 50 pmol MU verwendet. Die GUS-Aktivität wurde nach folgender Formel berechnet:

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

A_{GUS} = GUS-Aktivität [pmolMU min⁻¹ mg⁻¹ Protein]

ΔF = Differenz der Fluoreszenz von T2 und T1

Δt = Zeitdifferenz zwischen T2 und T1

3.6.7 „Far Western“-Analyse

Das Köderprotein, hier 20 μ l nicht radioaktiv markiertes *in vitro* Translatat, wird mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western-Transfer auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Membran wird kurz getrocknet und dann mit der proteinbeladenen Seite nach innen in ein 50 ml Greiner-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend werden 25 ml Sättigungspuffer (20 mM Tris/HCl pH 7,5; 200 mM NaCl; 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 % Glycerin, 0,4 % Nonident-P40, 5 % Magermilchpulver) zugegeben. Es wird 1,5 h bei RT im Rollenmischer inkubiert. Dann werden 40 μ l ³⁵S-Methionin markiertes Zielprotein zugegeben. Es wird für 2 h bei RT im Rollenmischer inkubiert. Das nichtgebundene Zielprotein wurde durch dreimaliges Waschen mit TBS-T entfernt. Die Membran wird über Nacht auf einen IP-Screen aufgelegt und am nächsten Morgen wird das Signal im Phosphoimager detektiert.

3.6.8 *In vitro* Protein Translation

Die *in vitro* Translation erfolgt unter Verwendung von 0,5 μ g der *in vitro* transkribierten RNA mit dem Rabbit Reticulocyte Lysate System der Firma Promega nach Anweisung des Herstellers. Die Zell-Lysate aus Kaninchenreticulocyten weisen alle Komponenten auf, die für die Translation notwendig sind (Pelham und Jackson, 1976). Dabei können sowohl nicht radioaktiv markierte Proteine für Gelshifts, als auch mit ³⁵S-Methionin markierte Proteine für die Far-Western Analysen und auch für die Kontrolle des Translationserfolgs im SDS-PAGE synthetisiert werden.

3.6.9 oNPG-Test

Das *lacZ*-Reportergen kodiert für die β -Galaktosidase. Die β -Galaktosidase ist ein hydrolytisches Enzym, welches das Disaccharid Lactose in Glucose und Galaktose spaltet. Die β -Galactosidase kann auch chromogene Substratanaloga wie X-Gal oder oNPG umsetzen und ist somit ein geeignetes Reporterenzym. Der oNPG-Test erlaubt eine qualitative und quantitative Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität. Er beruht auf der Hydrolyse des Substrates oNPG unter Freisetzung des Farbstoffes o-Nitrophenol, der eine gelbe Färbung aufweist. Die Anzucht der Hefe erfolgt über Nacht in 3 ml SD Medium bei 30 °C. Am nächsten Morgen wird die OD₆₀₀ bestimmt. 2 ml der Kultur werden pelletiert und in 665 μ l H-Puffer (100 mM HEPES / KOH, pH 7,0; 150 mM NaCl; 2 mM MgCl₂, 1 % BSA) resuspendiert. Eine Nullkontrolle wird parallel behandelt. Durch Zugabe von 55 μ l Chloroform und 55 μ l SDS und nach 1 min vortexen sind die Zellen lysiert. Dann wird als Substrat 125 μ l oNPG-Lösung (4 mg/ml oNPG gelöst in H-Puffer) zugegeben. Die Reaktion läuft für 30 min bei 37 °C ab. Zum Abstoppen der Reaktion werden 400 μ l Natriumcarbonatlösung (1 M) zugegeben. Die genaue Reaktionszeit wird notiert. Die festen Bestandteile werden durch Zentrifugation für 5 min in der Tischzentrifuge pelletiert. Der klare Überstand wird abgenommen und die OD₄₂₀ wird bestimmt. Dieses Protokoll (Frohmeier, persönliche Mitteilung) ist eine Modifikation des Originalprotokolls nach Miller, (1972). Die Berechnung der β -Galaktosidase Aktivität erfolgt nach der Formel:

$$\beta\text{-Galaktosidaseaktivität [units]} = \frac{(1000 \times OD_{420})}{(V \times t \times OD_{600})}$$

V = Volumen der Kultur (2 ml)

t = Reaktionszeit in Minuten

3.7 Konstruktion der verwendeten Plasmide

Die Vektorkarten der im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Plasmide finden sich im Anhang.

3.7.1 Konstruktion des Plasmids pSK-BZI-3

Im Yeast Two Hybrid Screen wurde lediglich ein um den 5' Bereich verkürzter *BZI-3* Klon, wie man an Datenbankvergleichen erkennen konnte, isoliert. Um den Gesamtklon zu isolieren, wurde daher eine RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) durchgeführt. Dabei wurde ein PCR-Fragment von 700 Bp Länge isoliert. Dieses wurde in den Vektor puc57-T ligiert und mit den Primern M13 reverse und M13 universal sequenziert. Es handelte sich um den 5'- Bereich des Klons *BZI-3*, da der Anfang der schon bekannten Sequenz gefunden werden konnte. Nun konnte der Gesamtlängenklon isoliert werden, indem mit den Primern pN3-4 und pN3-5 eine PCR auf der cDNA des Kultivars SNN durchgeführt wurde, diese beiden Primer fügen die Schnittstellen *Acc65I* und *XbaI* an die für *BZI-3* kodierende Sequenz an. Das erhaltene PCR-Fragment wurde mit *Acc65I* und *XbaI* gespalten und dann in den Vektor pSKBluescript (MBI) ligiert wurde, der ebenso geöffnet wurde. Dieser Vektor kann für *in vitro* Transkription genutzt werden.

3.7.2 Konstruktion des Plasmids pSK-BZI-4

Im Yeast Two Hybrid Screen wurde lediglich ein um den 5' Bereich verkürzter *BZI-4* Klon, wie man an Datenbankvergleichen erkennen konnte, isoliert. Um den Gesamtklon zu isolieren, wurde daher eine RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) durchgeführt. Dabei dabei gewonnene PCR-Fragment war 800 Bp groß und wurde in den Vektor puc57-T ligiert. Eine Sequenzierung bestätigte, dass es sich um den 5'- Bereich des Klons *BZI-4* handelt. Zur Isolation des Gesamtklons wurde eine PCR mit den Primern pN4-4 und pN4-5 durchgeführt, diese beiden Primer fügen die Schnittstellen *Acc65I* und *XbaI* an die für *BZI-4* kodierende Sequenz an. Das erhaltene Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen *Acc65I* und *XbaI* geschnitten und in den auf gleiche Weise geöffneten Vektor pSKBluescript (MBI) ligiert. Dieser Vektor kann für *in vitro* Transkription genutzt werden.

3.7.3 Konstruktion des Plasmids pSK-BZI-2

Im Yeast two Hybrid Screen wurde ein *BZI-2* Klon isoliert, der vor dem Translationstart auch noch einen 600 Bp langen 5'-untranslatierten Bereich enthält. Um einen Klon zu erhalten, der nur den für das *BZI-2* Protein kodierenden Bereich umfaßt, wurde der Vektor pGAD-*BZI-2* mit dem Restriktionsenzym *DraI* geschnitten. Dabei entsteht ein 645 Bp großes Fragment, dass die für *BZI-2* kodierende Sequenz umfasst. Dieses Fragment wurde in den mit *SmaI* geöffneten Vektor pucA7Tx ligiert. Dieser Vektor wurde pucA7Tx-*BZI-2* genannt. Das für *BZI-2* kodierende Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen *Acc65I* und *XbaI* aus dem Vektor pucA7tx-*BZI-2* herausgeschnitten und in den mit den gleichen Enzymen geöffneten Vektor pSK ligiert. Dieser Vektor kann für *in vitro* Transkription genutzt werden.

3.7.4 Konstruktion des Vektors pBIN-BZI-2

Der Vektor pBinHygTx wird mit den Enzymen *Acc65I* und *XbaI* geöffnet. In diesen geöffneten Vektor wird das mit *Acc65I* und *XbaI* aus dem Vektor pSK-*BZI-2* herausgespaltene für *BZI-2* kodierende Fragment ligiert.

3.7.5 Konstruktion des Plasmids pBIN-BZI-3

Das für *BZI-3* kodierende Fragment wird mit den Enzymen *Acc65I* und *XbaI* aus dem Vektor pSK-*BZI-3* herausgespalten. Dieses Fragment wird dann in den mit den gleichen Enzymen geöffneten pBinHygTx inseriert.

3.7.6 Konstruktion des Plasmids pBIN-BZI-4

Das für *BZI-4* kodierende Fragment wird mit den Enzymen *Acc65I* und *XbaI* aus dem Vektor pSK-*BZI-4* herausgespalten. Dieses Fragment wird dann in den mit den gleichen Enzymen geöffneten pBinHygTx inseriert.

3.7.7 Konstruktion des Plasmids pHBT-BZI-2

Der Vektor pHBT wurde mit den Enzymen *Acc65I* und *BamHI* gespalten. Das für BZI-2 kodierende Fragment wurde mit den gleichen Enzymen aus dem Vektor pucA7Tx-BZI-2 herausgespalten und in den geöffneten Vektor pHBT ligiert. Der so entstandene Vektor pHBT-BZI-2 eignet sich als Effektorplasmid in transienten Assays.

3.7.8 Konstruktion des Plasmids pHBT-BZI-3

Der Vektor pHBT-sGFP wurde mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *Acc65I* geöffnet. In diesen Vektor wurde ein für BZI-3 kodierendes DNA-Fragment inseriert, das über die Schnittstellen *NotI* und *Acc65I* aus dem Vektor pSK-BZI-3 herausgespalten worden war. Der so entstandene Vektor pHBT-BZI-3 eignet sich als Effektorplasmid in transienten Assays.

3.7.9 Konstruktion des Plasmids pHBT-BZI-4

Der Vektor pHBT-sGFP wurde mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *Acc65I* geöffnet. In diesen Vektor wurde ein für BZI-3 kodierendes DNA-Fragment inseriert, das über die Schnittstellen *NotI* und *Acc65I* aus dem Vektor pSK-BZI-3 herausgespalten worden war. Der so entstandene Vektor pHBT-BZI-4 eignet sich als Effektorplasmid in transienten Assays.

3.7.10 Konstruktion des Plasmids pGBT-BZI-2c

Auf dem Vektor pSK-BZI-2 wurde mit den Primern pB2-E und pB2-S eine PCR durchgeführt. Das dabei amplifizierte PCR-Fragment kodiert für BZI-2, die Schnittstellen *EcoRI* und *SalI* werden an das Fragment durch die Primer angefügt. Das Fragment und der Vektor pGBT9 werden mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *SalI* geschnitten. Das Fragment kann nun in den geöffneten Vektor pGBT9 inseriert werden. Dabei wird das für BZI-2 kodierende Fragment unter Erhaltung des Leserasters 3' der für die GAL4BD kodierenden Sequenz inseriert. Der entstandene Vektor pGBT-BZI-2c kodiert für ein Fusionsprotein aus GAL4BD und BZI-2.

3.8 Längenbestimmungen

3.8.1 Längenbestimmung der Blütenorgane

Zur Quantifizierung der Blütengrößen werden vollständig entfaltete Blüten von Erdkulturpflanzen aus der Klimakammer verwendet. Die Größen werden mit Hilfe eines Lineals bestimmt, wobei die Größe der Gesamtblüte vom Blütenboden bis zur oberen Wölbung der Petalen bestimmt wird. Die Länge der Stamen wird vom Blütenboden bis zur oberen Kante des Pollensackes bestimmt. Zur Bestimmung der Stempellänge (Pistill) wird die Blüte aufpräpariert. Der Stempel wird direkt über dem Fruchtknoten abgebrochen und von der Bruchstelle bis zur Spitze ausgemessen. Die gemessenen Werte werden gemittelt und die Standardabweichung ermittelt.

3.8.2 Bestimmung des Internodienabstandes

Zur Bestimmung der Internodienabstände wurde von blühenden Erdkulturpflanzen unterhalb des Blütenstandes die Länge von 15 aufeinander folgenden Internodien mit einem Lineal ausgemessen. Die gemessenen Werte werden gemittelt und die Standardabweichung ermittelt.

3.8.1 Längenbestimmung des Sprosses einer Tabakpflanze

Zur Bestimmung der Länge des Sprosses einer Tabakpflanze wurde die Gesamthöhe einer blühenden Erdkulturpflanze wurde die Gesamthöhe des Sprosses von der Oberfläche der Pflanzenerde bis zum höchsten Punkt der Pflanze mit einem Zollstock gemessen. Die gemessenen Werte werden gemittelt und die Standardabweichung ermittelt.

3.9 Mathematische Formeln

3.9.1 Formel zur Berechnung des Mittelwertes

$$\langle x \rangle = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

3.9.2 Formel zur Berechnung der Standardabweichung

$$\sigma = \sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)}}$$

3.10 Computerprogramme zur Analyse der Sequenzen

Vektor NTI, Version 6.0

Blast (Gish *et al.*, 1993; Altschul *et al.*, 1990; Altschul *et al.*, 1997 ; Madden *et al.*, 1996)

MultAlin (Corpet, 1988)

ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>)

Coils, Version 2.2 (Lupas *et al.*, 1991 ; Lupas, 1996 ; Parry, 1982)

4 Ergebnisse

4.1 Isolierung und Charakterisierung von BZI-1 Interaktionspartnern unter Verwendung des Yeast Two Hybrid Systems

Zur Isolierung von Protein-Interaktionspartnern des bZIP-Transkriptionsfaktors BZI-1 wurde in dieser Arbeit mit dem Matchmaker GAL4-Yeast Two Hybrid System gearbeitet (Clontech, 1996). Dieses verwendet Reportergene unter der Kontrolle von „Upstream Activating Sequences“ (UAS), an die der Transkriptionsfaktor GAL4 bindet. Die Reportergenkassetten sind in das Hefe-Genom integriert. Das Yeast Two Hybrid System basiert auf dem modularem Aufbau des Transkriptionsfaktors GAL4 (Brent und Ptashne 1985; Ma und Ptashne 1987). Dieser besitzt zwei funktionelle Domänen. Die DNA-Bindedomäne (Keegan et al., 1986) interagiert mit der GAL4-UAS (Guarente et al., 1982, Giniger et al., 1985) der DNA und positioniert den Transkriptionsfaktor in der Nähe des Transkriptionsstartpunktes. Die Aktivierungsdomäne wird benötigt, um die Transkription der Gene durch Interaktion mit dem RNA-Polymerase II Komplex einzuleiten (Ma und Ptashne, 1987). Es ist aber möglich, die beiden funktionellen Domänen des GAL4-Proteins als zwei getrennte Proteinfragmente zu exprimieren (Ma und Ptashne, 1987). Im Yeast Two Hybrid System untersucht man die Interaktion von Proteinen, indem man das eine Protein mit der GAL4 Bindedomäne (GAL4BD) und das andere Protein mit der GAL4 Aktivierungsdomäne (GAL4AD) fusioniert. Wenn die Proteine interagieren, wird die räumliche Nähe zwischen GAL4BD und GAL4AD hergestellt, der GAL4 Transkriptionsfaktor wird rekonstituiert (Zur Übersicht siehe Fields und Song, 1989; Allen et al., 1995; Brachmann et al., 1997; Chien et al 1991; Fields und Sternglanz, 1994; Fritz und Green, 1992; Guarente 1993). Dieser kann dann über einen GAL4 abhängigen Promotor mit UAS die Reportergen-Expression aktivieren. Zur Konstruktion der Fusionsproteine werden im Matchmaker GAL4-Yeast Two Hybrid System die Vektoren pGBT9, der für die GAL4BD kodiert und pGAD424, der für die GAL4AD kodiert, verwendet.

4.1.1 BZI-1 ist ein Transkriptionsaktivator in Hefe

Das BZI-1 Protein aus Tabak weist viele Eigenschaften eines Transkriptionsfaktors auf. So besitzt BZI-1 eine DNA-Bindedomäne mit möglichem Kernlokalisierungssignal (Nuclear Localisation Signal, NLS, van der Krol und Chua, 1991; Varagona und Raikel, 1994), BZI-1 ist im Kern lokalisiert und kann an DNA binden (Kuhlmann et al., 2003). Vor der Verwendung von BZI-1 im Yeast Two Hybrid System als Bait (Köder) zur Isolation von Interaktionspartnern musste untersucht werden, ob BZI-1 ein Transkriptionsaktivator in Hefe ist. Autoaktivierung des Bait-Proteins resultiert im Hefe Two Hybrid System in hoher Hintergrundaktivität mit vielen Falsch-Positiven Klonen.

Wenn der Transkriptionsfaktor BZI-1 starke Aktivierungseigenschaften hat, dann sollte eine Fusion von BZI-1 mit der GAL4BD ausreichen, um die Reportergene zu aktivieren, ohne dass die GAL4AD erforderlich ist. Die Transformation mit dem Hefevektor pGBT9 diene als Negativkontrolle. Die Hintergrundaktivität der Reportergene war sehr gering. Als Positivkontrolle wurde die Hefe mit den Vektoren pAV und pTD transformiert (Iwabuchi et al., 1993; Li et al., 1993; Chien et al., 1991). Es handelt sich hierbei um die im Clontech Matchmaker GAL4-Yeast Two Hybrid System als Positivkontrollen vertriebenen Vektoren.

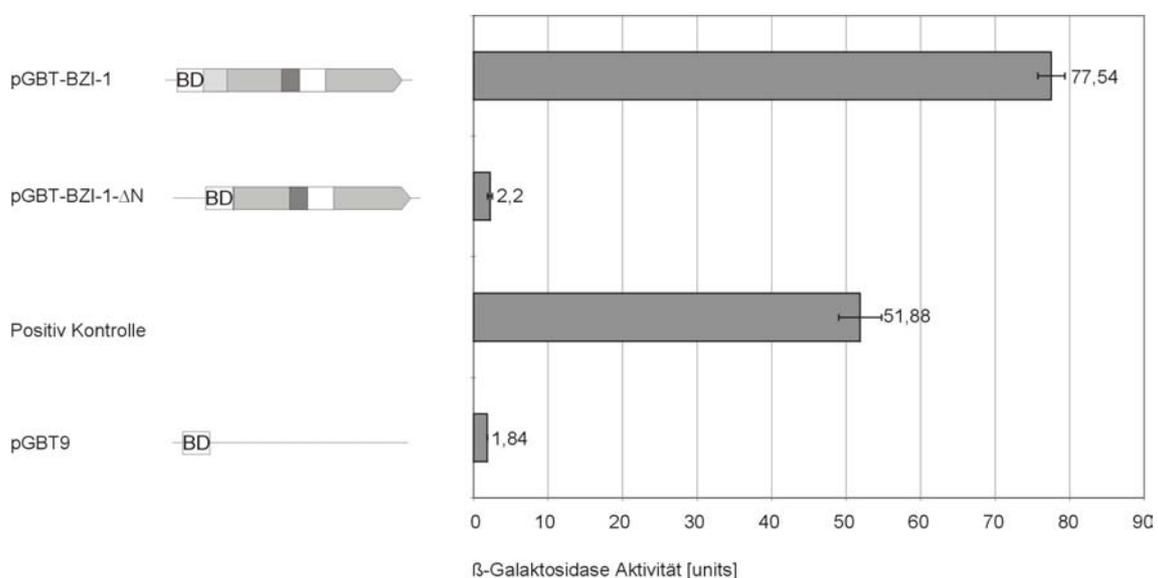


Abb. 4.1: Analyse der Aktivierungseigenschaften von BZI-1 im Hefe-System. Durchgeführt wurde ein oNPG-Test. Aufgetragen auf der x-Achse sind jeweils die β-Galaktosidaseeinheiten (siehe unter 3.6.9). Getestet wurde die Autoaktivierung von BZI-1 und BZI-1-ΔN, die als Fusionen mit der GAL4BD exprimiert wurden. Als Negativkontrolle wurde die Transformation mit dem Vektor pGBT9 benutzt. Als Positivkontrolle diente ein Ansatz von Hefen mit den Vektoren pAV und pTD. Es wurden jeweils drei unabhängige Messungen durchgeführt. Der Mittelwert und die Standardabweichung wurden aufgetragen.

Transformation der Hefe mit dem Vektor pGBT-BZI-1 führte zu einer starken Aktivierung der Reportergene. Die Aktivität war im oNPG-Test mit 77,54 „units“ wesentlich stärker als in der Positivkontrolle mit 51,88 „units“ (Abb. 4.1). Die Aktivierung des Reportergens durch BZI-1 beruht allein auf der Wirkung von BZI-1, ohne dass eine Interaktion mit einem zweiten, mit der GAL4AD fusionierten Protein vorliegt. BZI-1 ist also ein starker Transkriptionsaktivator in Hefe. Der Vektor pGBT-BZI-1 Δ N kodiert für ein BZI-1 Derivat mit deletiertem Aminoterminus. Es fehlen diesem Konstrukt die ersten 72 Aminosäuren. Dieses BZI-1- Δ N Derivat hatte seine Aktivierungseigenschaften verloren, die β -Galactosidaseaktivität betrug nur noch 2,2 „units“. Aufgrund der Aktivierungseigenschaften des Aminoterminus von BZI-1 sind Konstrukte, die diesen Aminoterminus enthalten, nicht geeignet, um mit dem Yeast Two Hybrid System Proteine zu isolieren, die mit BZI-1 interagieren, da die Hintergrundaktivität zu hoch ist. Im Yeast Two Hybrid System wurden daher zur Isolation von Interaktionspartnern Konstrukte ohne diesen Aminoterminus verwendet.

4.1.2 BZI-1 interagiert mit BZI-2, BZI-3 und BZI-4 in Hefe

Um Interaktionspartner von BZI-1 zu isolieren, wurde mit verschiedenen BZI-1-Derivaten gearbeitet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Yeast Two Hybrid Screen mit BZI-1₂₃₈₋₄₅₀ als Köder durchgeführt (Strathmann, 1999). Dieses Protein kodiert für den Carboxyterminus von BZI-1 einschließlich des bZIP-Bereiches. Die Expression der Fusion von GAL4BD mit BZI-1₂₃₈₋₄₅₀ konnte im Western-Blot nachgewiesen werden (Abb. 4.2B). Als cDNA-Bank dient die Fusion von Tabakblatt cDNAs mit der GAL4AD. Die Transformationseffizienz lag bei 5×10^4 cfu/ μ g DNA. 3×10^7 Zellen wurden transformiert. Als Auxotrophiemarker wird zunächst das *ADE2* Gen verwendet. 88 Klone konnten auf Selektivmedium ohne Adenin wachsen. 85 dieser Klone zeigten auch eine Aktivität des *HIS3* Gens.

In diesem Yeast Two Hybrid Screen konnten drei mit BZI-1 interagierende bZIP-Proteine, BZI-2, BZI-3 und BZI-4 (Strathmann et al., 2001) isoliert werden. Von den 85 isolierten Klonen kodierten 17 für BZI-2, 13 Klone für BZI-3 und 13 für BZI-4 (Strathmann, 1999).

Um die Protein-Domäne zu bestimmen, die diese Interaktion vermittelt, wurden verschiedene BZI-1 Derivate auf ihre Interaktion mit den anderen BZI-Proteinen getestet (Abb. 4.2).

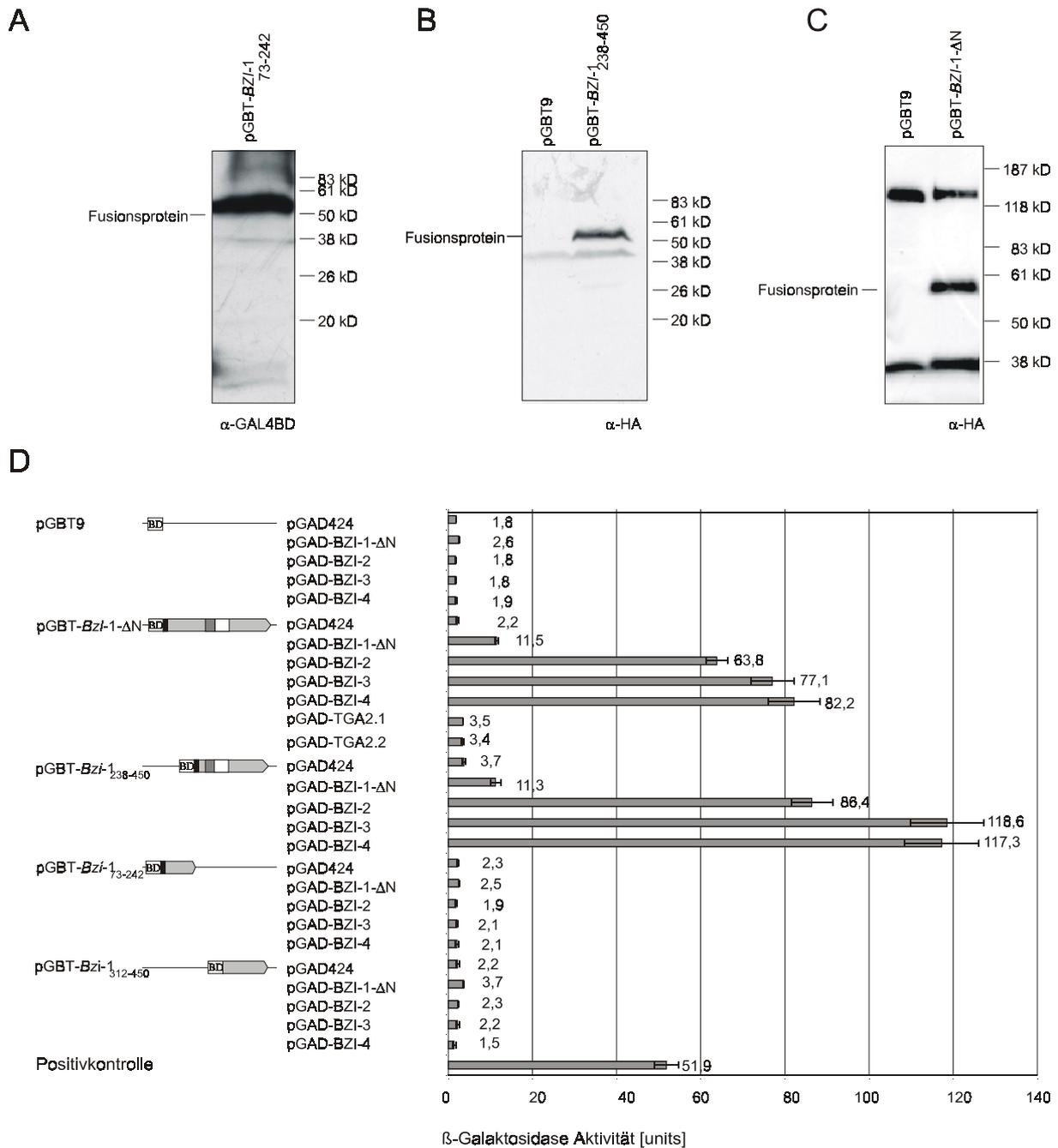


Abb. 4.2: Kartierung der Proteindomänen von BZI-1, die eine Interaktion mit BZI-2, BZI-3 und BZI-4 vermitteln. A-C: Western-Blot Analyse zum Nachweis der einzelnen Bait-Fusionsproteine. Der Nachweis in A erfolgte mit α-GAL4BD-Antikörper, der Nachweis in B und C erfolgte mit α-HA-Antikörper. D: Verschiedene BZI-1 Derivate, die als Bait benutzt wurden, wurden mit der GAL4BD fusioniert, diese wurden schematisch dargestellt. In einigen Konstrukten war der HA-Tag vorhanden, er ist durch ein schwarzes Rechteck symbolisiert. Das dunkelgraue Rechteck symbolisiert die basische DNA-Bindedomäne, der Leucinzipper wird durch ein weißes Rechteck dargestellt. Als Prey dienten GAL4AD Fusionen mit BZI-2/-3 oder -4 sowie TGA2.1 und TGA2.2 als Kontrolle. Aufgetragen sind jeweils die β-Galaktosidaseeinheiten (siehe unter 3.6.9). Als Negativkontrolle wurde die Transformation mit den Ausgangsvektoren pGAD424 und pGBT9 benutzt. Als Positivkontrolle diente ein Ansatz von Hefen mit den Vektoren pAV und pTD. Es wurden jeweils drei unabhängige Messungen durchgeführt, der Mittelwert und die Standardabweichung wurden aufgetragen.

Die Translationsfusion der GAL4BD mit den BZI-1-Derivaten BZI-1₇₃₋₂₄₁, BZI-1₂₃₈₋₄₅₀ und BZI-1-ΔN wurde im Western-Blot überprüft (Abb. 4.2 A-C). oNPG-Analysen der Reporterogenaktivität zeigten, dass die Interaktion über die bZIP-Domäne vermittelt wird. Derivate, die für BZI-1 kodieren, aber die bZIP-Domäne nicht beinhalten, zeigen keine Interaktion mit den Proteinen BZI-2, BZI-3 und BZI-4 (Abb. 4.2D). Die Homodimerisierung von BZI-1 führt ebenfalls zu einer Aktivierung der Reporter gene, allerdings ist die Aktivität um das 6-10 fache geringer als bei der Heterodimerisierung. Um zu überprüfen, ob die Interaktion von BZI-1 mit BZI-2, BZI-3 und BZI-4 spezifisch ist, oder ob BZI-1 auch mit anderen bZIP-Transkriptionsfaktoren interagiert, wurde eine Interaktion zwischen BZI-1 und TGA-Faktoren untersucht. BZI-1 interagiert nicht mit den TGA-Faktoren TGA2.1 und TGA2.2 (Niggeweg et al., 2000). Auch eine Interaktion mit CPRF5, einem bZIP-Transkriptionsfaktor aus Petersilie mit großer Homologie zu G-Box bindenden Faktoren (Rügner et al., 2000), findet nicht statt (Daten nicht gezeigt). BZI-1 interagiert jedoch mit den Proteinen CPRF6 und CPRF7 aus Petersilie (Rügner et al., 2000), die als Interaktionspartner des BZI-1 ähnlichen Proteins CPRF2 isoliert wurden und wie BZI-2, BZI-3 und BZI-4 zur Gruppe S gehören (Daten nicht gezeigt). Die Interaktion von BZI-1 mit bZIP-Proteinen der Gruppe S ist daher spezifisch.

4.1.3 Die Interaktion von BZI-1 mit BZI-2, BZI-3 und BZI-4 kann *in vitro* bestätigt werden

Eine im Yeast Two Hybrid System gefundene Interaktion sollte in einem anderen Versuchssystem bestätigt werden. Ein guter Nachweis für eine Protein-Protein Interaktion *in vitro* ist die „Far Western“ Analyse (Kato et al., 1994; Naguapalli et al., 1995). Hier wird ein Protein nach SDS-PAGE auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Nach einem Renaturierungsschritt wird diese Membran mit dem zweiten Protein inkubiert, das entweder immunologisch oder radioaktiv nachgewiesen werden kann. Bei einer Interaktion zwischen den beiden Proteinen, ist eine Bande auf der Laufhöhe des ersten Proteins auf der Membran erkennbar. In diesem Versuch wurde zunächst rekombinantes BZI-1 Protein und als unspezifisches Kontrollprotein BSA auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Inkubation mit [³⁵S]-Methionin markiertem BZI-2, BZI-3 oder BZI-4 Protein erlaubte die Detektion der Interaktion (Abb. 4.3A-C), da diese radioaktiv markierten Proteine mit BZI-1 auf der Membran interagieren. Man kann daher eine Bande erkennen, die auf der Detektion

des markierten Proteins beruht, das an das auf die Membran übertragene BZI-1 Protein bindet. Als Kontrolle diente eine Membran, auf die BSA als unspezifische Proteinkontrolle, *in vitro* translatiertes TGA2.2 Protein und BZI-2 aufgetragen war (Abb. 4.3D). Bei Inkubation mit radioaktiv markiertem BZI-1 läßt sich lediglich eine Bande in der BZI-2 Spur detektieren, da BZI-1 weder mit BSA noch mit TGA2.2 interagiert, lassen sich diese Banden nicht über radioaktiv markiertes BZI-1 nachweisen. Die spezifische Interaktion zwischen BZI-1 und den anderen BZI-Proteinen konnte also mit diesem *in vitro* Nachweis bestätigt werden.

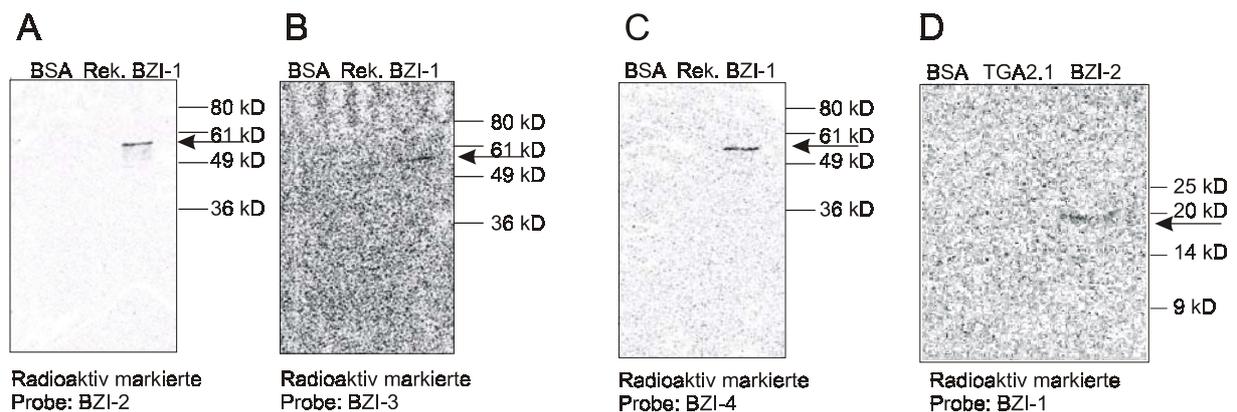


Abb. 4.3: *In vitro* Analyse der Interaktion von BZI-1 mit BZI-2, BZI-3 und BZI-4 im „Far-Western“-Blot. A, B, C: Rekombinantes BZI-1 Protein und BSA wurden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Detektion der Interaktion erfolgte durch Inkubation dieser Membran mit *in vitro* translatiertem radioaktiv markiertem BZI-2 (A), BZI-3 (B) oder BZI-4 (C) Protein. D: *in vitro* translatiertes BZI-2 und TGA2.1-Protein und BSA wurden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Detektion der Interaktion erfolgte durch Inkubation dieser Membran mit *in vitro* translatiertem radioaktiv markiertem BZI-1 Protein.

4.1.4 Isolierung des *BZI-3* Volllängen-Klons

Der Datenbank-Vergleich (Altschul et al., 1997) des im Yeast Two Hybrid Screen isolierten *BZI-3* Klons mit anderen homologen bZIP-Proteinen ergab, dass es sich um eine partielle cDNA handelte. Sie codierte für Abschnitte der basischen DNA-Bindedomäne, dem Leucinzipper und den Carboxyterminus, der Aminoterminus war aber nicht vorhanden. Um den Gesamtklon zu isolieren, wurde daher eine RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) durchgeführt. Als Ausgangsmaterial diente mRNA des Kultivars SNN. Mit den Primern pRN32 (genspezifisch) und upm (universal primer mix, Adaptor-spezifisch) wurde auf einer nach Anleitung des SMART RACE cDNA Amplification Kits (Clontech, 1999) konstruierten cDNA Bank eine PCR durchgeführt. Es folgte eine PCR mit den „nested“ Primern pRN31 und nup (nested universal primer). Diese zweite Reaktion erhöht die Spezifität. Dabei wurde

ein PCR-Fragment von etwa 700 Bp Länge isoliert (Abb. 4.4A). Dieses wurde aus dem Gel isoliert und in den Vektor puc57/T ligiert und mit den Primern M13 universal und M13 reverse sequenziert. Es handelte sich um den 5'- Bereich des Klons BZI-3, 3' der unbekannt Sequenz konnte der Anfang der bekannten Sequenz identifiziert werden. Die BZI-3 cDNA (Abb. 4.4B) zeichnet sich durch einen 369 Bp langen 5' untranslatierten Bereich aus. In diesem befinden sich zwei potentielle Methionin-Start-Codons, jeweils gefolgt von einem Stop-codon. Diese upstream Open Reading Frames (uORF) kodieren potentiell für Peptide mit einer Länge von 7 Aminosäuren (uORF1) und 25 Aminosäuren (uORF2). Der uORF1 befindet sich im gleichen Leseraster wie *BZI-3*. Bei Bp 370 befindet sich das Startcodon des *BZI-3* Proteins. Es beginnt ein offener Leserahmen über 435 Bp, das *BZI-3* Protein besteht aus 144 Aminosäuren. Das berechnete Molekulargewicht beträgt 17 kD. Abbildung 4.4 stellt die Lage der spezifischen Primer und Sequenz der *BZI-3* cDNA dar. Die abgeleitete Proteinsequenz weist typische Merkmale eines bZIP Transkriptionsfaktors auf. Man kann deutlich die basische DNA-Bindedomäne und den Leucin-Zipper über 8 heptamere Wiederholungen erkennen. Eine Analyse der *BZI-3*-Aminosäuresequenz mit dem Coils-Programm (Lupas et al., 1991; Lupas, 1996; Parry, 1982) ergibt eine hohe Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung einer coiled-coil Konformation des Leucinzipper (siehe Anhang). Anstelle des Leucins in der vierten heptameren Wiederholung im Leucinzipper befindet sich ein Valin. Hier errechnet das Programm einen Rückgang der Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung einer coiled-coil Konformation (siehe Anhang).

A



B

```

TTGCAGATTGATTGCGTTTAATTGCTGCAGATACTGTTTGGATTGGATC
TACACATACTTTGGATTCTTCATTAACCCATTGAATTAGGGTTTCACAAT
AGTTTATATGTTAGCTTCCAATTCTTCATGACCCCTCATGCGTCGAATTCGT
      M L A S N S S *
                M T L M R R I R

ATTATGCATTCTTTCTCCGTAGTCTTCCCTGACTGGTTCTACGTGTTTCA
I M H S F S V V F L Y W F Y V F S

TGAACCTAGCCCCCTCACACCTTGTTTTCTCTGTCAGTTTGTATAGAAAT
*

TCCATACTTAGAAAACCTAACTCGCAAACCTAGCAAGAGCAATAGTGCC
CTCCCCCTTCTTTGAATTCCAATAGTTGCTGTGATTAGCCTCTGACTGGAAC
GATACACAAGACATGGCTTTGACACAGCAACCGGCTAGTTCAGTTTCTGAT
      M A L T Q Q P A S S G S D

GGCCAACGTTATGCCACAATGACGATAGAAAACGAAAGAGAATGGAGTCC
G Q R Y A T N D D R K R K R M E S
      ▽
AACCGTGAATCTGCAAGGCGGTACGGATGAGAAAGCAGCAGCATTGGAG
N R E S A R R S R M R K Q Q H L E

GAGTTGATGAGCCAAATGACACAGCTACAGAATCAGAACGTTCTGTGGCGC
E L M S Q M T Q L Q N Q N V L W R
      pRN3.1
GAGAAGATTGACGCTGTGCSAAGAACTACCTCACCTCGATGCGGAGAAC
E K I D A V G R N Y L T L D A E N
      pRN3.2
AATGCTCTGAGGCTCAAATGGCAGAACTGACTGAACGCTTGGATTCTCTC
N V L R A Q M A E L T E R L D S L

AATTCGCTCACTCGTTTTCTGGGCTGATGCTAATGGACTAGCTGTGGATATC
N S L T R F W A D A N G L A V D I

CCTGAAATTCCTGACACTTTGCTTGAGCCCTGGCAGCTTCTTGCCCAATT
P E I P D T L L E P W Q L P C P I

CAACCCATCACTGCTTCTGCTGATATGTTTAAGTTTTGAGCTGCTGCTCTG
Q P I T A S A D M F K F *

CAGTTCTGAACTACTCTGCTCTTAGCTTGAATTCTTGGTTAATCAGGTGTT
GTTTTGCTTTGATTGGAGATGCGATCCTTAGTGAAGTGGACCTG

```

Abb. 4.4: Isolierung des 5' Bereichs der *BZI-3* cDNA mit Hilfe einer Rapid-Amplification of cDNA Ends (RACE) A: Agarosegel. M: Größenstandard, λ PstI. R: RACE Reaktionsansatz, 5'-*BZI-3* Fragment. Verwendete Primer: nup und pRN3.1 (siehe B). B: Sequenz der *BZI-3* cDNA. Das Start-ATG der für *BZI-3* kodierenden Sequenz ist fett gedruckt, das Stopcodon ist mit einem Stern markiert. Die Aminosäuresequenz der uORFs und des für *BZI-3* kodierenden ORFs ist eingetragen. Die basische Domäne (nach Suckow et al., 1999) ist durch Unterstreichung hervorgehoben. Die heptamere Wiederholung des Leucinzipfers ist unterstrichen dargestellt. Eingetragen ist die Lage der Primer pRN3.1 und pRN3.2, die benutzt wurden, um den Gesamtlängenklon zu isolieren. Der Übergang der im Yeast Two Hybrid Screen isolierten Sequenz von der durch RACE vervollständigten ist durch ein Dreieck markiert.

4.1.5 Isolierung des *BZI-4* Volllängen-Klons

Der im Yeast Two Hybrid Screen isolierte *BZI-4* Klon kodiert für einen partielles *BZI-4* Protein, wie Homologievergleiche zu anderen bZIP-Proteinen ergaben. Auch in diesem Fall konnte der Gesamtklon mittels RACE isoliert werden. Als Primer für die erste RACE-Reaktion wurden pRN42 und upm verwendet, für die zweite wurden pRN41 und nup benutzt. Das dabei gewonnene PCR-Fragment war etwa 800 Bp groß und wurde in den Vektor puc57/T inseriert. Eine Sequenzierung bestätigte, dass es sich um den 5'-Bereich des Klons *BZI-4* handelt. Abb. 4.5 stellt die Lage der genspezifischen Primer und die aus den verschiedenen Klonen zusammengetragene Sequenz der *BZI-4* cDNA dar.

Auch die *BZI-4* cDNA weist einen langen 5' untranslatierten Bereich über 628 Bp auf. Es befinden sich fünf uORFs in diesem Bereich, uORF1 kodiert potentiell für ein Peptid mit 3 Aminosäuren, uORF2 kodiert für 9 Aminosäuren, uORF3 und uORF5 für 10 Aminosäuren, uORF4 für 12 Aminosäuren. Das Startcodon des *BZI-4* Proteins befindet sich bei Bp 629. Hier beginnt ein offener Leserahmen über 417 Bp, das *BZI-4* Protein ist 138 Aminosäuren lang und hat ein berechnetes Molekulargewicht von 16 kD. *BZI-4* weist typische Eigenschaften eines bZIP-Transkriptionsfaktors auf. Das Protein beinhaltet eine basische DNA-Bindedomäne. Es schließt sich ein Leucinzipper an, der 8 Wiederholungen aufweist. In der vierten Wiederholung befindet sich anstelle des Leucins ein Threonin, in der fünften Wiederholung ist anstelle des Leucins ein Cystein eingebaut. Das Coils-Programm (Lupas et al., 1991; Lupas, 1996; Parry, 1982) errechnet für den Einbau des Cysteins eine geringe Wahrscheinlichkeit für die Bildung einer coiled-coil-Struktur (siehe Anhang).

```

GAGTAACGTAATCCTCTTCTCCTCCTCCCAAAATAACTTTCTGGTTTCTCC
TTATTAATCTCTTCTTAATTATCTCCACCTACCATTTTTGTCTTTGGCG
TTCATAATCTTCTTCCCTATTTTGGCTTATTGATTTCTGCTTCTTCTTC
CTCCTGATCCCTTTTCTCTTTTCTCAATCTGCTCTGGCATTGACAACC
TTTGATCATTGTCTCAACAAAGATTTGCCTTTTGTGACAAAACCATATC
TTGAAATCACATTTCTAACGTTGTTGTTGATTTCTTTAGGAGATTCCAA
GGTGGGTTTTTTGGGGTTTGTGCTGATTTTACTTTTCGACAATGAATTTG
M N L

AGGTTTCTCTAGTTAGGAATCACTCTATGATATCTGTGATTTCCACCCTC
M I S V I S T T L

TGTTAGGCATTTGTCTTCTTCAATCTTTCTCTGTAATGTTCTCTATCATT
M F L Y H F

TCTATGTTTTTTCATGAAGACACTTTTGAAACACCGTCTGAATAGAAGCT
Y V F S *
M K T L L E T P S E *
M F F H E D T F G N T V *

TTCTTTTATTGAAGAACAAGCAACCTCTTTGATTGTCCAAAAGTACAAA
TTGGTCTTCTCTAAAATCAGAGAATTGGGGTACTATTGAATTTATAGCCAT
AATATTTGAAGGAAAAATGTCAGCTTTAAGGCAGAGTGCTAGTTCATCTGC
M S A L R Q S A S S S A

ATCAGAAGATGATCAAAGGTACGCAGGAATGGATGAAAAGAAGAGGAAAAG
S E D D Q R Y A G M D E K K R K R

GATGATTTCTAACAGGGAATCCGCGAGGCGCTCGAGGATGAAGAAGCAAAA
M I S N R E S A R R S R M K K Q K
▽
ACTTCTGCAAGATTTGACTGGGAAGTGAGCAGATTACAGGTTGCTAACAA
L L Q D L T G E V S R L Q V A N K

GAACATCTGGCAAAAATTGAAGAGACCACAGAAAGGTATACAGTTTGTAC
N I L A K I E E T T E R Y T V C T
pRN42
←
TGACACAGAATAATGTGTTGAAGGCACATGCAATGGAATTGAATGATAGGCT
A Q N N V L K A H A M E L N D R L

GAGGTACTTAAATGATGTTATTAATGACACTGGTTTAGCTGTGGATGCTGC
R Y L N D V I N D T G L A V D A A
pRN41
←
TGATCCTTTGCTGAAGCCGTTGCAGATCCCTCGTCCAATGCAGCCCATTCG
D P L L K P L Q I P R P M Q P I A

TTCTTCAGGCTTATTTAAATTTTGACGTCGATTTGGTTGTCTTTAGTGGCT
S S G L F K F *

AGTTGGATAGCTTTGCTTCCCTTTAGTCCATATATGAGTGGTTTCTTTTGA
TGGTAATGTCATGTTAGTTATGCCTTTGTTGGTTATGCTTTAGTGTGCTG
TGCTTGCTTACTCTTTGAACCATGTATATCAGGAATATCTGGAAGTTGTGA
ACAATGTTTCATCTTGCTTGCTGGCTAAAAA

```

Abb. 4.5: Sequenz der mit Hilfe der RACE Reaktion vervollständigten *BZI-4* cDNA. Das Start-ATG der für *BZI-4* kodierenden Sequenz ist fett gedruckt, das Stopcodon ist mit einem Stern markiert. Die Aminosäuresequenz der ORFs ist eingetragen. Die basische Domäne (nach Suckow et al., 1999) ist durch Unterstreichung hervorgehoben. Die heptamere Wiederholung des Leucinzipfers ist unterstrichen dargestellt. Eingetragen ist die Lage der Primer pRN4.1 und pRN4.2, die benutzt wurden, um den Gesamtlängenklon zu isolieren. Der Übergang der im Yeast Two Hybrid Screen isolierte Sequenz von der durch RACE vervollständigten ist durch ein Dreieck markiert.

4.1.6 Der *BZI-2* Klon

Der im Yeast Two Hybrid isolierte *BZI-2* Klon ist 1459 Bp lang (Abb. 4.6). Die cDNA weist einen etwa 620 Bp langen 5' untranslatierter Bereich auf, in dem sich drei uORFs befinden. Diese uORFs kodieren potentiell für Peptide mit einer Länge von 17 Aminosäuren (uORF1), 41 Aminosäuren (uORF2) und 7 Aminosäuren (uORF3). Diese uORFs überschneiden sich teilweise. uORF2 liegt im gleichen Leserahmen wie *BZI-2*. Das *BZI-2* Protein weist die typische Struktur eines bZIP-Transkriptionsfaktors auf. Bei Aminosäure 31 beginnt die basische Domäne. Es schließt sich der Leucinzipper an, der neun heptamere Wiederholungen aufweist. Das Coils-Programm (Lupas et al., 1991; Lupas, 1996; Parry, 1982) errechnet für den Einbau eines Threonins anstelle des Leucins bei der vierten Wiederholung eine sehr geringe Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung einer coiled-coil-Konformation in diesem Bereich (siehe Anhang).

```

.AATTCGGCACGAGTTTCTCTGCTCTTTGCCAATAACCAAAGGCTCTCTTTT
TTCTTGGTCTCTTATTCTGTCAAGTTTGTAGTTTGGTTTCAAGATTTTCT
TGAAATCTCCACCCAAAATCTCTGAAAAAATACCAAGAAAGTGCCTTTTGT
TTCATTTTCTTCTGTTGTATCAGGCTGGGCCCAACAGGAGAAATCTAGC
CTTGATATATATATTTACTAAGAATTAATTATCACTGGTTTTATTATTTTA
GCTAATCTTAAGTCTACCCCTAGTATTCTAATCTTTGAAATTCATGTCTG
      M S A
    M L P L V F L I F E I H V C

CAATTCTCAGTGAAGTGTCTTTTCGGGGTTTATGATAAATCCACATATA
  I L S E L F L S G F M I N S T Y R
N S Q *

GGCGCAGGGCCCATTTGGTGCAATCTTTCTCAGTTGTTTTCTCTACTGGT
  R R A H L V Q S F S V V F L Y W F

TTTACTACATTTTCATGATTTTCTCTCTCCCCCTAAATAAGTATTAACCC
  Y Y I S *
      M I F L L S P *

CTTTATATATTATCATTATCAAGAAATAAATCTTCAGTATTTTAAATAGTT
AATTGTGTCAGTCAAAAACCTCCATTTGGGTCCTACTAGTTTTTTATTTT
GTACTTTTAACTCTTTAAATCTGAAAATATTACTATTGTTCTGAAAAAA
ATTTGGTCAATGGCTTCATCAAGTGGAACATCATCAGGGTCATCATTATTC
  M A S S S G T S S G S S L F L

TTCAAAACCTCAGGCTCAGAAGAAGATCTTCAGCAATTAGTGGATCAAAGGA
  Q N S G S E E D L Q Q L V D Q R K

AGAGGAAGAGAATGATATCAACAGAGAATCAGCTCGAAGATCAAGGATGA
  R K R M I S N R E S A R R S R M R

GAAAACAGAAACATTTGGATGATTTAATGGCTCAAGTTGCAACACTAAGAA
  K Q K H L D D L M A Q V A T L R K

AAGAAAATAACCAGATTTTGACAAGTATGAATGTTACCACACAACATTATC
  E N N Q I L T S M N V T T Q H Y L

TTAATGTTGAGGCTGAAAATTC AATCTTGAGAGCTCAATTAGCTGAATTAA
  N V E A E N S I L R A Q L A E L N

ATCACAGGCTTGAGTCACTCAATGAAATTATTGCTTTCTTGGATGCCAACA
  H R L E S L N E I I A F L D A N N

ACAATTGTAATGGTCTTGCCAATATGGACCATAATCAAGAAGAGCCTTATA
  N C N G L A N M D H N Q E E P Y S

GCTTCAATTTTGCACAAAATGAACCTATGGTTGATGGTTCAACATGACCA
  F N F A Q N E P M V D G F N M T N

ATTCTTGAATTATCTTTGTGCCAATCAGCCTATTATGACTGCAGATGTTT
  S W N Y L C A N Q P I M T A D V L

TGCAGTACTGATTAGCCAGACCAGTCAGTTTCGAATATCATATGGTTGAAG
  Q Y *

AGAAAGAATCAAAGAGAATTTTTTTAAGCAGTAGATCTAAAAATTTTAA
AAAAAATGTATCAAGTAGTAGAAGTATTAGTACTTTTGTAAAGCTTTGTC
AAGTAGGGTTAAGAATAAATTCCTTTTGGGGAAATAATAGTAGTAACTAT
TGGTGTCTTGTACATGGGGCTTTGTAATCTCATATTTGGCCTCTTTCAA
GAACTTATGAAGTTGTAATTTGGAAAGTTTGGTTTTATTGATGTAAAAAA
AATAGATTGTTAAACCAAAAAAAAAAAAAA

```

Abb. 4.6: Sequenz der *BZI-2* cDNA. Das Start-ATG der für *BZI-2* kodierenden Sequenz ist fett gedruckt, das Stopcodon ist mit einem Stern markiert. Die Aminosäuresequenz der ORFs ist eingetragen. Die basische Domäne (nach Suckow et al., 1999) ist durch Unterstreichung hervorgehoben. Die heptamere Wiederholung des Leucinzipfers ist unterstrichen dargestellt.

4.1.7 BZI-2 ist ein Aktivator der Genexpression in Hefe

Aus der Existenz des 5' untranslatierten Bereichs vor dem eigentlichen Startcodon des im Yeast Two Hybrid Screen isolierten BZI-2 Klons ergibt sich eine weitreichende Konsequenz: es kann sich um keine Translationsfusion von BZI-2 mit der GAL4AD handeln.

Zwischen dem für die GAL4AD kodierenden Bereich und dem Start-ATG liegt ein etwa 620 Bp langer 5' untranslatierter Bereich, das Start-ATG befindet sich nicht im gleichen Leserahmen wie die GAL4AD. Bei Cotransformation der Hefe mit den Vektoren pGBT-BZI-1- Δ N und pGAD-BZI-2 sieht man eine deutliche Reporterogenaktivität (Abb. 4.2), d.h. die Aktivierung der Transkription muß auch bei der fehlenden Fusion von GAL4AD mit BZI-2 vermittelt werden.

Eine mögliche Ursache für dieses Phänomen ist, daß es sich bei BZI-2 um einen Transkriptionsaktivator in Hefe handelt und so die zusätzliche GAL4AD-Fusion zur Aktivierung der Transkription nicht erforderlich ist. Um zu überprüfen, ob BZI-2 ein Aktivator in Hefe ist, wurde eine Fusion der für BZI-2 kodierenden Sequenz mit der GAL4-BD hergestellt. Der Vektor pGAD-BZI-2c kodiert für diese Translationsfusion. In oNPG-Test konnte gezeigt werden, daß dieses Konstrukt ausreicht, um die Transkription der Reportergene zu aktivieren (Abb. 4.7). BZI-2 ist daher in Hefe ein Aktivator der Transkription.

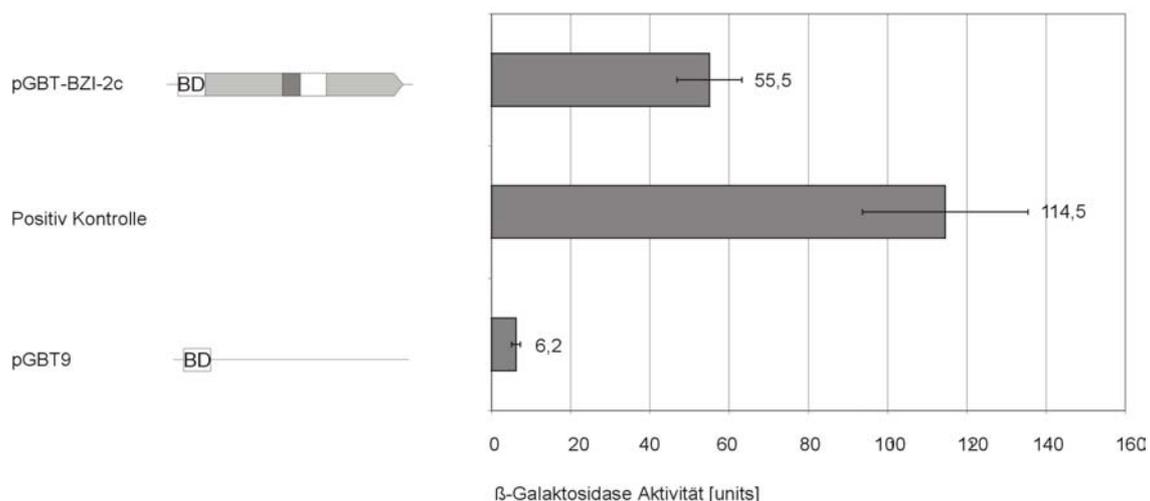


Abb. 4.7: Aktivierungseigenschaften von BZI-2 in Hefe. Durchgeführt wurde ein oNPG-Test. Aufgetragen auf der x-Achse sind jeweils die β -Galaktosidaseeinheiten (siehe unter 3.6.9). Getestet wurde ein Fusionsprotein aus BZI-2 mit der GAL4BD, kodiert vom Vektor pGBT-BZI-2c. Als Negativkontrolle wurde die Transformation mit dem Vektor pGBT9 benutzt. Als Positivkontrolle diente ein Ansatz von Hefen mit den Vektoren pAV und pTD. Es wurden jeweils drei unabhängige Messungen durchgeführt. Der Mittelwert und die Standardabweichung wurden aufgetragen.

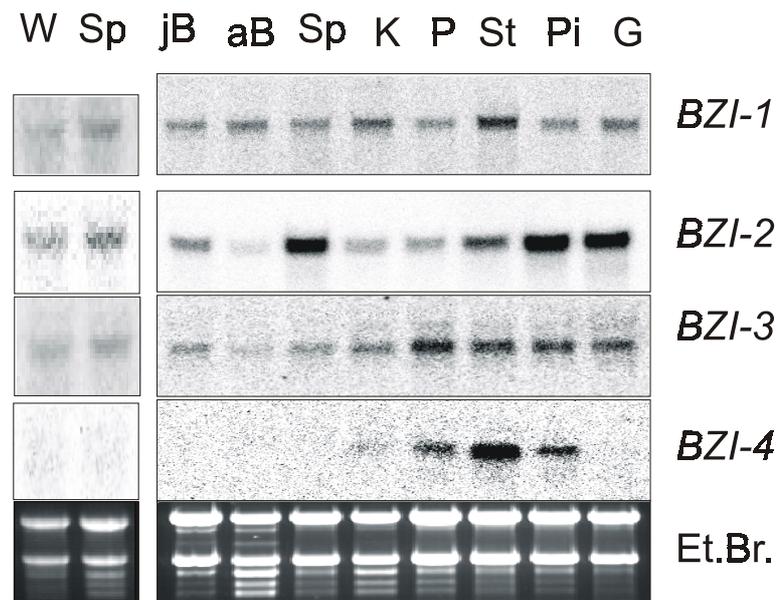
4.2 Expressionsanalyse der Gene *BZI-2*, *BZI-3* und *BZI-4* in Tabakpflanzen

Wie Heinekamp et al., (2001) zeigen konnten, wird *BZI-1* ubiquitär in der gesamten Tabakpflanze exprimiert. *BZI-1* hat aber Effekte in definierten Organen, wie z.B. in den Blüten oder in den Blättern und nach bestimmten Stimuli, z.B. Pathogenbefall (Heinekamp 2002, Kuhlmann 2002). Es ist daher von Interesse, die Expression der Heterodimerisierungspartner zu untersuchen, denn Heterodimerisierung könnte ein wichtiger Mechanismus für die Gewebespezifität der *BZI-1* Wirkung sein.

4.2.1 Organspezifische Expression von *BZI-2*, *BZI-3* und *BZI-4*

Untersucht wurde die Gesamt-RNA aus verschiedenen Geweben (Abb. 4.8). Es zeigte sich, daß *BZI-2*, *BZI-3* und *BZI-4* differentielle Expressionsmuster aufweisen. Die *BZI-2* RNA lässt sich in allen untersuchten Geweben nachweisen. *BZI-2* wird vor allem in den Sink-Organen wie der Blüte, den Wurzeln, aber auch im Stengel und in jungen Blättern exprimiert. Das Expressionsniveau ist in allen Blütenstadien gleich hoch (Abb. 4.8B). Das *BZI-3* Transkript akkumuliert vor allem in der Blüte, liegt aber auch in allen anderen Geweben vor. *BZI-4* wird in der Blüte exprimiert, dabei spielt das Blütenstadium keine Rolle (Abb. 4.8B). Die Expression von *BZI-4* ist in den Stamina am größten. *BZI-4* ist aber auch zu geringerem Teil in den Blättern exprimiert, wie man auch an Abbildung 4.16B ersehen kann, *BZI-4* wurde auch aus einer Tabakblatt cDNA-Bank isoliert.

A



B

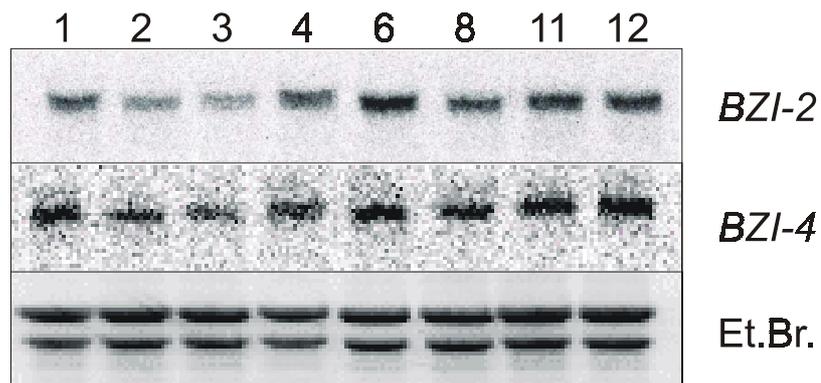


Abb. 4.8: Northern Blot Analyse der organspezifischen Expression der BZI-Transkriptionsfaktoren. A: RNA von Wurzeln (W), jungen Blättern (jB), ausgewachsenen Blättern (aB), Sproß (Sp), Sepalen (K), Petalen (P), Stamina (S), Pistill (P) und Gynoceum (G) wurde aufgetragen (Experiment 3 mal mit identischem Ergebnis durchgeführt). B: Blüten-Gesamt RNA verschiedener Blütenstadien in der Einteilung nach Drews et al., (1992). Als Hybridisierungsproben wurden *BZI-1*, *BZI-2*, *BZI-3* und *BZI-4* Fragmente benutzt. Zur Überprüfung der Beladung ist das Ethidiumbromid Bild (Et.Br.) gezeigt.

4.2.2 Stimulusspezifische Expression von *BZI-2*, *BZI-3* und *BZI-4*

4.2.2.1 Die Expression von *BZI-2* wird durch Licht reguliert

Für das *BZI-2* homologe Protein *ATB2* aus *Arabidopsis thaliana* konnte eine durch Licht regulierte Genexpression gezeigt werden. Wenn dunkeladaptierte, etiolierte Keimlinge belichtet werden, wird die Transkription des *ATB2*-Gens induziert (Rook *et al.*, 1998a).

Ob die Expression von *BZI-2* durch Licht reguliert ist, wurde in Northern Blot Analysen untersucht. Dazu wurden zu verschiedenen Tageszeiten Blattproben von Tabakpflanzen entnommen. Diese Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen kultiviert, belichtet wurde von 6 Uhr morgens bis 22 Uhr nachts. Es zeigt sich, daß *BZI-2* vor allem in der Lichtphase exprimiert wird. Mit Ende der Dunkelphase (6 Uhr) ist die Expression von *BZI-2* am geringsten, sie steigt dann tagsüber schnell an und erreicht das Expressionsmaximum um 22 Uhr. Mit Beginn der Dunkelphase um 22 Uhr sinkt die Transkription wieder. *BZI-2* verhält sich damit in seiner Expression genau entgegengesetzt zu *BZI-1*, die *BZI-1* RNA wird in der nächtlichen Dunkelphase am stärksten exprimiert. *BZI-3* zeigt eine konstante Expression, unabhängig von Licht bzw. Tag/Nachtrhythmik (Abb. 4.9).

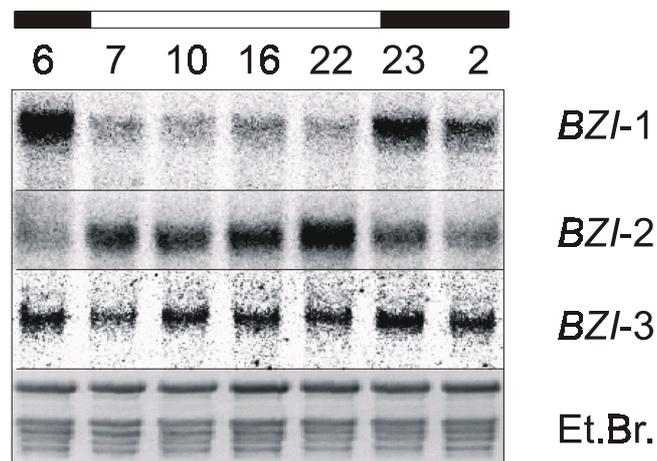


Abb. 4.9: Northern Blot Analyse der Expression von *BZI-1*, *BZI-2* und *BZI-3* in Abhängigkeit von der Tageszeit bzw. der Belichtung. Angegeben ist jeweils die Uhrzeit der Probenentnahme. Der schwarze Balken markiert die Verdunkelung während der Nacht. Als Hybridisierungsproben wurden *BZI-1*, *BZI-2* und *BZI-3* Fragmente benutzt. Zur Überprüfung der Beladung ist das Ethidiumbromid Bild (Et.Br.) gezeigt (Experiment 2 mal mit identischem Ergebnis durchgeführt).

Die Oszillation der Expressionsstärke kann auf zwei unterschiedlichen Mechanismen beruhen. Die Expression kann durch circadiane Rhythmik reguliert werden. Hierbei handelt es sich um einen autonomen zeitgebenden endogenen Mechanismus der Pflanze, der einen Rhythmus von etwa 24 Stunden vorgibt (zur Übersicht siehe Hayama und Coupland, 2003). Ein zentraler Oszillator (beruhend auf negativer transkriptioneller und translationeller Rückkopplung) gibt den Grundrhythmus vor. Synchronisiert auf den natürlichen Tag/Nachtrhythmus wird das System durch Licht- oder Temperatursignale (Devlin et al., 2001). Möglicherweise beruht die Oszillation der *BZI-2* Transkription aber auch auf der Induktion der Transkription durch Licht oder von Stoffwechselprozessen, die vom Licht beeinflusst werden, ohne dass circadiane Rhythmik eine Rolle spielt. Zur Klärung dieser Frage wurde eine weitere Untersuchung durchgeführt (Abb. 4.10).

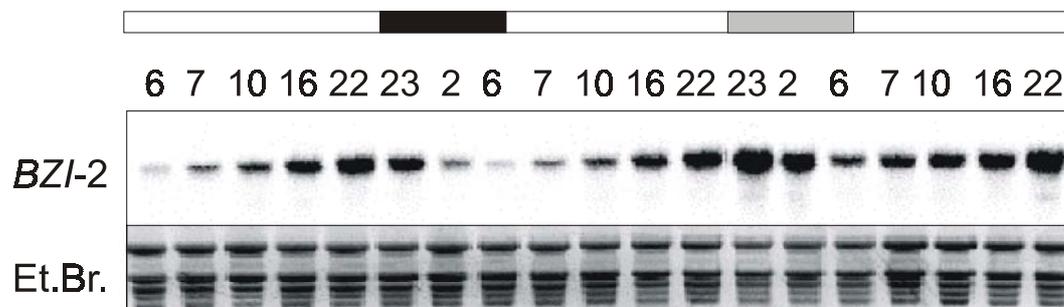


Abb. 4.10: Northern Blot Analyse der *BZI-2* Expression in Abhängigkeit von der Belichtung. Die Zahlen bezeichnen die Uhrzeit der Probenentnahme. Der schwarze Balken zeigt die Verdunkelung während der Nacht des ersten Tages. In der Nacht des zweiten Tages wurde während der Nachtzeit von 22 bis 6 Uhr belichtet. Das ist mit dem grauen Balken markiert. Angegeben ist jeweils die Uhrzeit der Probenentnahme. Zur Vollständigkeit wurden die 6h bis 22 Stundenwerte nach einer Verdunkelung doppelt abgebildet. Als Hybridisierungssprobe wurde ein *BZI-2* Fragment benutzt. Zur Überprüfung der Beladung ist das Ethidiumbromidbild (Et.Br.) wiedergegeben (Experiment einmal durchgeführt).

Zunächst wurden die Proben während eines normalen Tag/Nachtrhythmus genommen. In diesem Fall wurde die Lichtphase um 22 Uhr abends durch eine achtstündige Dunkelphase unterbrochen, worauf wieder eine Lichtphase folgte. Diese zweite Lichtphase dauerte bis zum Versuchsende an, wurde also nicht wieder durch eine Dunkelphase unterbrochen. Deutlich zeigt sich, daß die Expression der *BZI-2* RNA auch zur Zeit der Nacht weiter ansteigt, wenn die Belichtung weiter erfolgt. Allerdings sinkt die Transkription im Verlaufe dieser nächtlichen Belichtungsphase ab, um 6 Uhr, d.h. mit Beginn des neuen Tages ist die Expression geringer als um 23 h, aber um ein Vielfaches höher als um 6 Uhr nach einer Dunkelphase, die Transkription steigt dann auch schnell wieder an. Mit diesem Versuch konnte zwar gezeigt werden, dass Licht ein wichtiger Signalgeber ist, allerdings kann man auch bei dieser Belichtung über Nacht eine leichte Oszillation der Transkriptmengen

beobachten. Eine Rolle der circadianen Uhr konnte also noch nicht ausgeschlossen werden. Um die Bedeutung der Belichtung für die Transkriptmenge zu untersuchen, wurde daher in einem weiteren Versuch die Dunkelphase der Nacht abgekürzt, um 2 Uhr wurde wieder belichtet (Abb. 4.11). Unmittelbar darauf steigt die Expression der *BZI-2* RNA wieder an. Licht oder lichtabhängige Stoffwechselprozesse sind also wichtige Signalgeber für die Expression. Allerdings ist auch hier beim 6-Stundenwert wiederum ein Rückgang der Expression zu beobachten.

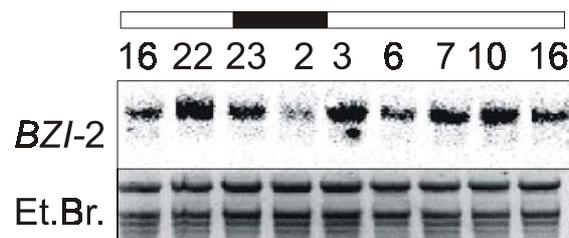


Abb. 4.11: Northern Blot Analyse der *BZI-2* Expression in Abhängigkeit von der Belichtung. Hier war die Dunkelphase in der Nacht verkürzt. Der schwarze Balken zeigt die Verdunkelung während der Nacht von 22 bis 2 Uhr an. Angegeben ist jeweils die Uhrzeit der Probenentnahme. Als Hybridisierungsprobe wurde ein *BZI-2* Fragment benutzt. Zur Überprüfung der Beladung ist das Ethidiumbromidbild (Et.Br.) wiedergegeben (Experiment einmal durchgeführt).

Um einen Einfluß der circadianen Rhythmik auf die *BZI-2* Expression auszuschließen, wurden daher Untersuchungen an Pflanzen, die 4 Tage unter Dauerlicht gehalten wurden, bevor sie zur Probenentnahme benutzt wurden, durchgeführt. Hier liegt eine konstante *BZI-2* Expression vor (Abb. 4.12). Durch diese Versuche konnte gezeigt werden, daß die Oszillation der *BZI-2* Expression im Tag/Nachtrhythmus nicht auf circadianer Rhythmik beruht. Licht wurde als Signalgeber bestimmt, wobei allerdings nicht zu unterscheiden ist, ob es sich um eine direkte Wirkung des Lichts oder um eine sekundäre Wirkung, die beispielsweise durch die Photosynthese und Zucker-Signale vermittelt wird, handelt.

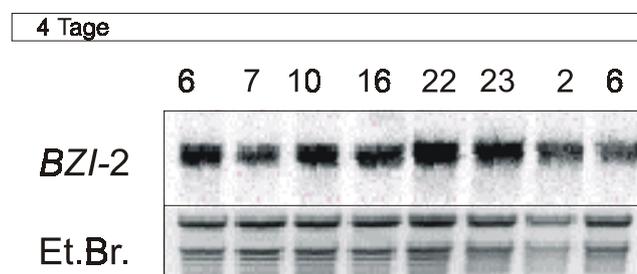


Abb. 4.12: Northern Blot Analyse der *BZI-2* Expression in Abhängigkeit von der Belichtung. Nachdem die Pflanzen vier Tage dauernd belichtet wurden, wurde am 5. Tag die Proben entnommen. Auch jetzt wurde während der Nacht nicht verdunkelt. Angegeben ist jeweils die Uhrzeit der Probenentnahme. Als Hybridisierungsprobe wurde ein *BZI-2* Fragment benutzt. Zur Überprüfung der Beladung ist das Ethidiumbromidbild (Et.Br.) wiedergegeben (Experiment einmal durchgeführt).

4.2.2.2 Die *BZI-2* Expression wird durch Zucker reguliert

Die Transkription von *ATB2* lässt sich durch die Inkubation von Keimlingen mit Zucker induzieren (Rook et al., 1998a). Darüber hinaus konnte für *ATB2* eine Regulation der Expression auf post-transkriptioneller Ebene durch Saccharose gezeigt werden (Rook et al., 1998b). Dieses wurde in Promotor-GUS-Analysen untersucht. Die GUS-Aktivität steigt in Keimlingen bei Inkubation mit geringen Saccharosekonzentrationen an, ein Maximum der GUS-Aktivität wird bei 25 mM Saccharose erreicht. Bei Konzentrationen über 25 mM, das entspricht der Konzentration, bei der die Keimlinge ihre maximale Wachstumsrate erreichten, sinkt die GUS-Aktivität ab. Diese post-transkriptionelle Regulation wird durch die uORFs im 5'-untranslatiertem Bereich der *ATB2*-RNA vermittelt. Bei Kombination von geringen Konzentrationen Saccharose und hohen Konzentrationen Glucose oder Maltose, wurde ebenfalls eine Repression der GUS-Aktivität beobachtet (Rook et al., 1998b).

Um zu untersuchen, ob die Transkription von *BZI-2* durch Zucker reguliert wird, wurden Wildtyp-Blattscheiben auf Kaliumphosphatpuffer mit 100 mM Glucose oder 100 mM Saccharose inkubiert. Als Kontrolle diente die Inkubation im Puffer. Man sieht eine deutlich höhere *BZI-2* Transkriptmenge nach 3 h Inkubation in glucosehaltigen Puffer und noch eine stärkere Induktion der Transkription nach Gabe von Saccharose (Abb. 4.13). Auf die Transkription von *BZI-3* und *BZI-4* hat die Inkubation mit Zucker keine Auswirkung. Man sieht lediglich einen leichten Anstieg der Transkription durch Verwundung (Daten nicht gezeigt).

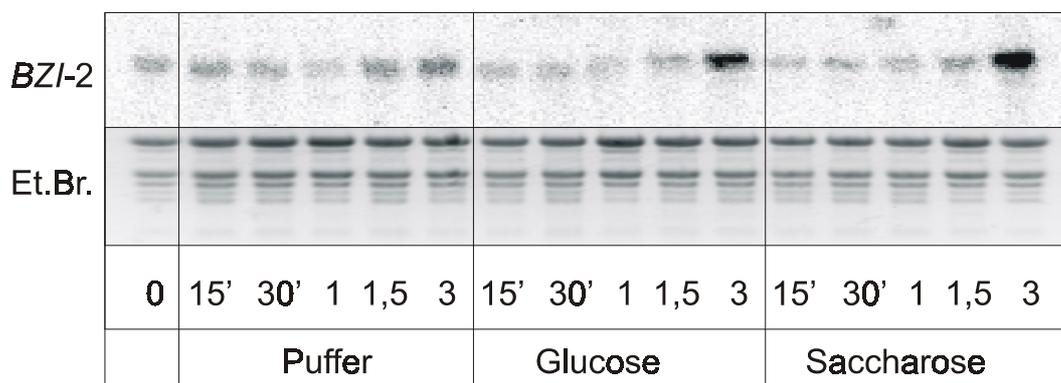


Abb. 4.13: Northern Blot Analyse der Induktion der *BZI-2* Expression durch Saccharose und Glucose. Blattscheiben von Wildtyp-Pflanzen wurden auf Kaliumphosphatpuffer inkubiert. Die Induktion fand mit 100 mM Saccharose oder 100 mM Glucose statt. Angegeben sind die Zeitpunkte der Ernte nach Beginn der Induktion. Wenn nicht anders vermerkt, handelt es sich um Stundenangaben. Als Hybridisierungsprobe wurde ein *BZI-2* Fragment benutzt. Zur Überprüfung der Beladung ist das Ethidiumbromidbild (Et.Br.) wiedergegeben (Experiment zweimal mit identischem Ergebnis durchgeführt).

4.2.2.3 Die *BZI-2* Expression geht nach Verwundung zurück

Um zu untersuchen, ob Verwundung einen Effekt auf die *BZI-2* Expression hat, wurde ein Blatt einer intakten Pflanze mit Carborundum in Kaliumphosphatpuffer durch Reiben oberflächlich verletzt. Nach 8, 24 und 48 Stunden wurden Proben dieser Pflanze entnommen. Es zeigt sich daß die Expression der *BZI-2* RNA nach Verletzung zurückgeht. Dieser Effekt ist über einen langen Zeitraum von 48 h zu beobachten (Abb. 4.14).

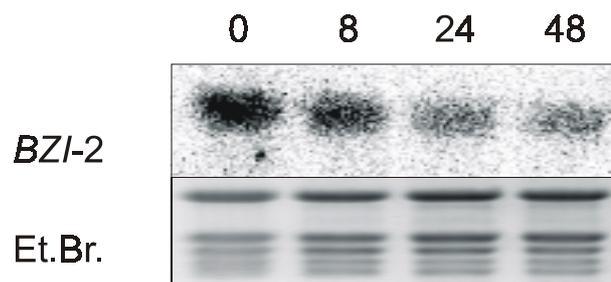


Abb. 4.14: Northern Blot Analyse der *BZI-2* Expression nach Verwundung mit Carborundum. Blätter einer Wt-Pflanze wurden mit Carborundum oberflächlich beschädigt. In den angegebenen Zeitabständen, in Stunden markiert, wurde Probematerial dieser Blätter entnommen. Als Hybridisierungsprobe wurde ein *BZI-2* Fragment benutzt. Zur Überprüfung der Beladung ist das Ethidiumbromidbild (Et.Br.) wiedergegeben (Experiment einmal durchgeführt).

4.2.2.4 Die *BZI-3* Expression wird durch Kälte induziert

BZI-3 zeigt starke Homologien zu einer Reihe von bZIP-Proteinen, die in ihrer Transkription durch Kälte reguliert sind, wie *Z.m.* mLIP15 (Kusano et al., 1995), *O.s.* LIP19 (Aguan et al., 1993), *N.t.* TBZ17 (Kusano et al., 1998). Es wurde daher untersucht, ob die *BZI-3* Expression ebenfalls durch die Temperatur reguliert wird. Dazu wurden ganze Pflanzen im Klimaschrank Temperaturen von 22 °C (entspricht der normale Anzuchttemperatur als Kontrolle), 42 °C und 4 °C ausgesetzt. Es wurden dann nach entsprechenden Zeiten Blattscheiben geerntet. Es zeigten sich keine Veränderungen der *BZI-3* Expression in den Pflanzen, die bei 22 °C oder 42 °C kultiviert wurden (Daten nicht gezeigt), Hitzestress wirkt sich also nicht auf die *BZI-3* Transkription aus. Die Pflanzen, die bei 4 °C gehalten wurden, zeigen eine deutlich stärkere *BZI-3* Expression nach 4 h, der Expressionslevel stieg weiter an bis zum Versuchsende nach 8 h. Kältereiz induziert also die Transkription der *BZI-3* RNA (Abb. 4.15). Auf die Transkription von *BZI-2* hat weder Kälte noch Hitze einen Einfluß (Daten nicht gezeigt).

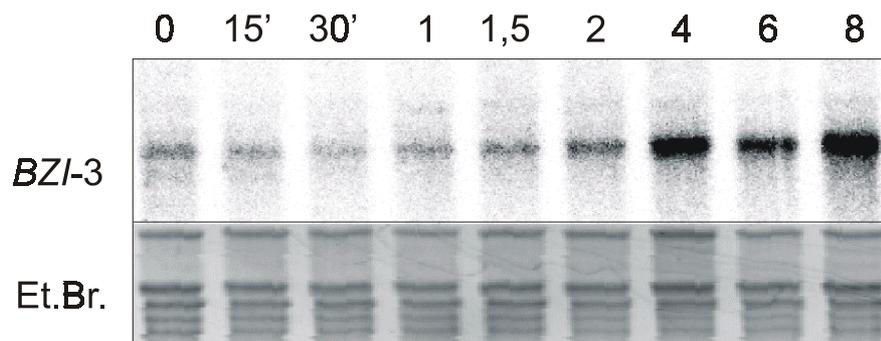


Abb. 4.15: Northern Blot Analyse der Induktion der *BZI-3* RNA durch Kälte. Eine Wt-Pflanze wurde in der Klimakammer einer Temperatur von 4°C ausgesetzt. Angegeben ist der Zeitpunkt der Probenentnahme nach Beginn des Kältestresses. Wenn nicht anders vermerkt handelt es sich um Stundenangaben. Als Hybridisierungsprobe wurde ein *BZI-3* Fragment benutzt. Zur Überprüfung der Beladung ist das Ethidiumbromidbild (Et.Br.) wiedergegeben (Experiment zweimal mit identischem Ergebnis durchgeführt).

Eine Zusammenfassung über die Auswirkungen verschiedener Stimuli auf die Expression von *BZI-2*, *BZI-3* und *BZI-4* ist in Tabelle 1 wiedergegeben.

Tabelle 1: Änderungen der Transkriptgehalte von *BZI-2*, *BZI-3* und *BZI-4* nach verschiedenen Stimuli. +: Anstieg des Transkriptes, +/-: keine Veränderung, -: Reduzierung der Transkriptmenge, n.d.: nicht untersucht.

Reiz	<i>BZI-2</i> Transkription	<i>BZI-3</i> Transkription	<i>BZI-4</i> Transkription
Saccharose (100 mM)	+	+/-	n.d.
Glucose (100 mM)	+	+/-	+/-
NaCl (200 mM)	+/-	+/-	+/-
Auxin (20 µM) Blätter	n.d.	+/-	n.d.
Auxin(20 µM) Keiml.	n.d.	+ (Yang et al., 2001)	n.d.
<i>Pseudomonas syringae</i>	+/-	+/-	n.d.
TMV	+/-	+/-	n.d.
Verwundung	- (Carborundum)	+ (Blattscheiben)	+ (Blattscheiben)
4°C	+/-	+	n.d.
42°C	+/-	+/-	+/-
Belichtung	+	+/-	n.d.

4.3 Herstellung und Charakterisierung von Pflanzen mit erhöhtem BZI-2, BZI-3 und BZI-4 Gehalt

Die Auswertung der Northern-Blot Analysen hat ergeben, dass die Transkription der Gene *BZI-2*, *BZI-3* und *BZI-4* spezifisch in bestimmten Geweben und nach bestimmten Stimuli reguliert wird. Zur Analyse der Funktion der Proteine BZI-2, BZI-3 und BZI-4 in Tabakpflanzen ist es daher interessant zu untersuchen, was bewirkt wird, wenn die Gene konstitutiv und ektopisch überexprimiert werden. Es wurden transgene Pflanzen hergestellt, die die für *BZI-2*, *BZI-3* und *BZI-4* codierenden Gene (ohne die 5' Leadersequenz) unter der Kontrolle des Tx-Promotors (Gatz et al., 1992) exprimieren. Es handelt sich bei diesem Promotor um ein durch Tetracyclin (Tc) induzierbares CaMV 35S Derivat. In Pflanzen, die keinen Tetracyclinrepressor (TetR) exprimieren, wird mit diesem Konstrukt eine konstitutive Expression des Transgens erreicht. Die Expression entspricht hier dem CaMV 35S-Promotor. In Pflanzen, die ein TetR-Protein exprimieren, wie Hö20.20, läßt sich die Expression des Transgens mit Tetracyclingabe induzieren. Das Repressorprotein TetR bindet an den tet Operator und verhindert die Transkription des Gens. Durch Zugabe von Tetracyclin wird die Genexpression induziert. Tc bindet an das Repressorprotein, das führt zu einer Konformationsänderung von TetR. TetR kann dann nicht mehr an die DNA binden, die Genexpression wird aktiviert (Zur Übersicht siehe Gatz und Lenk, 1998). Die Verwendung dieses Systems kann hilfreich sein, wenn man die Expression des Transgens gezielt zu einem bestimmten Zeitpunkt induzieren will oder wenn die konstitutive Expression des Transgens letal für die Pflanze ist.

Durch die verwendeten Konstrukte werden die für *BZI-2*, *BZI-3* und *BZI-4* kodierenden Gene ektopisch überexprimiert, d.h. die Expression des Transgens findet in der gesamten Pflanze statt.

4.3.1 Konstitutive Überexpression von *BZI-4* in transgenen Pflanzen

Um transgene Pflanzen zu erzeugen, wurde der *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte Gentransfer benutzt. Dazu wurden Blattscheiben mit Agrobakterien infiziert, die den Vektor pBIN-BZI-4 tragen. Der Vektor pBIN-BZI-4 ist ein pBIN-HygTx Derivat. Eine schematische Darstellung der für die Transformation der Pflanzen verwendeten DNA-Konstrukte ist in

Abbildung 4.16A gezeigt. Es gelang, 8 Linien zu regenerieren, die eine deutliche Überexpression (Oex) des *BZI-4* Transgens zeigen. Die Expressionslevel wurden in Northern Blot Analysen untersucht. Abb. 4.16B zeigt an ausgewählten Linien eine solche Auswertung. *BZI-4* wird in Blättern nur gering exprimiert. Neben der schwachen Bande des endogenen Transkripts kann man zwei weitere Transkripte unterscheiden. Das im Gegensatz zur endogenen Bande verkürzte Transkript ist die *BZI-4* mRNA, deren Transkription korrekt durch das Octopinsynthase-Polyadenylierungssignal (pA-OCS) abgebrochen wird. Da der 5'-untranslatierte Bereich der *BZI-4* RNA im Transgen nicht enthalten ist, ist dieses Transkript kürzer als das endogene. Das lange Transkript ist darauf zurückzuführen, dass der Abbruch der Transkription erst durch das pA-g7 Adenylierungssignal erfolgt, diese RNA ist also eine Fusion der *BZI-4* RNA mit der RNA der Hygromycinphosphotransferase (*HPT*), dem Hygromycin B Resistenzgen.

Im weiteren wurden die Linien *BZI-4-Oex#7* und *BZI-4-Oex#9* für die Versuche verwendet, die zu den stärksten Überexprimierern zählen. In diesen beiden Linien konnte auch das Protein mittels Western-Analyse detektiert werden (Abb. 4.16C). Dazu wurde ein im Rahmen dieser Arbeit hergestellter α *BZI-4* Peptidantikörper verwendet. Beide Linien zeigen eine deutliche Veränderung des Phänotyps. In Abbildung 4.17 ist der vegetative Phänotyp von *BZI-4-Oex* im Gegensatz zum Wildtyp dargestellt.

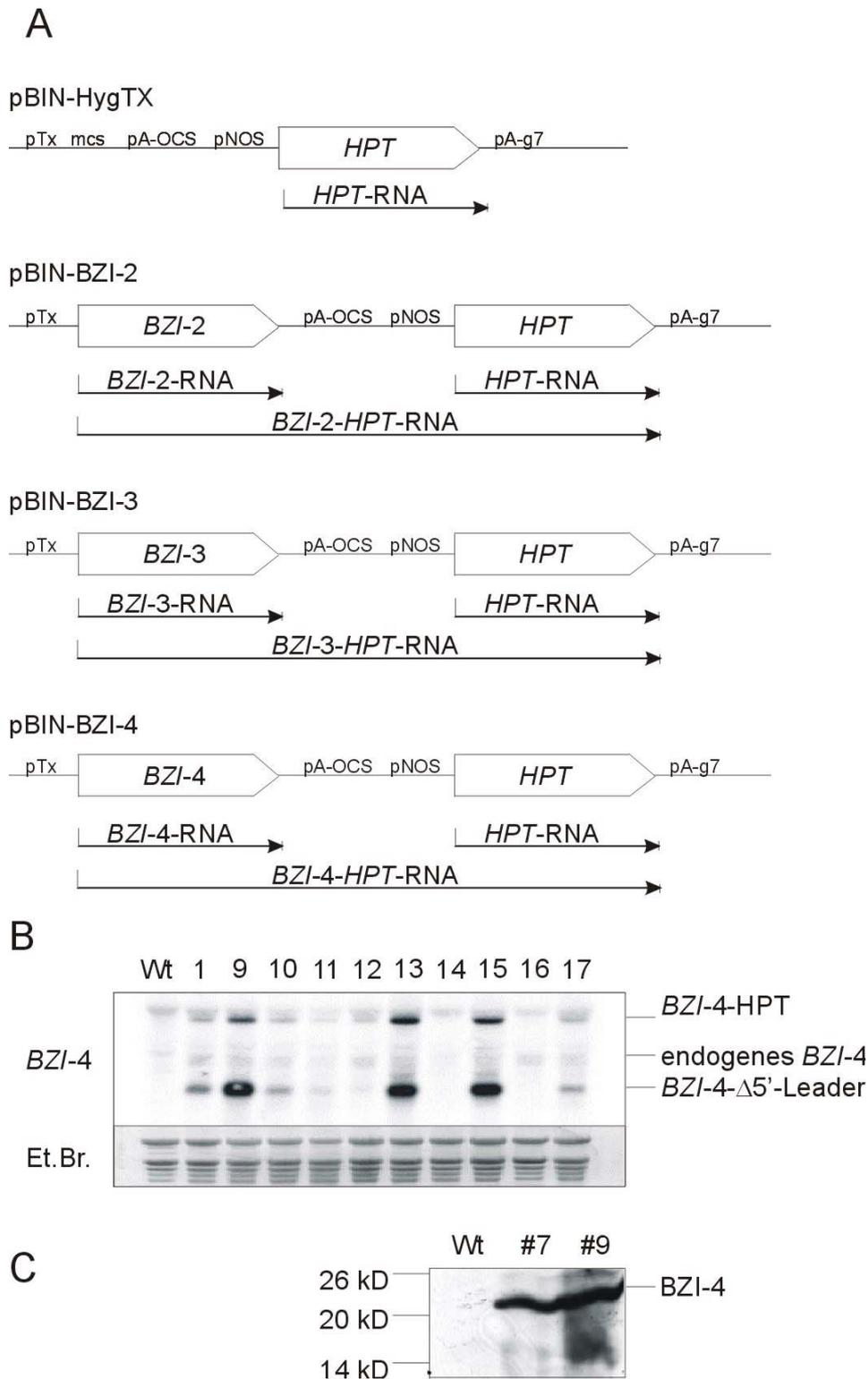


Abb. 4.16: A: Schematische Darstellung der für die Pflanzentransformation benutzten Vektoren und der abgelesenen RNAs. pTx: Tx-Promotor, mcs: multiple cloning site, pNOS: NOS-Promotor, *HPT*: Hygromycinphosphotransferase, Hygromycin B Resistenzgen., pA-OCS und pA-g7: Polyadenylierungssignale. B: Northern Blot Analyse der konstitutiven Expression des *BZI-4* Transgens in verschiedenen ausgewählten Pflanzenlinien. Angegeben ist jeweils die Nummer der Pflanzenlinie. Es wurden jeweils 8 µg Gesamt Blatt-RNA aufgetragen. Als Vergleich ist RNA der Wildtyppflanze aufgetragen (Wt). Als Hybridisierungssonde wurde ein *BZI-4* Fragment benutzt. Zur Überprüfung der Beladung ist das Ethidiumbromidbild (Et.Br.) wiedergegeben. C: Western-Blot Analyse zum Nachweis der Expression des *BZI-4* Proteins. Aufgetragen wurden jeweils 20 µl Harnstoff-Protein-Extrakt. Spur 1: Wt, Spur 2: 4#7, Spur 3: 4#9. Es wurde der Peptid-Antikörper α*BZI-4* zur Detektion benutzt.

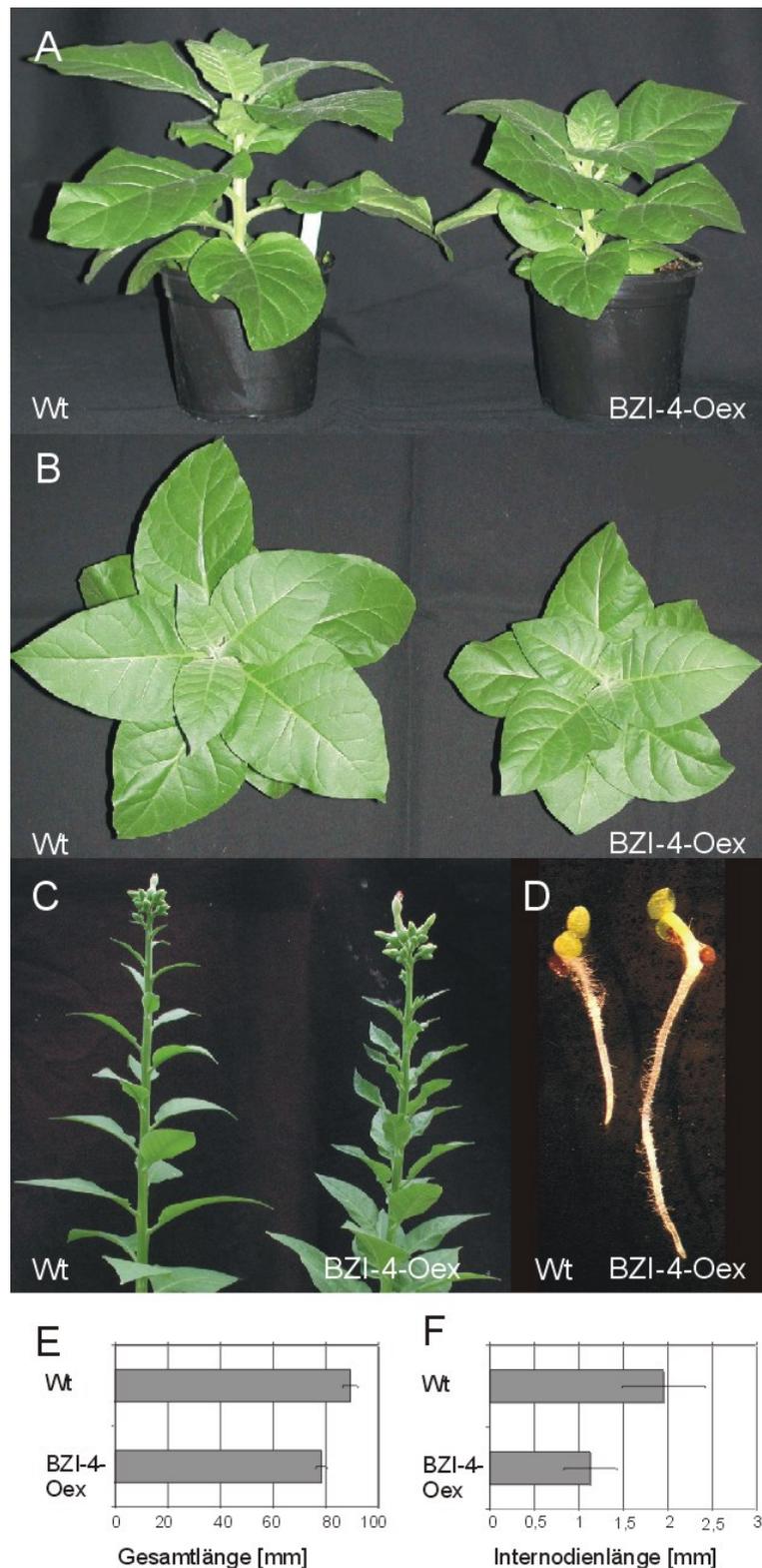


Abb. 4.17: Phänotyp der BZI-4-Oex Pflanzen. Zum Vergleich ist auf der linken Seite die Wildtyppflanze abgebildet. **A:** Aufnahme von der Seite, **B:** Aufnahme von oben, **C:** Detailaufnahme der Sproßachse zu Blühbeginn, **D:** Keimlinge. **E:** Längenbestimmung der Gesamtlänge von Wt und BZI-4-Oex Pflanze. Es wurden jeweils zwei Pflanzen vermessen, aufgetragen ist der Mittelwert in mm und die Standardabweichung. **F:** Längenbestimmung der Internodienlänge von Wt und BZI-4-Oex Pflanze. Es wurden jeweils 30 Einzelmessungen an zwei Pflanzen je Genotyp durchgeführt, aufgetragen ist der Mittelwert in [mm] und die Standardabweichung.

Insgesamt zeigen die BZI-4 Oex Pflanzen einen deutlich gestauchten Wuchs, der Internodienabstand ist um 42 % im Vergleich zum Wildtyp verringert (Abb. 4.17F). Auch die Gesamtlänge der Sproßachse ist um 12 % verkürzt (Abb. 4.17E). Die Blattlänge ist reduziert. Die Apikaldominanz ist verringert, im oberen Bereich der Sproßachse zeigen sich vermehrt Seitensprosse. BZI-4-Oex Keimlinge sind größer und kräftiger im Wuchs. Die Beschreibung des Blütenphänotyps befindet sich unter Abschnitt 4.4.2.2.

4.3.2 Konstitutive Überexpression von *BZI-3* in transgenen Pflanzen

Die Regeneration der BZI-3-Oex Pflanzen ergab zunächst bei 10 getesteten Linien nur einen deutlichen Überexprimierer, die Linie BZI-3-Oex#4. Eine Wiederholung der Transformation ergab zwei weitere transgene BZI-3-Oex Linien, die Linien BZI-3-Oex#2 und BZI-3-Oex#5. Die Linie BZI-3-Oex#5 exprimiert das Transgen am stärksten. Hier sieht man eine deutliche Veränderung des vegetativen Wachstums: die Internodienabstände sind geringer und der Winkel, in dem die Blattstiele vom Sproß abzweigen ist wesentlich kleiner als beim Wildtyp. Somit stehen die Blätter vertikaler als beim Wildtyp (Abb. 4.18). Die Beschreibung des Blütenphänotyps findet sich unter Abschnitt 4.4.2.2.

4.3.3 Konstitutive Überexpression von *BZI-2* in transgenen Pflanzen

Bei der Erzeugung von konstitutiven Überexprimierern von *BZI-2* konnten vier Linien regeneriert werden, die das *BZI-2* Transgen exprimieren. Die Überexpression ist allerdings nicht besonders stark und wirkt sich negativ auf das endogene Transkript aus, d.h. die absolute Menge an *BZI-2* ist in den transgenen Pflanzen in den Blättern nicht sehr stark verändert (Abb. 4.19C). Im weiteren wurde mit der Linie BZI-2-Oex#7 gearbeitet, die das Transgen am stärksten exprimiert. Phänotypisch zeigt diese Pflanze kein verändertes Wachstum im Gegensatz zum Wildtyp (Abb. 4.19).

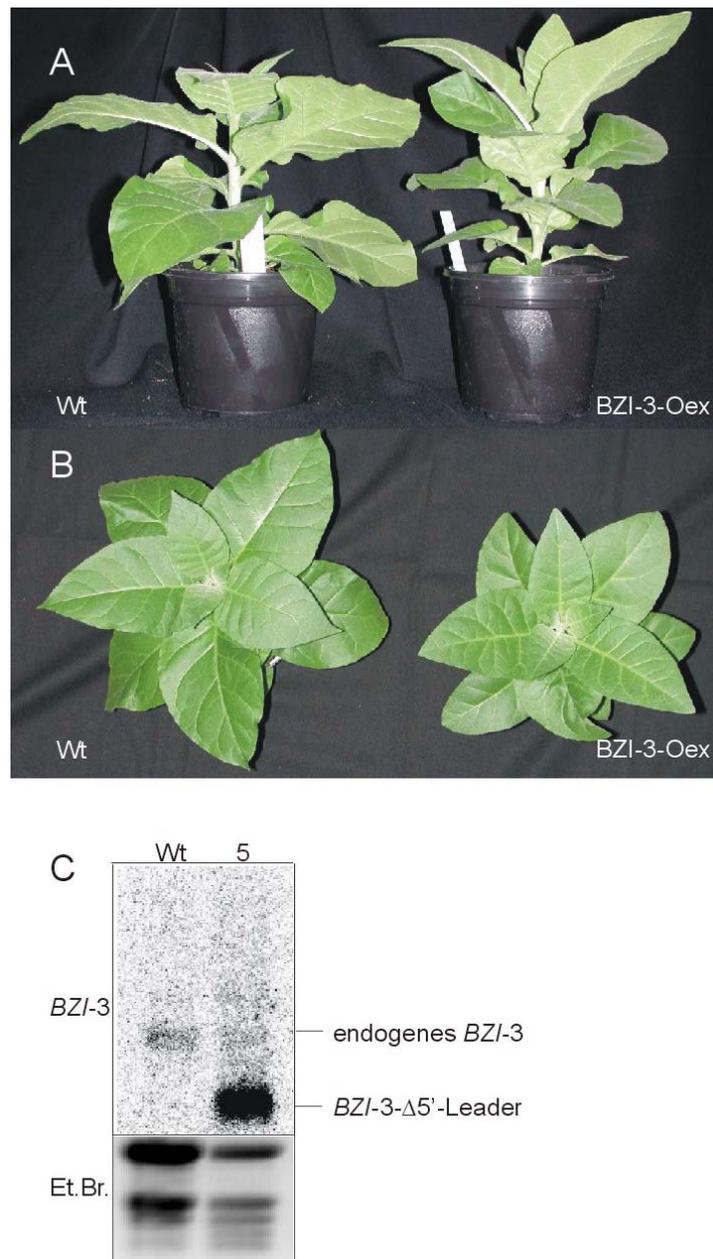


Abb. 4.18: Phänotyp der *BZI-3*-Oex Pflanze. Zum Vergleich ist auf der linken Seite die Wildtyppflanze abgebildet. **A:** Aufnahme von der Seite, **B:** Aufnahme von oben. **C:** Northern-Blot Analyse der Pflanze *BZI-3*-Oex#5 (5), als Vergleich wurde Wt RNA aufgetragen. Zur Hybridisierung wurde eine *BZI-3* Probe benutzt. Zur Überprüfung der Beladung ist das Ethidiumbromidbild (Et.Br.) wiedergegeben.

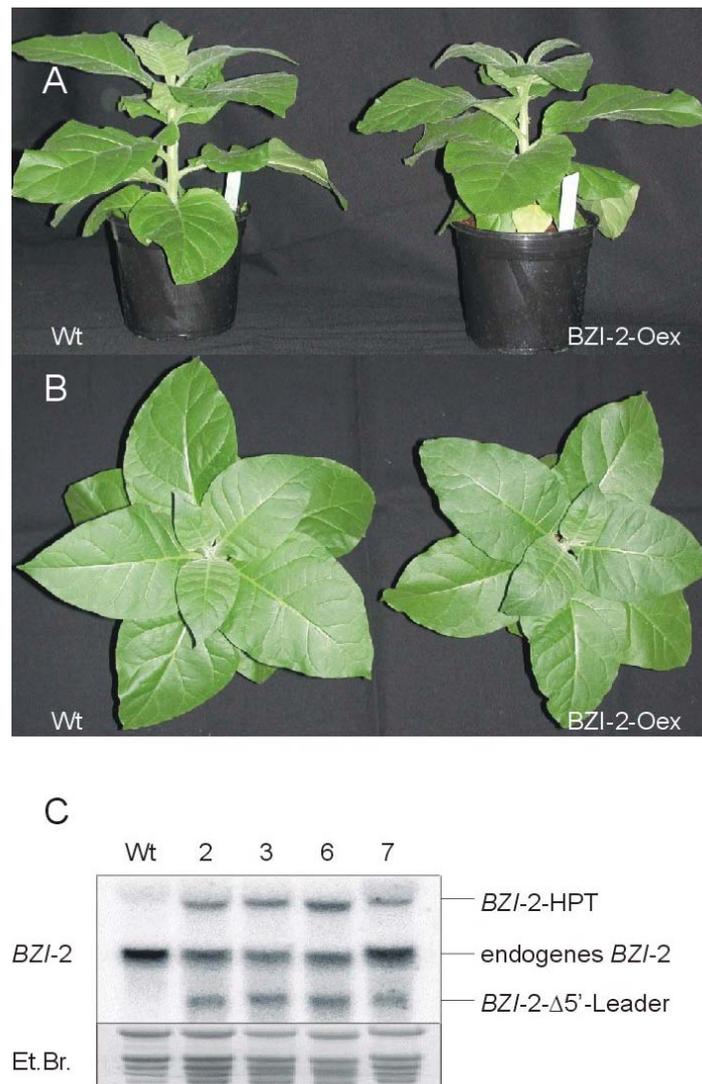


Abb. 4.19: Phänotyp der BZI-2-Oex Pflanze. Zum Vergleich ist auf der linken Seite die Wildtyppflanze abgebildet. **A:** Aufnahme von der Seite, **B:** Aufnahme von oben. **C:** Northern-Blot Analyse verschiedener konstitutiv BZI-2-Oex Pflanzenlinien, angegeben ist jeweils die Nummer der Pflanzenlinie. Als Vergleich wurde Wt RNA aufgetragen. Zur Hybridisierung wurde eine BZI-2 Probe benutzt. Zur Überprüfung der Beladung ist das Ethidiumbromidbild (Et.Br.) wiedergegeben.

4.3.4 Induzierbare Expression von BZI-2, BZI-3 und BZI-4 in transgenen Pflanzen

Neben den Linien, die das Transgen konstitutiv überexprimieren, wurden auch Linien erzeugt, in denen sich die Expression des Transgens durch Tetracyclin induzieren lässt. Dazu wurden Hö20.20 Pflanzen, die das TetR Protein exprimieren, verwendet. Der Gentransfer wurde durch *Agrobacterium tumefaciens* vermittelt. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Expression des Transgens nach Induktion mit Tetracyclin wieder.

Tabelle 2: Übersicht über die relative Expressionsstärke ausgewählter transgener induzierbarer Pflanzenlinien. +: Linie exprimiert das Transgen, ++: Linie exprimiert das Transgen sehr stark.

Linie	Expression	Linie	Expression	Linie	Expression
Hö BZI-2#5	+	Hö BZI-3#1	+	Hö BZI-4#1	++
Hö BZI-2#6	+	Hö BZI-3#2	+	Hö BZI-4#2	+
Hö BZI-2#7	++	Hö BZI-3#3	+	Hö BZI-4#4	++
Hö BZI-2#12	++	Hö BZI-3#4	++	Hö BZI-4#7	++
Hö BZI-2#13	+			Hö BZI-4#12	++
				Hö BZI-4#15	++

Bei der Analyse der konstitutiv *BZI-2* überexprimierenden Linien war zu beobachten, dass das endogene *BZI-2* Transkript in den *BZI-2*-Oex Pflanzen geringer exprimiert wurde. Zur Überprüfung der negativen Wirkung des endogenen *BZI-2* Transkripts auf die Expression des Transgens wurde ein Versuch mit dem Tetracyclin induzierbaren System (Gatz et al., 1992) durchgeführt. Beim Test der Hö-*BZI-2* Linien ist aufgefallen, dass bei Induktion der transgenen Genexpression durch Tetracyclin in sieben von zehn Linien die Expression des endogenen Transkripts nach vier Stunden leicht zurückgegangen war (Daten nicht gezeigt). Mit einer dieser Linien, Hö *BZI-2*#7 wurde dieses Experiment mit früheren Zeitpunkten wiederholt (Abb. 4.20A). Auch hier sieht man den leichten Rückgang des endogenen Transkriptes nach Expression des Transgens.

Diese Beobachtung, dass die Expression des Transgens sich negativ auf die Expression des endogenen Transkripts auswirkt, konnte auch für *BZI-3* gezeigt werden. Die Expression des endogenen Transkriptes in der konstitutiven Linie *BZI-3*-Oex#5 ist deutlich zu erkennen (Abb. 4.20B). Auch in der induzierbaren Linie Hö *BZI-3*#4 sieht man den Rückgang des endogenen Transkriptes nach Induktion des Transgens. Bei den *BZI-4*-Oex Pflanzen sieht man einen solchen Effekt nicht. Es kommt somit sowohl bei den *BZI-2*-Oex als auch bei den *BZI-3*-Oex Pflanzen zu einer Art negativen Autoregulation der Genexpression.

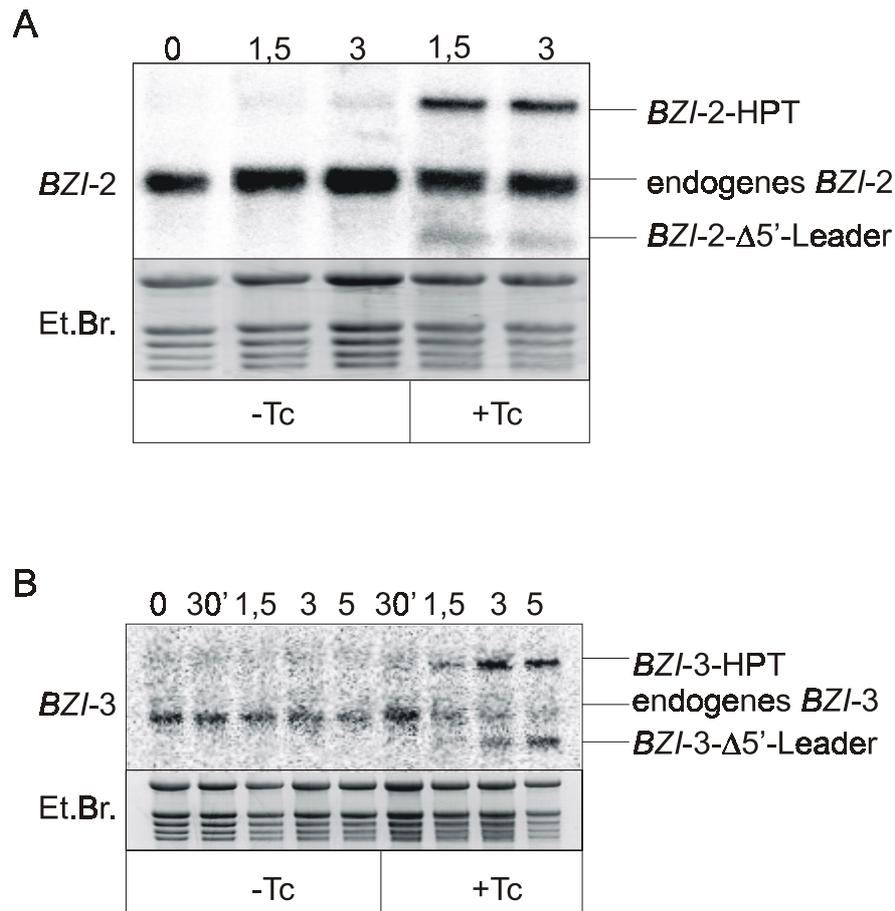


Abb. 4.20: A: Northernblot-Analyse der induzierbaren Expression des *BZI-2* Transgens in der Linie Hö2#7. Blattscheiben wurden auf Kaliumphosphatpuffer aufschwimmen gelassen. Die Induktion erfolgte mit Chlortetracyclin (1 mg/l). Angegeben ist der Zeitpunkt der Probenentnahme nach Beginn der Tetracyclininduktion. Als Hybridisierungssprobe wurde ein *BZI-2* Fragment benutzt. Zur Überprüfung der Beladung ist das Ethidiumbromidbild (Et.Br.) wiedergegeben. B: Northernblot-Analyse der induzierbaren Expression des *BZI-3* Transgens in der Linie Hö3#4. Blattscheiben wurden auf Kaliumphosphatpuffer aufschwimmen gelassen. Die Induktion erfolgte mit Chlortetracyclin. Angegeben ist der Zeitpunkt der Probenentnahme nach Beginn der Tetracyclininduktion. Als Hybridisierungssprobe wurde ein *BZI-3* Fragment benutzt. Zur Überprüfung der Beladung ist das Ethidiumbromidbild (Et.Br.) wiedergegeben.

4.4 Analyse der Regulation potentieller Zielgene durch die BZI-Proteine

4.4.1 Untersuchung der Beteiligung der BZI-Proteine an der Genregulation im Rahmen der Auxinantwort

4.4.1.2 BZI-3-Oex-Pflanzen zeigen eine verringerte Auxinantwort

BZI-1- Δ N Pflanzen zeigen einen pleiotropen Phänotyp mit verringerter Apikaldominanz, kürzeren Internodien, verkürzten Blütenorganen, gewellten, dunkelgrünen Blättern. Es konnte von Heinekamp (2002) gezeigt werden, daß BZI-1- Δ N Pflanzen eine veränderte Auxinantwort zeigen. So ist bei der Regeneration von Blattscheiben auf Medium mit hoher Auxinkonzentration die Wurzelinduktion stark reduziert, die Kallusbildung ist vermindert. Die durch Cytokinin vermittelte Sprossinduktion ist nicht beeinflusst. Der Auxingehalt in der Pflanze ist unverändert. Auch BZI-3-Oex und BZI-4-Oex Pflanzen zeigen einen Phänotyp mit kürzeren Internodien. Um zu untersuchen, ob diese Pflanzen in ihrer Auxinantwort verändert sind, wurde ein Epinastie-Test durchgeführt (Keller und Van Volkenburgh, 1997). Dazu ließ man Blattstreifen (1 mm x 10 mm), die zwischen den Adern eines Blatts geerntet wurden, auf MES-Puffer mit 10 μ M NAA schwimmen. Nach 24 h konnte man bei den Blattstreifen der Wildtyp-Pflanze eine typische epinastische Krümmung beobachten, die auf der auxinbedingten Zellstreckung in der Epidermis und im Palisadenparenchym beruht (Abb. 4.21). Deutlich sah man, daß sich die Blattsegmente der BZI-1- Δ N Pflanzen kaum krümmen, die Auxinantwort ist also in diesen Pflanzen geringer. Die BZI-2-Oex Blattsegmentstreifen krümmten sich stark, dagegen krümmten sich BZI-3-Oex Blattsegmentstreifen kaum, BZI-4-Oex zeigte eine normale Krümmung. BZI-3-Oex Pflanzen zeigen also eine verminderte Auxinantwort.

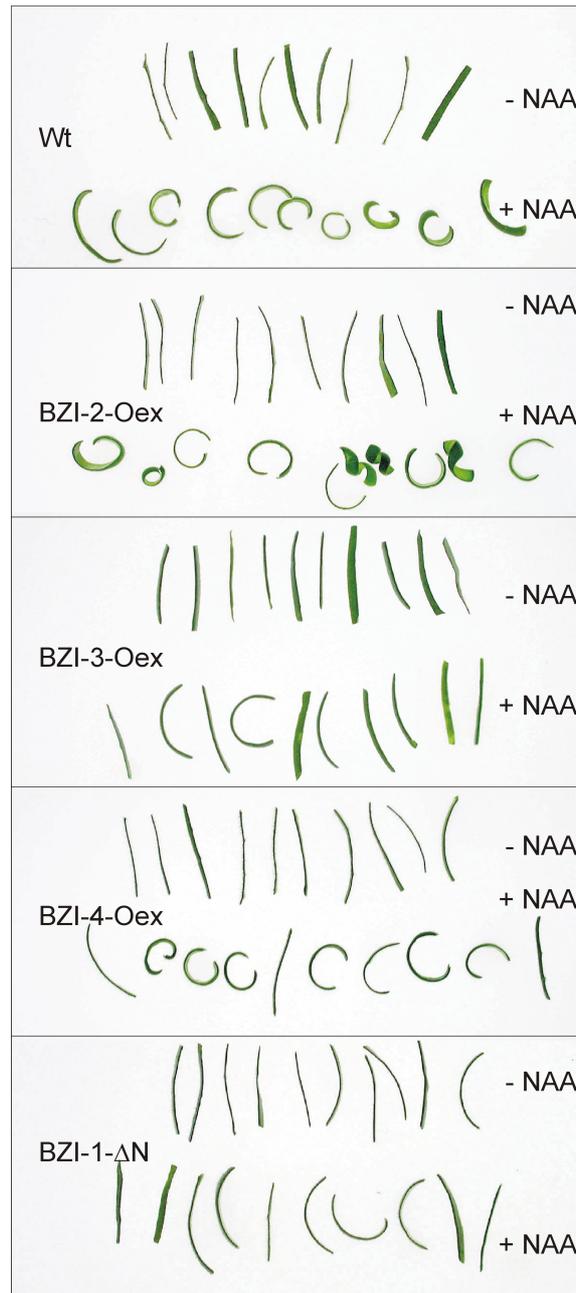


Abb. 4.21: Epinastieeffekt in Blattsegmenten durch Auxin in verschiedenen transgenen Linien. A: Wt, B: BZI-2-Oex, C: BZI-3-Oex, D: BZI-4-Oex, E: BZI-1ΔN. Das Foto wurde nach 24 Stunden Inkubation der Blattsegmente in MES-Puffer (-NAA) bzw. MES-Puffer mit 10 μ M NAA (+NAA) aufgenommen. Die Krümmung ist dabei ein Maß für die Auxinantwort.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen im Epinastietest, zeigte die Organogenese auf Wurzelinduktionsmedium eine normale Regeneration der Wurzeln von BZI-2-Oex und BZI-4-Oex Pflanzen. Die Regenerationsexperimente mit der Linie BZI-3-Oex#5 bestätigten das Ergebnis aus dem Epinastietest: die auxininduzierte Regeneration von Wurzeln war stark vermindert. Auch die Kallusentwicklung war schwächer. Die cytokininbedingte Sprossinduktion war aber nicht betroffen (Abb. 4.22).

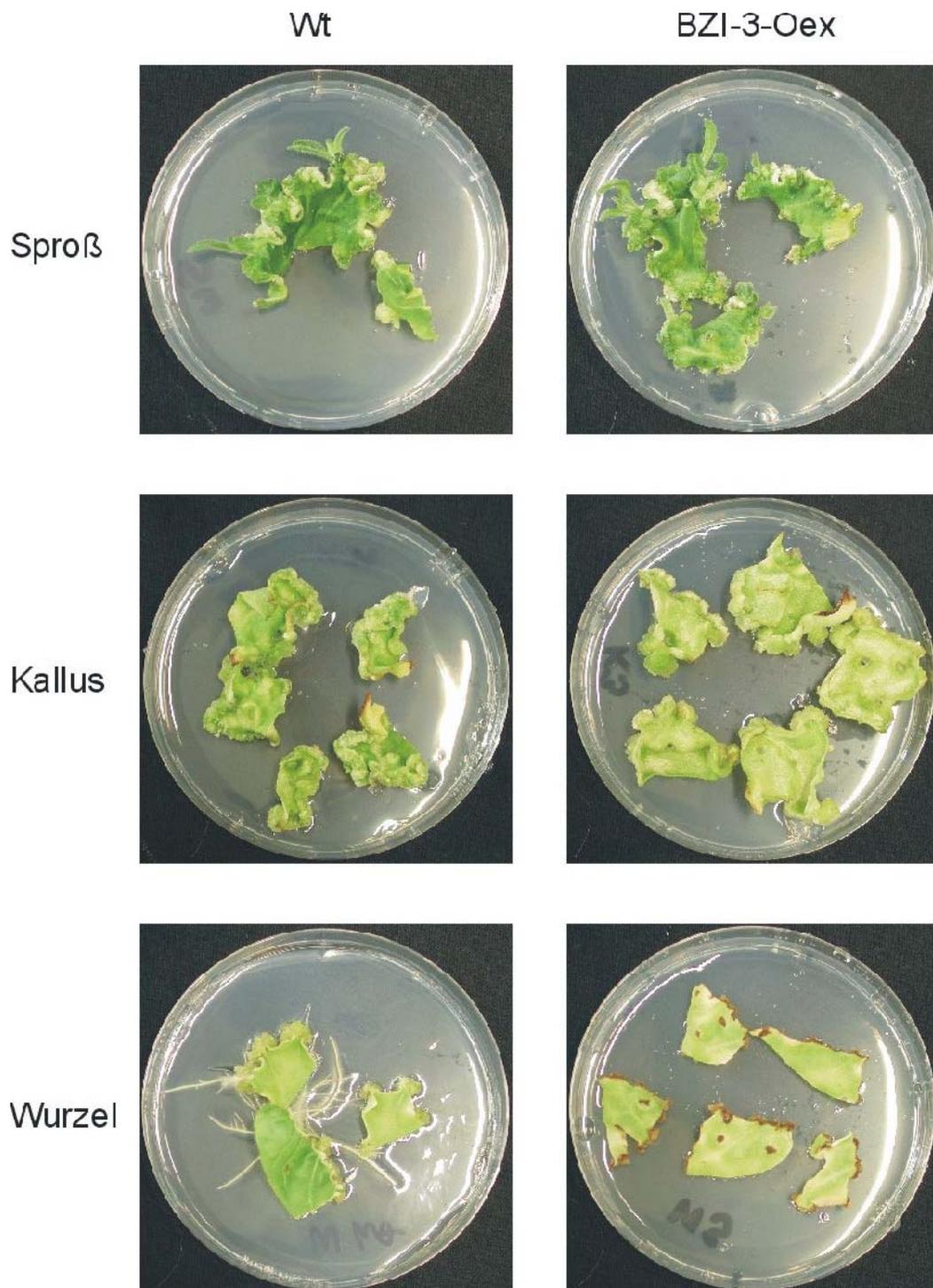


Abb. 4.22: Hormonregulierte Organogenese an Tabak-Blattscheiben. Auf der linken Seite ist der Wildtyp abgebildet, auf der rechten Seite die Pflanze BZI-3-Oex. Sproß: Sproßinduktionsmedium (MS-Medium mit 0,2 mg/l NAA und 1 mg/l 6-BAP). Kallus: Kallusinduktionsmedium (MS-Medium mit 3 mg/l NAA, 1 mg/l 6-BAP). Wurzel: Wurzelinduktionsmedium (MS-Medium mit 0,3 mg/l NAA und 0,02 mg/l 6-BAP).

4.4.1.2 Die BZI-Proteine binden an das E1-Element im Tabak *GH3* Promotor *in vitro*

GH3 ist ein Gen, dessen Induzierbarkeit durch Auxin gut charakterisiert ist (Roux und Perrot-Rechenmann, 1997). Die genaue Funktion von *GH3* konnte bisher noch nicht aufgeklärt werden. Heinekamp (2002) konnte zeigen, daß BZI-1 einen Effekt auf die Transkription des *GH3*-Gens hat. Bei Pflanzen, die BZI-1- Δ N überexprimieren ist nach Auxingabe die Induktion der *GH3* Expression geringer, eine Fusion aus BZI-1 mit dem starken Transkriptionsaktivator VP16 zeigt dagegen eine stärkere Expression von *GH3* nach Auxingabe.

Um zu überprüfen, ob BZI-1 auch an Promotorelemente des *N.t. GH3* Gens bindet, wurden GRA (Gel Retardations Aanalysen) mit dem E1-Fragment und dem D1-Fragment des *N.t. GH3* Promotors durchgeführt. Die verwendeten Fragmente sind in Abbildung 5.23A dargestellt. Das E1-Fragment beinhaltet eine hybride G/C-Box. Das D1-Fragment umfaßt eine G-Box. In GRA bindet BZI-1 sowohl an das E1-Fragment als auch an das D1-Fragment. Eine Mutation des ACGT Kernmotivs verhindert die Bindung vollständig (Abb. 5. 23B).

A

```

ctatagggctcgagcggccgcccggggagggtgatcgtccatgattaatgaagccaagagaaaaggaattag
actttttcttttgagttttgattaattgagatgcggtgttattgaatttttaattaaaaaatgctact
tactatttactcattattagctcacataagtttcaatacagtgattcactttttattagcttatatac
ctctttctaattaatgtgctaattcaaacatggtaatcttttgatctattattttatgattttctgaaga
aacttaaagtatttttattatataccttatacataaatatgaatcattttgtttgatgatgcatgcttg
tattaaacaagagcaacagtttttggtttctcctgcttgattatacttacataatacatgaagaaaaac
acattatttacgtgtctgttttctgtaagatattgatgcctttatattttatataatgaataaatataataa
      pGH3-cip-fw
aattataacgaaaaactcgtaggagggtcatgtagcatgctttagcaacggaaactatatagtgggctatc
gtaatcgcggtccaacaattttaccagaaaggagcagtggtgggtggcgattcacgccacagtccaaaac
caacccccgaaccccgatatagctgtaccccagctgaggtggctatataatggggcccacatgcaccctaa
      E1                                D1
attaggggttatgtagacgtgggtggacccactttggtcccctcttcaccaaacacgtggatattacaaa
      D1                                D4
atggtccacggccccctcgtcgacttccttccaaccttccaaccttcttttggctctttgcccgcctttttg
gggccactatgacatggcacctgacgtgtcacccccactcttcctcctcctcctatttaagcacctctt
      pGH3-cip-rev
actccatatttgcaccaccatttcccttggttatctaattccaacacaaaactcaagtagtttattacaa
actctttctcttttctcacaacagtaaatattttataagctttgataaattaccttaaatatg

```

B

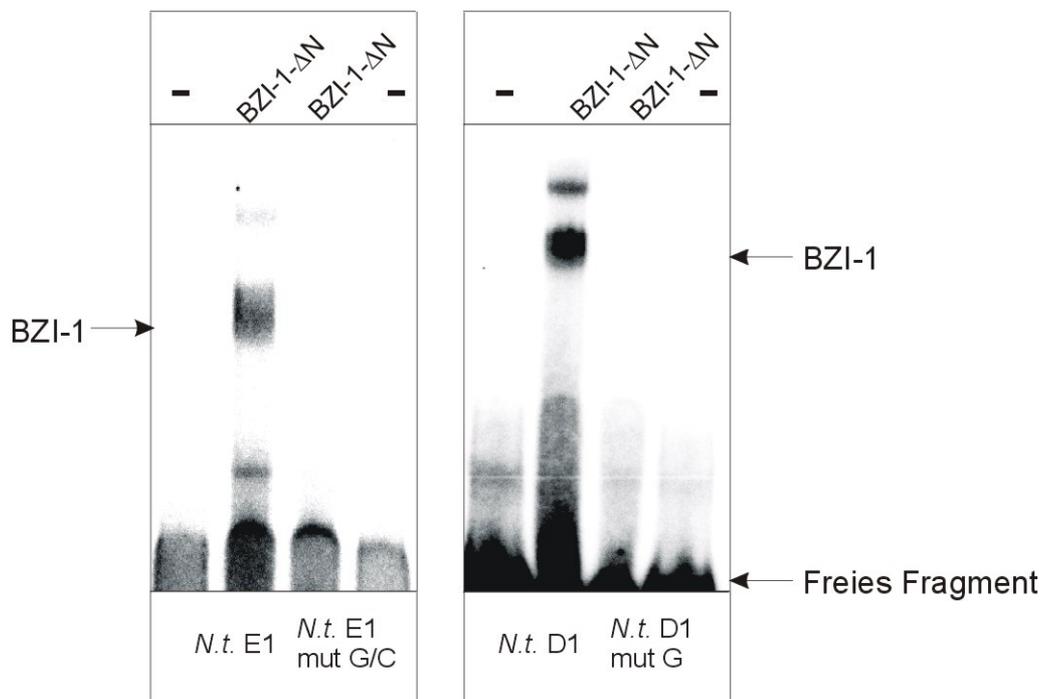


Abb. 4.23: A: Sequenz des Tabak-*GH3*-Promotors (Perrot-Rechenmann und Froissard, unveröffentlicht). ACGT-Elemente sind durch hellgraue Unterlegung gekennzeichnet, AuxREs sind mit dunkelgrauer Unterlegung hervorgehoben. Die Fragmente D1, E1 und D4 sind durch Balken gekennzeichnet. Die Lage der Primer p-gh3-cip-fw und p-gh3-cip-rev ist eingezeichnet. Das Start-ATG der Translation ist durch Fettdruck hervorgehoben. B: GRA der Bindung von rekombinantem BZI-1-ΔN Protein an das D1 und E1-Element des Tabak *GH3*-Promotors. Zur Kontrolle wurde das jeweilige ACGT-Element mutiert. -: Ansatz ohne BZI-1.

Um die Bindespezifität der verschiedenen BZI Homo- und Heterodimere zu untersuchen, wurde die Bindung von BZI-2, BZI-3 und BZI-4 Homodimeren und die jeweiligen

Heterodimere mit BZI-1 an das E1-Fragment im *N.t. GH3* Promotors getestet. Die für die GRA verwendeten Oligos entsprachen der *N.t. GH3* Sequenz, nur Bereiche, die ACGT-ähnlich waren wurden mutiert. Um die verschiedenen BZI-Proteine in GRA zu benutzen, wurden sie *in vitro* translatiert. Der Erfolg der Translation wurde mit Hilfe von [³⁵S]-Methionin markierten Parallelansätzen mittels SDS-PAGE überprüft (Abb. 4.24B). Es lassen sich aber keine absoluten quantitativen Aussagen machen, welche Menge des Proteins später in GRA eingesetzt wurde, da eine Proteinmessung nicht durchführbar ist und es sich darüber hinaus um Parallelansätze der verwendeten *in vitro* Translatate handelt. Daher erlauben die Ergebnisse, die in diesen GRA gewonnen wurden, lediglich semiquantitative Aussagen darüber, ob ein Protein besser oder schlechter an die *cis*-Elemente bindet. Es zeigte sich, daß alle BZI-Proteine in GRA an die *cis*-Elemente im *GH3* Promotor binden (Abb. 4.24A). Die Homodimere von BZI-1 binden nur relativ schwach an dieses Fragment. In Ansätzen mit Cotranslataten von BZI-1 mit BZI-2 oder BZI-4 wird das BZI-1 Homodimer komplett aus der Bindung verdrängt, lediglich das Heterodimer bindet die DNA. Im Ansatz mit BZI-3 kann man auch das Homodimer von BZI-1 in der Bindung nachweisen. Die Heterodimere aus BZI-1 und BZI-2, BZI-3 oder BZI-4 binden die DNA sehr stark. Auch die Homodimere von BZI-2, BZI-3 und BZI-4 binden an die G/C-Box im *GH3* Promotor. In Ansätzen mit Cotranslataten von BZI-2, BZI-3 oder BZI-4 mit BZI-1 werden die Homodimere aber von den Heterodimeren verdrängt. Alle BZI-Proteine binden also an die G/C-Box im *GH3* Promotor. Der *GH3* Promotor könnte somit ein potentieller Zielpromotor aller BZI-Homo- und Heterodimere sein.

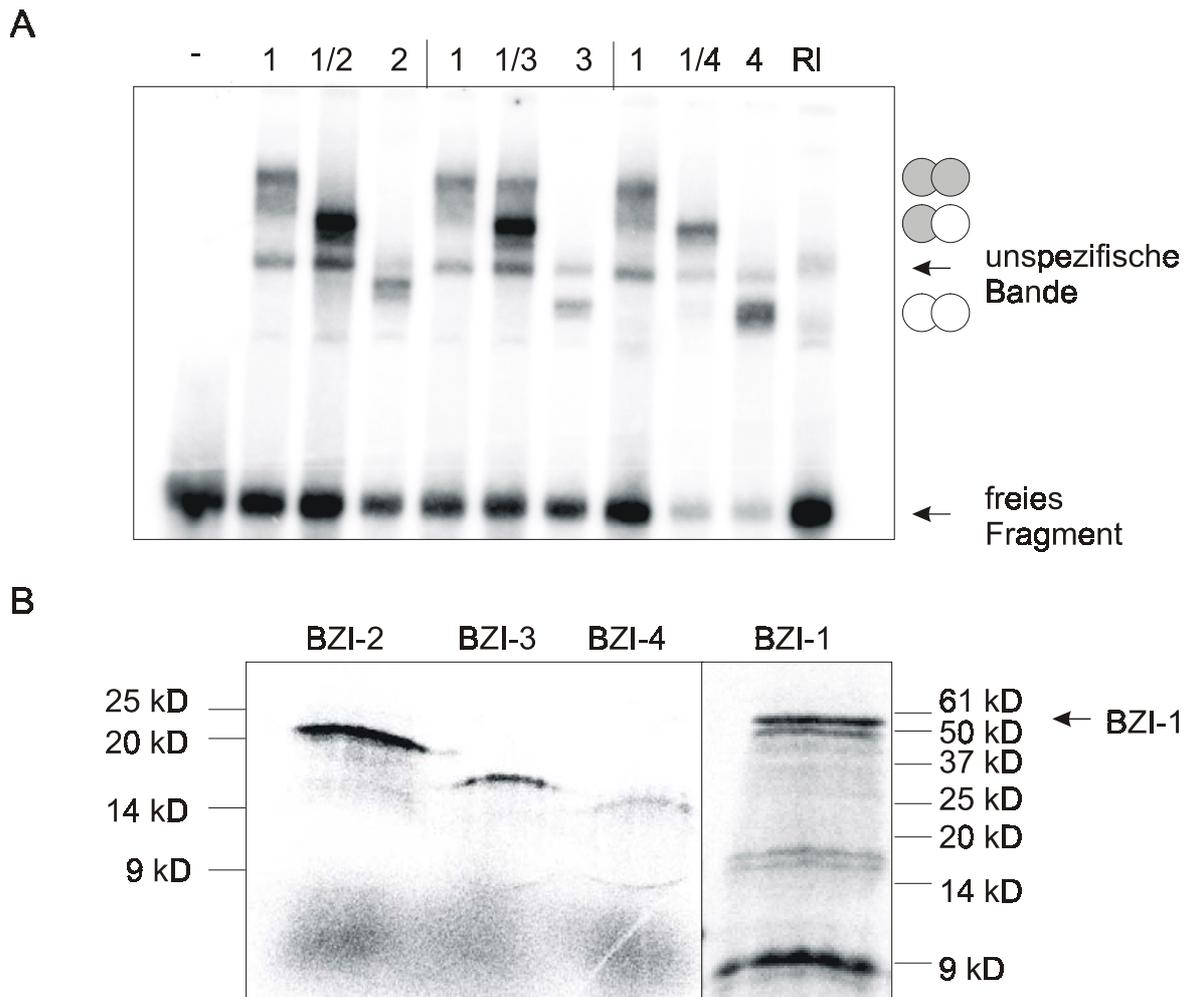


Abb. 4.24: A: Bindungsstudien der BZI-Proteine an das E1-Element des GH3-Promotors. Eingesetzt wurden jeweils 2 μ l *in vitro* translatiertes Protein und 4 μ l Fragment. -: Ansatz ohne Protein, 1: BZI-1 Protein, 1/2: BZI1/BZI-2 Cotranslatat, 2: BZI-2, 1/3: BZI-1/BZI-3 Cotranslatat, 3: BZI-3, 1/4: BZI-1/BZI-4 Cotranslatat, 4: BZI-4, RI: Ansatz mit Reticulocytensextrakt. An der rechten Seite wurden die Dimere schematisch dargestellt. Weiß: BZI-1, grau: BZI-2/-3 oder BZI-4. B: SDS-PAGE zur Überprüfung der *in vitro* Translation. Aufgetragen wurden jeweils [5 μ l 35 S]-Methionin markierte *in vitro* Translatate. Die unterschiedlichen Banden beruhen auf der Erkennung aller ATGs und jeweiligem Translationsstart.

4.4.1.3 GH3 ist ein Zielgen von BZI-1 *in vivo*

In Northern Blot Analysen konnte von Heinekamp (2002) gezeigt werden, dass BZI-1 einen Einfluß auf die Expression des *GH3* Gens hat. In GRA bindet BIZ-1 sowohl an das D1- als auch an das E1-Fragment im *GH3* Promotor. Die bisherigen Daten deuten darauf hin, dass *GH3* ein potentiell Zielgen von BZI-1 Homo- oder Heterodimeren ist. Um das *in planta* zu zeigen, wurde eine Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) durchgeführt.

Die ChIP ist eine Technik, mit der *in vivo* die Bindung von Proteinen an DNA untersucht werden kann (Hecht et al., 1996, Johnson et al. 2001). Diese Technik eignet sich daher auch

gut, um zu zeigen, daß BZI-1 an *cis*-Elemente im Promotor von *GH3 in planta* bindet. Eine schematische Versuchsabfolge ist in Abbildung 4.25 dargestellt.

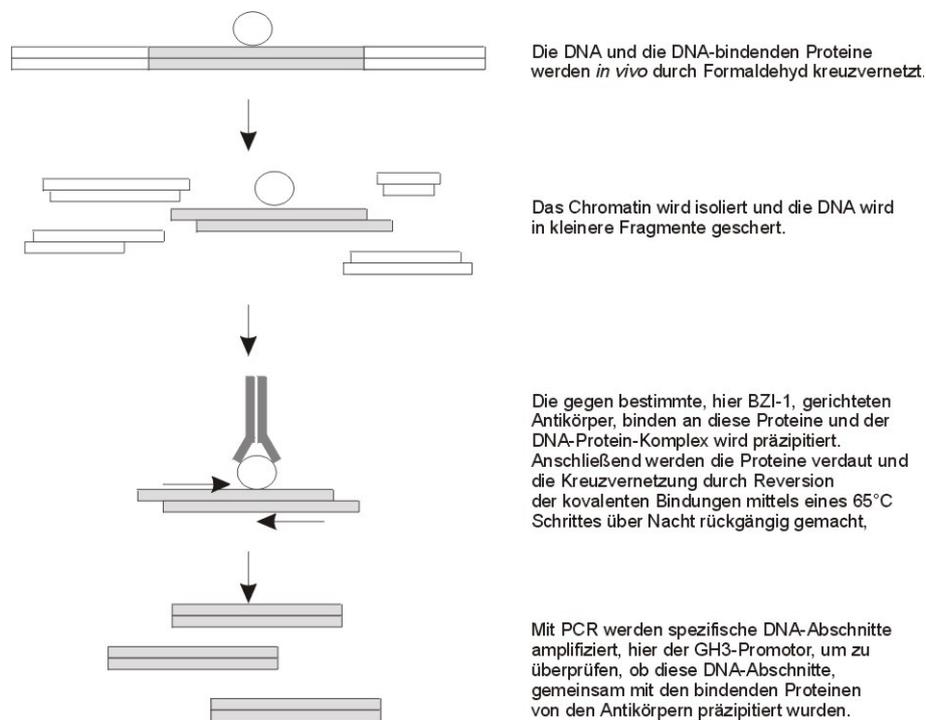


Abb. 4.25: Schematische Darstellung der Versuchsabfolge der Chromatin Immunopräzipitation. Genauere Angaben sind der Beschriftung im Diagramm zu entnehmen.

Um die DNA-Proteinkomplexe *in situ* zu gewinnen, wird zunächst die DNA mit den bindenden Proteinen kreuzvernetzt, in dem man ganze Pflanzenblätter mit Formaldehyd behandelt (Solomon und Varshavsky, 1985; Solomon et al., 1988). Aus diesen Blättern wird anschließend das Chromatin mit den bindenden Proteinen isoliert. Durch Scherung und Ultraschallbehandlung wird das Chromatin in Fragmente zerlegt. Dieses Chromatin mit den kreuzvernetzten Proteinen wird nun in der ChIP eingesetzt: Die Inkubation mit spezifischen Antikörpern, hier α BZI-1 Antikörper führt zur Bindung der Antikörper an die spezifischen Proteine, hier BZI-1, die mit dem Chromatin kreuzvernetzt sind. Mittels an Sepharose gekoppeltes Protein A werden die Antikörper-Protein-DNA-Komplexe isoliert. Protein A ist ein Zellwandprotein aus *Staphylococcus aureus*, dass spezifisch an die Fc-Domäne vieler Antikörper bindet. Nach mehreren Waschschrinen werden die Protein-DNA-Komplexe eluiert. Die Proteine werden mit Proteinase K verdaut, die kovalenten Bindungen werden durch eine 16 stündige Inkubation bei 65 °C rückgängig gemacht (Solomon und Varshavsky, 1985; Solomon et al., 1988). Anschließend wird die DNA aufgereinigt. Promotorfragmente (hier des *GH3* Promotors) können nun mit spezifischen Primern (hier pGH3-cip-fw und pGH3-cip-rev) amplifiziert werden.

Über eine PCR mit den Primern pGH3-cip-Fw und pGH3-cip-rev konnte ein *GH3* Promotorfragment amplifiziert werden, das sämtliche ACGT-Elemente des Promotors umfasst (Abb. 4.26). Das *GH3* Promotorfragment wurde also gemeinsam mit BZI-1 Protein unter Verwendung des α BZI-1-Antikörpers präzipitiert. Die Kontrollexperimente unter Verwendung des Präimmunserums, des α HA-Antikörpers, der das BZI-1 Protein nicht erkennt, und der Ansatz ohne Antikörper, lediglich mit Protein A gekoppelter Sepharose ergaben keine Präzipitation des *GH3* Promotors, die PCR zeigt keine Bande. Als Positivkontrolle für die PCR diente der Vektor pttGH3gus (Heinekamp, unveröffentlicht), der den *GH3* Promotor kodiert. Dieser Versuch wurde dreimal mit gleichem Ergebnis wiederholt.

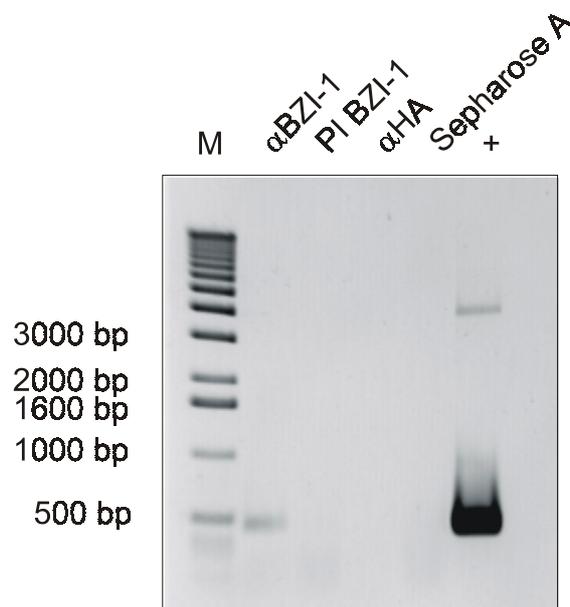


Abb. 4.26: Chromatin Immunopräzipitation: Elektrophoresegel der PCR-Proben. Die PCR wurde auf verschiedenen Ansätzen jeweils mit den Primern p-gh3-cip-fw und p-gh3-cip-rev durchgeführt, die den *GH3* Promotor amplifizieren. M: Größenstandard, α BZI-1: ChIP-Ansatz mit α BZI-1-Antikörper, PI BZI-1: ChIP-Ansatz mit Präimmunserum PI BZI-1, α HA: ChIP-Ansatz mit α HA-Antikörper, dieser Antikörper erkennt das BZI-1-Protein nicht, Sepharose: ChIP-Ansatz mit alleiniger Verwendung von Protein A gekoppelter Sepharose.

Eine Kontroll-PCR mit Primern gegen eine Region des *PMT2* (Putrescine N-Methyltransferase; Riechers und Timko, 1999) Promotors ergab keine Bande (Daten nicht gezeigt). Die Bindung von BZI-1 an den *GH3* Promotor ist also spezifisch. Dieses ChIP-Experiment beweist, daß BZI-1 *in vivo* an den *GH3* Promotor bindet. *GH3* ist also ein Zielgen von BZI-1. Dabei könnte BZI-1 als Homo- oder Heterodimer an den *GH3* Promotor binden. In Zukunft soll daher die Bindung der anderen BZI-Proteine an diesen Promotor untersucht werden, wenn geeignete Antikörper vorliegen.

4.4.1.4 Analyse der Aktivierungseigenschaften von BZI-1 in Protoplasten

In Hefe konnte ein Fusionsprotein aus BZI-1 und der GAL4BD die Transkription der Reportergene aktivieren. Deletiert man den Aminoterminus, so verliert BZI-1 seine aktivierende Wirkung. Um die Wirkung von BZI-1 auf die Transkription in Protoplasten zu überprüfen, wurden transiente Analysen in BY-2 Zellen durchgeführt (Abb. 4.27). Dabei sollte neben den Aktivierungseigenschaften von BZI-1 auch die *in vivo* Bindung an das ACGT-Element des E1-Fragmentes im *GH3* Promotors untersucht werden.

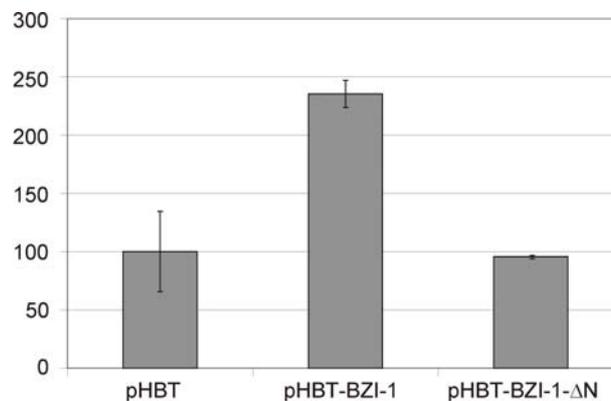


Abb. 4.27: Aktivierungseigenschaften von BZI-1 *in planta*. Verschiedene BZI-1-Derivate (BZI-1 und BZI-1-ΔN) wurden transient in BY-2-Zellen exprimiert. Aufgetragen ist die relative GUS-Aktivität und die Standardabweichung. Dazu wurde die GUS-Aktivität in der Kontrolltransformation mit dem Vektor pHBT ($\text{pmol MU mg Protein}^{-1}\text{min}^{-1}$) gleich 100 gesetzt. Die Werte der anderen Ansätze wurden dazu ins Verhältnis gesetzt. Transformationansätze: pHBT: 40 μg Vektor pHBT, pHBT-BZI-1: 20 μg pHBT-BZI-1 20 μg Vektor pHBT, pHBT-BZI-1-ΔN: 20 μg pHBT-BZI-1-ΔN und 20 μg pHBT ($n=2$), vom Reporterplasmid wurden jeweils 10 μg eingesetzt.

Als Reporterplasmid diente das Plasmid pHB4xE1-gus (Heinekamp, unveröffentlicht). Es handelt sich hierbei um ein Derivat des Plasmids pHB (Sprenger-Haussels und Weisshaar, 2000), dieses Plasmid kodiert für ein GUS-Reportergen, welches unter der Kontrolle eines Minimalpromotors steht. In die „Multiple Cloning Site“ (mcs) dieses Vektors wurde 4 mal das E1-Fragment des Tabak *GH3* Promotors inseriert (Heinekamp, unveröffentlicht). Als Effektorplasmide dienten die Vektoren pHBT-BZI-1 und pHBT-BZI-1-ΔN (Heinekamp, unveröffentlicht). Diese Plasmide exprimieren BZI-1-Derivate unter der Kontrolle des HBT-Promotors (Sheen, unveröffentlicht). Der HBT-Promotor ist ein Derivat des CaMV 35S-Promotors und vermittelt eine starke Expression des Transgens in Pflanzenzellen. Damit ist ein hohes Expressionsniveau der Effektorproteine gewährleistet. Als Negativkontrolle dient die Transformation mit dem Vektor pHBT ohne Insert. Die Transformation der BY-2 Zellen mit pHBT-BZI-1 führt zu einer deutlichen Steigerung der relativen GUS-Aktivität um das

2,5- bis dreifache. Fehlt der Aminoterminus, so geht die Aktivität des Reportergens auf die Hintergrundaktivität zurück. Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass BZI-1 *in planta* an das E1-Fragment des *GH3* Promotors bindet und die Expression des GUS-Reporters aktiviert. Dabei wirkt der Aminoterminus als Aktivierungsdomäne.

4.4.1.5 Analyse der Aktivierungseigenschaften von BZI-2 in Protoplasten

Im Hefe-System konnte gezeigt werden, dass BZI-2 ein Aktivator der Transkription ist. Eine Fusion aus GAL4BD und BZI-2 konnte die Expression der Reportergene unter der Kontrolle von UAS aus den Promotoren von GAL4 abhängig regulierten Genen zu aktivieren. Die aktivierende Wirkung von BZI-2 sollte auch in Protoplasten gezeigt werden (Abb. 4.28). Dazu wurde das gleiche System verwendet wie am Beispiel von BZI-1 unter 4.4.1.4 beschrieben. Im Versuch wurden 4 verschiedene Ansätze getestet. Als Kontrollen dienten die Transformationen des leeren pHBT-Vektors. Die Transformation mit dem Vektor pHBT-BZI-1 zeigt eine signifikante Steigerung der relativen GUS-Aktivität um das dreifache. Werden die Pflanzenzellen mit den beiden Vektoren pHBT-BZI-2 und pHBT-BZI-1 transformiert, so kann ebenfalls eine um das dreifache erhöhte relative GUS-Aktivität beobachtet werden. Die Aktivierung ist aber vergleichbar mit der Wirkung von BZI-1 alleine, es kommt also zu keiner stärkeren Reportergenaktivität durch das BZI-1/BZI-2 Heterodimer oder einem additiven Effekt durch das BZI-2 Homodimer. Transformation mit dem Vektor pHBT-BZI-2 führt zu einer leichten Aktivierung des Reportergens.

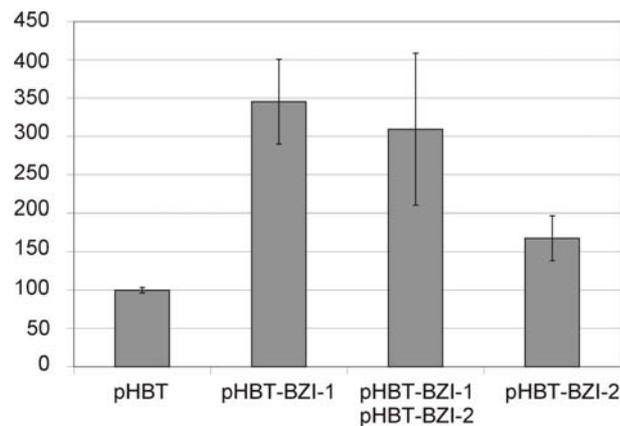


Abb. 4.28: Transiente Expression von BZI-1 und BZI-2 in BY2-Zellen. Aufgetragen ist die relative GUS-Aktivität und die Standardabweichung. Dazu wurde die GUS-Aktivität in der Kontrolltransformation mit dem Vektor pHBT ($\text{pmol MU mg Protein}^{-1}\text{min}^{-1}$) gleich 100 gesetzt. Die Werte der anderen Ansätze wurden dazu ins Verhältnis gesetzt. Als Kontrolle wurde der leere Vektor verwendet. pHBT: 40 μg Vektor pHBT, pHBT-BZI-1: 20 μg pHBT-BZI-1 20 μg Vektor pHBT, pHBT-BZI-1/pHBT-BZI-2: 20 μg pHBT-BZI-1 und 20 μg pHBT-BZI-2, pHBT-BZI-2: 20 μg pHBT-BZI-2 und 20 μg Vektor pHBT ($n=2$), vom Reporterplasmid wurden jeweils 10 μg eingesetzt.

Es zeigt sich also, daß BZI-2 ein schwacher Transkriptionsaktivator in Protoplasten ist. Er kann die Transkription eines Reportergens durch Bindung an das E1-Fragment im *GH3* Promotor und Aktivierung induzieren.

4.4.1.6 Analyse der Aktivierungseigenschaften von BZI-3 in Protoplasten

Die Analyse der Aktivierungseigenschaften von BZI-3 erfolgte wie oben beschrieben in BY-2-Zellen. Als Effektorplasmid diente das Plasmid pHBT-BZI-3. Als Kontrollen dienten die Transformationen mit dem leeren Vektor pHBT und mit pHBT-BZI-1 (Abb. 4.29). Der Ansatz, der sowohl mit pHBT-BZI-3 als auch mit pHBT-BZI-1 transformiert wurde, zeigt eine deutliche Steigerung der relativen GUS-Aktivität um das dreifache des Hintergrundwertes. Dieses entspricht der Aktivierung im Ansatz mit BZI-1 alleine. Es kommt also zu keiner verstärkten Enzymaktivität durch zusätzliche Gabe von pHBT-BZI-3 und damit der Möglichkeit der Heterodimerisierung. Transformation mit dem Vektor pHBT-BZI-3 führt ebenfalls zu einer erhöhten relativen GUS-Aktivität auf das doppelte des Hintergrundwertes. BZI-3 kann also eine leichte Reportergenaktivität bewirken, indem es an das E1-Fragment des *GH3* Promotors bindet und die Transkription aktiviert.

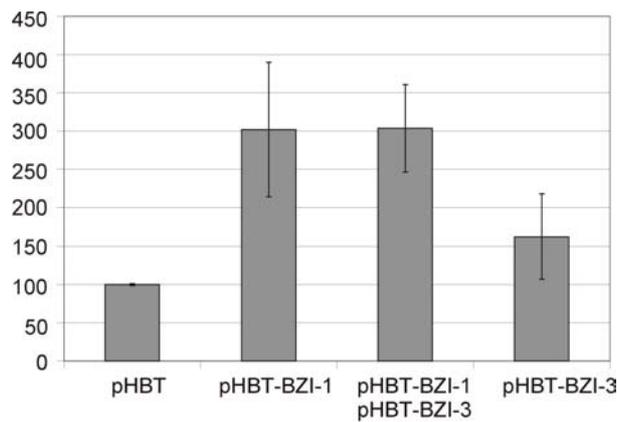


Abb. 4.29: Transiente Expression von BZI-1 und BZI-3 in BY2-Zellen. Aufgetragen ist die relative GUS-Aktivität und die Standardabweichung. Dazu wurde die GUS-Aktivität in der Kontrolltransformation mit dem Vektor pHBT ($\text{pmol MU mg Protein}^{-1}\text{min}^{-1}$) gleich 100 gesetzt. Die Werte der anderen Ansätze wurden dazu ins Verhältnis gesetzt. Als Kontrolle wurde der leere Vektor verwendet. pHBT: 40 μg Vektor pHBT, pHBT-BZI-1: 20 μg pHBT-BZI-1 20 μg Vektor pHBT, pHBT-BZI-1/pHBT-BZI-3: 20 μg pHBT-BZI-1 und 20 μg pHBT-BZI-3, pHBT-BZI-3: 20 μg pHBT-BZI-3 und 20 μg Vektor pHBT ($n=2$), vom Reporterplasmid wurden jeweils 10 μg eingesetzt.

4.4.1.7 Analyse der Aktivierungseigenschaften von BZI-4 in Protoplasten

Transiente Analysen in BY-2 Zellen wurden auch eingesetzt, um die Aktivierungseigenschaften von BZI-4 *in planta* zu testen. Dabei wurde das Plasmid pHBT-BZI-4 als Effektorplasmid verwendet (Abb. 4.30). Als Kontrollen wurde auch hier die Transformation mit dem leeren Vektor pHBT und mit pHBT-BZI-1 benutzt. Es zeigt sich, daß die Cotransformation der Zellen mit pHBT-BZI-1 und pHBT-BZI4 zu einem Rückgang der relativen GUS-Aktivität auf das Niveau des Hintergrundes führt. Die Transformation der Pflanzenzellen mit pHBT-BZI-4 führt ebenfalls zu keiner erhöhten relativen GUS-Aktivität. Da in GRA gezeigt werden konnte, daß BZI-4 an das E1-Fragment des *GH3* Promotors bindet, muß diese Inhibierung der Enzymaktivität mit den Aktivierungseigenschaften von BZI-4 zusammenhängen. BZI-4 ist also wahrscheinlich ein transkriptioneller Repressor *in planta*.

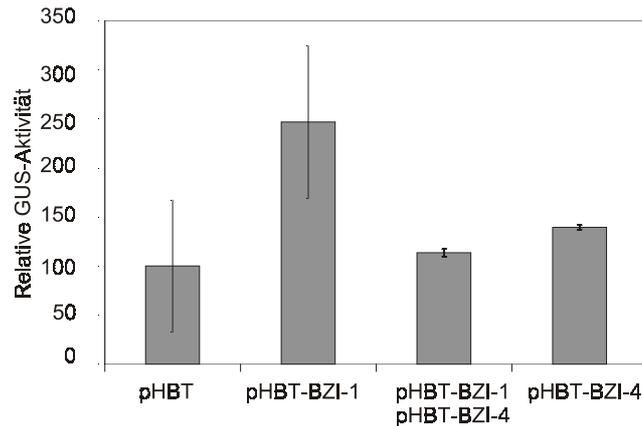


Abb. 4.30: Transiente Expression von *BZI-1* und *BZI-4* in BY2-Zellen. Aufgetragen ist die relative GUS-Aktivität und die Standardabweichung. Dazu wurde die GUS-Aktivität in der Kontrolltransformation mit dem Vektor pHBT ($\text{pmol MU mg Protein}^{-1}\text{min}^{-1}$) gleich 100 gesetzt. Die Werte der anderen Ansätze wurden dazu ins Verhältnis gesetzt. Als Kontrolle wurde der leere Vektor verwendet. Die eingesetzte Gesamtmenge Effektorplasmid betrug je Ansatz $20 \mu\text{g}$ ($n=2$), vom Reporterplasmid wurden jeweils $10 \mu\text{g}$ eingesetzt.

4.4.1.8 Überexpression von *BZI-2*, *BZI-3* und *BZI-4* hat keinen Effekt auf die *GH3* Transkription nach Auxingabe

Die Daten aus GRA und transienten Analysen in BY-2 Zellen deuten darauf hin, daß die Transkriptionsfaktoren *BZI-2*, *BZI-3* und *BZI-4* eine Rolle bei der Regulation des *GH3* Gens spielen. Die Proteine können *in vitro* und *in vivo* an das E1-Element binden und dort die Transkription positiv oder negativ regulieren. *GH3* könnte somit ein potentielles Zielgen der *BZI*-Transkriptionsfaktoren sein.

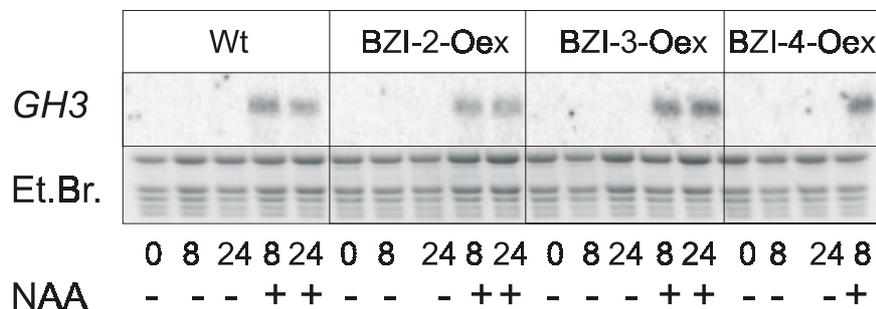


Abb. 4.31: Northern Blot Analyse der Expression von *GH3* in verschiedenen Pflanzenlinien mit (+) oder ohne (-) NAA. Blattscheiben ließ man auf Kaliumphosphatpuffer schwimmen. Angegeben ist der Zeitpunkt der Probenentnahme nach Beginn des Versuchs in Stunden. Wt: Wildtyp, *BZI-2*-Oex, *BZI-2* überexprimierende Pflanze, *BZI-3*-Oex, *BZI-3* überexprimierende Pflanze, *BZI-4*-Oex, *BZI-4* überexprimierende Pflanze. Als Hybridisierungsprobe wurde ein *GH3* Fragment benutzt. Zur Überprüfung der Beladung ist das Ethidiumbromidbild (Et.Br.) wiedergegeben (Experiment 2 mal mit identischem Ergebnis durchgeführt).

Für BZI-1- Δ N konnte von Heinekamp (2002) gezeigt werden, dass dieses Derivat die Expression von *GH3* nach Auxingabe reprimiert. In Northern-Analysen, bei denen die *GH3* Expression in Blattscheiben der BZI-2-Oex, BZI-3-Oex und BZI-4-Oex Pflanzen nach Gabe von NAA untersucht wurde, konnte aber kein Effekt auf die *GH3* Expression beobachtet werden (Abb. 4.31).

4.4.2. Untersuchung der Beteiligung der BZI-Proteine an der Genregulation im Rahmen der Blütenentwicklung

4.4.2.1 Ektopische Überexpression von *BZI-3* und *BZI-4* führt zu einer Verkleinerung der Blütenorgane

Die Blüten der BZI-2-Oex Pflanzen sehen phänotypisch wie der Wildtyp aus. BZI-3-Oex Pflanzen aber zeigen einen veränderten Blütenphänotyp. Die gesamte Blüte ist um 15 % kürzer als die Wildtypblüte, die Staminalänge ist um 19 % und Stempellänge um 13 % verkürzt. Diese Verkürzung der Blütenorgane zeigt sich in allen BZI-3-Oex Linien. Bei den BZI-4-Oex Pflanzen kann man die gleiche Beobachtung machen: die Blüten sind um 15% kürzer, was sich auch an den einzelnen Blütenorganen zeigt. Die Verkürzung der Stamina beträgt 25%, die Stempellänge ist um 22% reduziert (Abb. 4.32).

Auch die BZI-1- Δ N Pflanzen zeigen eine Blüte mit verkürzten Blütenorganen. Zum Vergleich sind in Abbildung 4.32 daher die Werte der BZI-1- Δ N Pflanze, die von Heinekamp (2002) ermittelt wurden, aufgetragen. Die Blüten von BZI-1- Δ N weisen eine deutlich verringerte männliche Fruchtbarkeit auf: die Pollen sind zu großem Teil degeneriert, die Pflanze setzt nach Selbstung kaum Samen an. Wenn der Stempel mit Wildtyp-Pollen befruchtet wird, kommt es aber zu normalen Samenansatz. Also ist lediglich die männliche Fertilität beeinträchtigt. Die mikroskopische Untersuchung der Pollen der BZI-3-Oex und BZI-4-Oex Pflanzen ergab, daß die Pollen wie Wildtyp Pollen aussehen. Der Samenansatz dieser Pflanzen nach Selbstung ist normal.

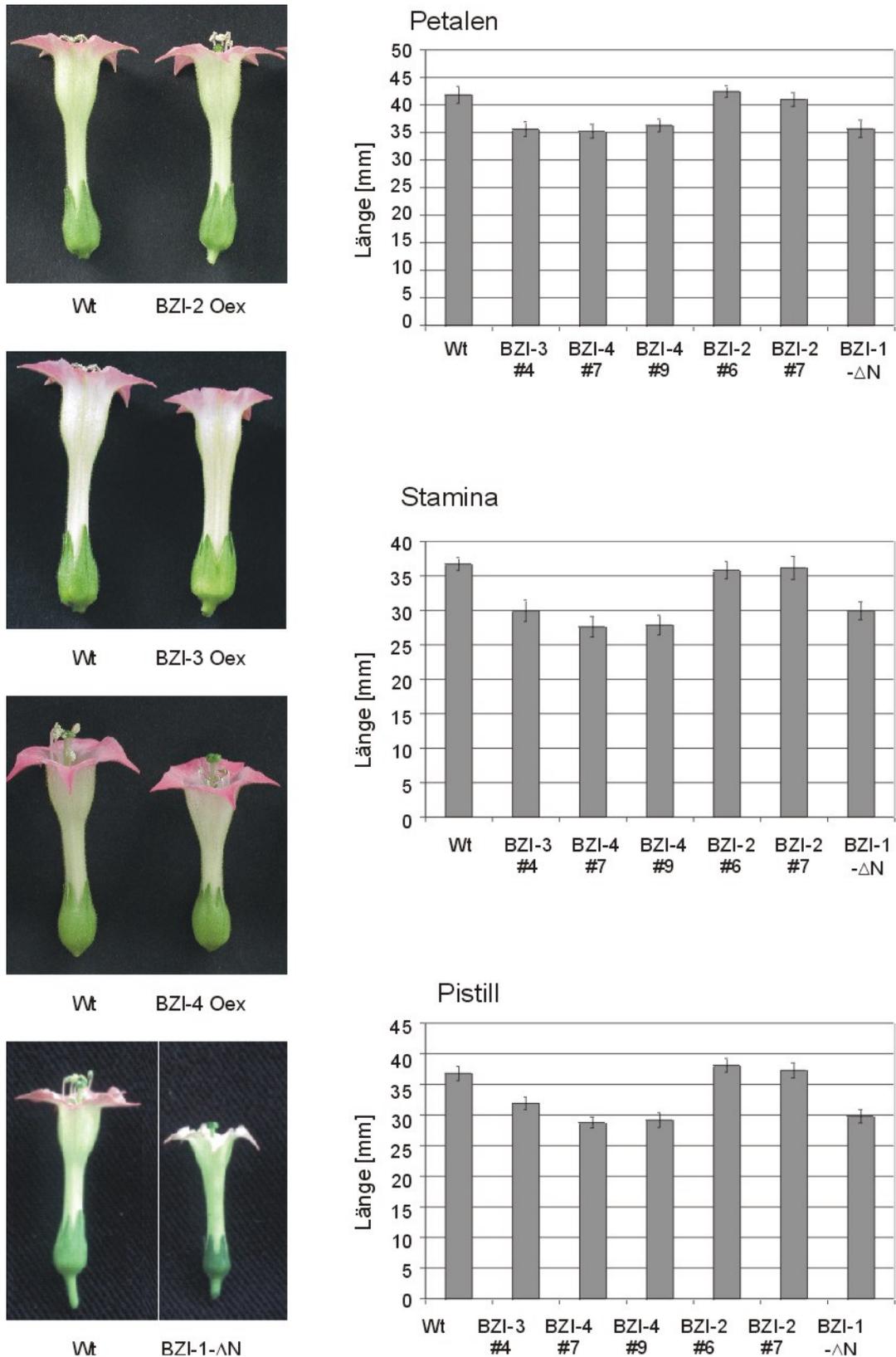


Abb. 4.32: Phänotyp der Blüten verschiedener transgener Linien. A: Abbildung der Blüten. Auf der linken Seite ist jeweils der Wildtyp abgebildet. B: Quantitative Bestimmung der Länge der Blütenorgane Petalen, Sepalen, Stamina und Pistill. Anzahl der Messungen: Wt: n=27, BZI-3-Oex: n=41, BZI-4-Oex#7: n=12, BZI-4-Oex#9: n=27, BZI-2-Oex#6: n=22, BZI-2-Oex#7: n=16. Die Werte für BZI-1-DN wurden von Thorsten Heinekamp ermittelt und sind als Vergleich aufgetragen (Strathmann et al., 2001).

4.4.2.2 BZI-1- Δ N und BZI-4-Oex Pflanzen zeigen eine veränderte Blütenstands- morphologie

Die Anordnung der BZI-1- Δ N und BZI-4-Oex Pflanze sind im Gegensatz zu den Blüten des Wildtyps traubenförmig angeordnet (Abb. 4.33). Die Blütenstände der BZI-3 und BZI-2-Oex Pflanzen zeigten keine Veränderungen zum Wildtypblütenstand.

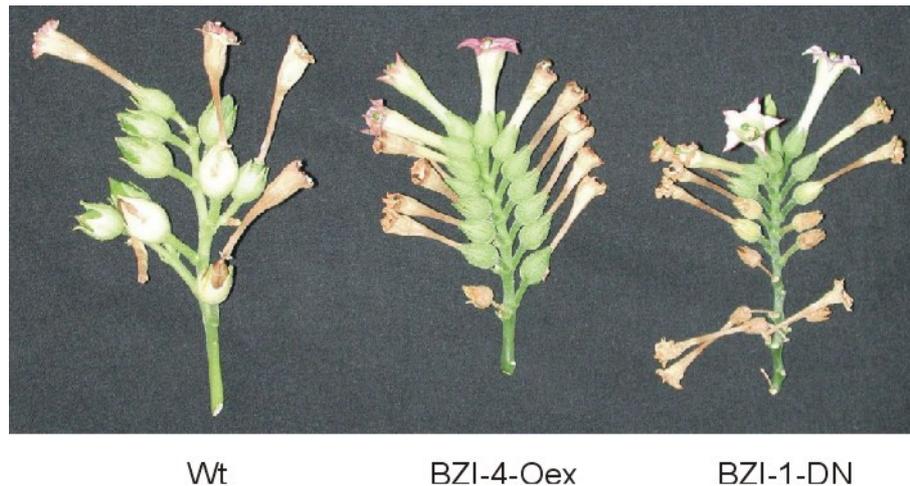


Abb. 4.33: Phänotyp der Blütenstände der Pflanzen BZI-4-Oex und BZI-1- Δ N. Zum Vergleich ist auf der linken Seite der Blütenstand des Wildtyps aufgetragen.

Deutlich ist auch die Verkleinerung der Samenkapseln der BZI-1- Δ N Pflanze zu erkennen, in diesen sind nur wenige Samen enthalten. Die Größe der Samenkapseln der BZI-4-Oex Pflanze entspricht den Wildtypsamenkapseln. Der Samengehalt entspricht ebenfalls der Wildtyp Pflanze.

4.4.2.3 Die *NIN88* Expression wird in BZI-4-Oex Pflanzen reprimiert

Die BZI-1 Δ N Pflanzen haben zum großen Teil sterile Pollen. Es konnte von Goetz et al., (2001) gezeigt werden, daß die „Antisense“-Expression einer antherenspezifischen extrazellulären Invertase, der *NIN88*, zu Pollensterilität führt (Goetz et al., 2001). Extrazelluläre Invertasen spalten das Disaccharid Saccharose in Fruktose und Glucose. Diese Einfachzucker können dann über spezielle Hexosetransporter in die Zellen aufgenommen werden. Die Reprimierung des Enzyms *NIN88* führt zu einer Unterversorgung des Pollens mit Zucker und somit zur Sterilität. Um zu überprüfen, ob BZI-1 einen Einfluß auf die Expression der *NIN88* hat, wurden daher von Heinekamp (2002) Northern-Blot Analysen

durchgeführt (Abb. 4.34A). Es zeigte sich, daß in BZI-1- Δ N Pflanzen die Menge an *NIN88* RNA deutlich reduziert ist. Die Pollensterilität der BZI-1 Δ N Pflanzen könnte also auf einem reprimierenden Effekt des dominant-negativen BZI-1-Derivates auf die *NIN88* Expression beruhen. Dabei kann zwischen einer Wirkung des BZI-1 Homodimers und von Heterodimeren aus BZI-1 und BZI-2, BZI-3 und BZI-4 nicht unterschieden werden, da das dominant negative BZI-1- Δ N Derivat auch die Aktivierungseigenschaften und Bindenspezifität dieser Heterodimere beeinflusst.

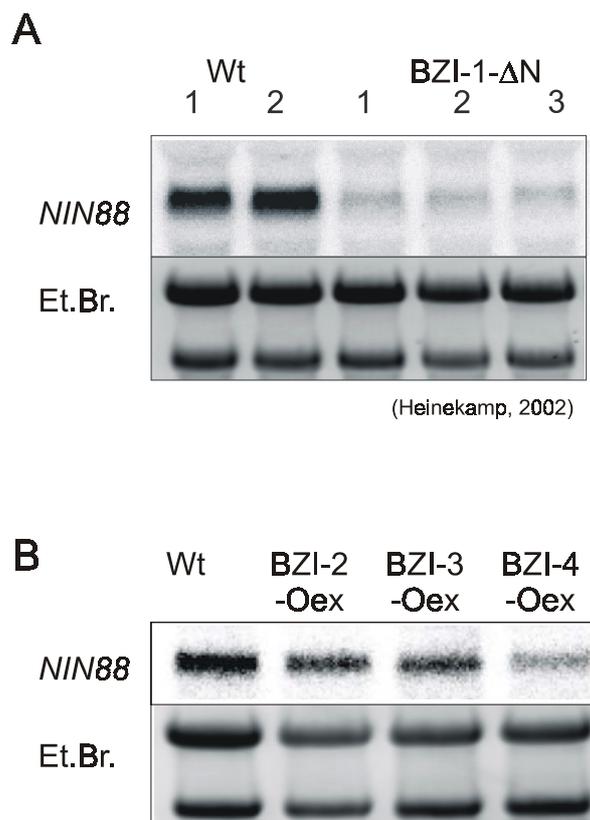


Abb. 4.34: Expression des *NIN88* Transkriptes in Blüten verschiedener transgener Pflanzenlinien. **A:** Northern-Blot von Heinekamp (2002), zum Vergleich. **B:** BZI-2/-3/-4-Oex Pflanzen. Wt: Wildtyp, BZI-1- Δ N: transgene Pflanze, die das BZI-1- Δ N Derivat exprimiert. BZI-2-Oex, BZI-2 überexprimierende Pflanze, BZI-3-Oex, BZI-3 überexprimierende Pflanze, BZI-4-Oex, BZI-4 überexprimierende Pflanze. Als Hybridisierungsprobe wurde ein *NIN88* Fragment benutzt. Zur Überprüfung der Beladung ist das Ethidiumbromidbild (Et.Br.) wiedergegeben.

Um zu untersuchen, ob die Überexpression der *BZI-2*, *BZI-3* und *BZI-4* Transkripte eine Auswirkung auf die Expression der *NIN88* hat, wurde eine Northern Blot Analyse in Blüten durchgeführt (Abb. 4.34B). Deutlich ist zu erkennen, dass *BZI-4* Überexpression zu einer verringerten Expression der *NIN88* RNA führt. Überprüfung der *BZI-4* Expression mit einer *BZI-4* Sonde zeigte, dass *BZI-4* in diesen Blüten deutlich überexprimiert wird (Daten nicht gezeigt).

4.4.2.4 BZI-4 bindet an eine G-Box im *NIN88* Promotor

Um zu untersuchen, ob *NIN88* ein Zielgen der BZI Transkriptionsfaktoren ist, wurden GRA mit zwei ACGT Elementen im *NIN88* Promotor durchgeführt, die sich beide in relativer Nähe (290 bzw. 342 Bp stromaufwärts des Start ATGs der Translation) zum Translationsstart befinden (Abb. 4.35). Zum einen handelt es sich um eine klassische G-Box (cACGTg) zum anderen handelt es sich um eine hybride T/G-Box (tACGTg). Der gesamte *NIN88* Promotor (Goetz et al., 2001) ist im Anhang dargestellt.

```

.....cgtaaaaaaaaaaaaaatTTAAAAATATATTTTAAAAACCGACCAACTTTAG
tcggTTTTTTGGTCGATTTTTGACCGACCAAAGTTGGTCGGTCGACCTTGGTCGGTTTT
tgccgaatttctagtagtgaccgaacctgtaagcttcgggagaaatttGTATATGTAT
                                     G-Box-Fragment
atgtctatataccttaaaatgattaattTAAAGCACGTGGCACCCTGAATACTAGAAGCCT G-Box
                                     G/T-Box-Fragment                (-342)
TTAGGGGCACTAGATGAGCAGAATAACGTGTTCTCGTCGCGTAAAAATCTTGGATCCGCC G/T-Box
                                     (-290)

tatgatggtaagtacttcttctgTCCTTAATCAGAGGTTTCGACTTCGAGCTCCAGATATA
aactatagactcgtctttatagcacctTTTAATAAGACTATGACTTCATCTGATTTCTCT
ataaatactcctcaagctttcggttcttctccattgttcagtttcttctccacatcaca
gaagtgaaaacaaaacaagaagaagaagaagaagaaaaataaagagtttctgtcaaatta
agtc caatagggaaaatg

```

Abb. 4.35: Ein Ausschnitt des Promotorbereiches des Gens *NIN88* (Goetz et al., 2001). ACGT-Elemente wurden durch graue Unterlegung hervorgehoben. Die in GRA eingesetzten Fragmente wurden durch Balken gekennzeichnet. Das Start-ATG der Translation ist durch Fettdruck hervorgehoben. Die Positionen der ACGT Elemente stromaufwärts von diesem Start-ATG der Translation sind auf der rechten Seite eingetragen.

In diesen GRA wurden *in vitro* translatierte BZI-Proteine eingesetzt. Um die Qualität der *in vitro* Translatate zu überprüfen wurden GRA mit einer G/C-Box durchgeführt, da Strathmann und Kuhlmann nachweisen konnten (unveröffentlicht), dass die Proteine in GRA an dieses Fragment gut als Homodimere binden können. In Abbildung 4.36A ist dieses Kontrollgel dargestellt. Man sieht deutlich die Bindung der Proteine an die G/C-Box. Die Bindung der Proteine führt zu einem veränderten Laufverhalten des radioaktiv markierten Fragmentes, eine Bindung wird sichtbar. Die Banden, die durch Besetzung der Fragmente mit BZI-2, BZI-3 und BZI-4 hervorgerufen werden, zeigen eine vergleichbare Intensität. Diese Proteine liegen also wahrscheinlich in vergleichbaren Mengen im *in vitro* Translatat vor. Die Bande von BZI-1 ist schwächer. Das kann zum einen ein Hinweis darauf sein, dass BZI-1 Protein weniger stark im *in vitro* Translatat vorhanden ist. Die Beobachtung stimmt aber auch damit überein, dass BZI-1 Homodimere keine bevorzugte Dimerisierungsform sind, und die Bindung an DNA daher schwächer ist. Insgesamt lassen sich mit dieser Methode der

Quantifizierung lediglich semiquantitative Aussagen über den Proteingehalt von *in vitro* Translataten treffen.

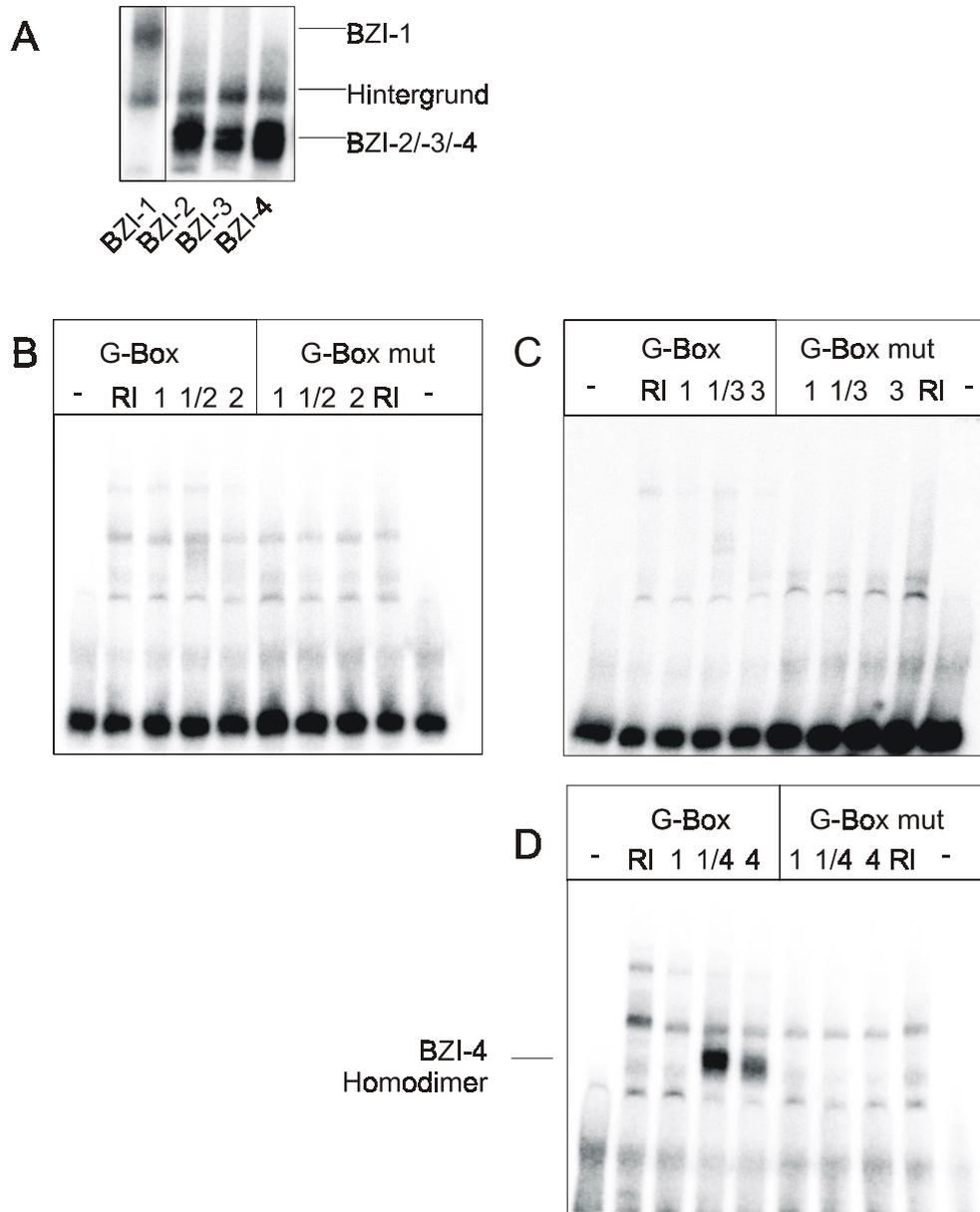


Abb. 4.36: Analyse der Bindung der BZI-Proteine an eine G-Box im *NIN88* Promotor. **A:** GRA zur Überprüfung der Extrakte, als radioaktiv markiertes Fragment wurde eine G/C-Box verwendet. **B:** Bindung von BZI-2 Homo- und BZI1/BZI-Heterodimeren. 1: BZI-1 Protein, 1/2 Cotranslatat von BZI-1 und BZI-2, 2: BZI-2 Protein. **C:** Bindung von BZI-3 Homo- und BZI-1/BZI-3 Heterodimeren. 1/3 Cotranslatat von BZI-1 und BZI-3, 3: BZI-3 Protein. **D:** Bindung von BZI-4 Homo- und BZI-1/BZI-4 Heterodimeren. 1/4 Cotranslatat von BZI-1 und BZI-4, 4: BZI-4 Protein. -: Ansatz ohne Protein, RI: Ansatz mit Reticulocytenextrakt. G-Box Mut: im ACGT-Motiv mutiertes Fragment.

Die GRA zeigen eine starke Bindung des BZI-4 Proteins an die G-Box im *NIN88* Promotor. Dabei kann lediglich die Bindung des Homodimers beobachtet werden, das Heterodimer von BZI-4 mit BZI-1 zeigt keine Bindung an die DNA. In der Spur 4, in der sowohl BZI-4 als

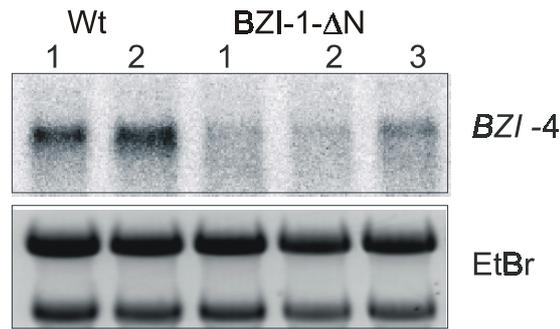
auch BZI-1 Protein vorliegt, kann man nur die Bindung des Homodimers beobachten. Eine Mutation im ACGT-Element verhindert die Bindung vollständig (Abb. 4.36). Die hybride G/T-Box wird nicht durch BZI-4 gebunden (Daten nicht gezeigt). BZI-2 und BZI-3 zeigen eine sehr schwache Bindung an die G-Box im *NIN88* Promotor, obwohl der Proteingehalt der *in vitro* Translatate etwa vergleichbar ist. Auch Versuche mit höheren Proteinmengen ergaben keine stärkere Bindung der Proteine an dieses Fragment (Daten nicht gezeigt). Das BZI-1 Homodimer und Heterodimere zwischen BZI-1 und BZI-2 oder BZI-3 zeigen keine Bindung an dieses Fragment. Die hybride G/T-Box wird von keinem der untersuchten Homo- und Heterodimere gebunden. BZI-4 Homodimere binden spezifisch an die G-Box im *NIN88* Promotor. Es handelt sich also bei *NIN88* um ein potentielles Zielgen von BZI-4.

4.4.3 Isolierung eines Promotorfragmentes von *BZI-4*

Es konnte in Zusammenarbeit mit Heinekamp und Kuhlmann (2002) gezeigt werden, daß BZI-1- Δ N einen direkten oder indirekten Effekt auf die *BZI-4* Expression hat (Abb. 4.37A). Die Expression von *BZI-4* geht in Blüten von BZI-1- Δ N Pflanzen zurück. Wenn es sich um eine direkte Regulation von *BZI-4* durch BZI-1 handelt, könnte *BZI-4* ein Zielgen von BZI-1 sein. Um zu untersuchen, ob *BZI-4* ein Zielgen von BZI-1 ist, ist es wichtig, den Promotor von *BZI-4* zu isolieren.

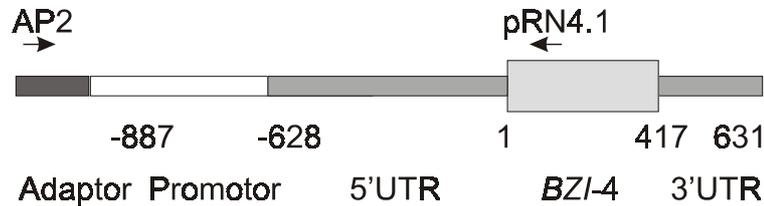
Es wurde hierzu mit dem Universal GenomeWalker Kit der Firma Clontech (2000) nach Anleitung gearbeitet. Zur Konstruktion der genomischen Banken wurde Gesamt-DNA einer SNN-Pflanze verwendet. Unter Verwendung von Adapterprimern (AP1 und AP2) und genspezifischen Primern ist es möglich, die Promotorbereiche von Genen zu isolieren. Zunächst wurden als genspezifische Primer Oligos verwendet, die im 5' untranslatiertem Bereich der *BZI-4* cDNA binden. Mit diesen Primern gelang es aber nicht, destinkte Banden zu amplifizieren. Unter Verwendung der Primer AP2 und pRNA.1 gelang es ein Fragment von 1200 Bp Länge zu isolieren. Von dieser Sequenz waren aber nur 259 Bp bisher unbekannt (Abb. 4.37B und C).

A



(Heinekamp, 2002)

B



C

AP2
→

```

ACTATAGGGCACGCGTGGTCGACGGCCCCGGGCTGGT
AAATGCAAATGAGCATGGTTAATTATATTATTAACA
ATAACTATTATAGGAAAGGAACGTTGGCGTAATTA
ATAATGTATTGGGAGATAACTCACATGTTCAACACG
TTAAAAACAATTAAGGGATAAACATTAATATATTAAT
TTTGGGAAATAATACTCATATAGTATTCCACAGCTG
TGCATTACAATTGTCATCACGAACATTCTTCTCGCC
TTCAAACCTATCCTGTACCAGTTCAAATCACCTTTC
AAAGGTT
  
```

Abb. 4.37: Isolierung eines BZI-4 Promotor Fragmentes. A: Northern Blot Analyse der BZI-4 Expression in BZI-1- Δ N Pflanzen (Heinekamp, 2002). Die Hybridisierung erfolgte mit einer NIN88 Sonde. Zur Überprüfung der Beladung ist das Ethidiumbromidbild (Et.Br.) wiedergegeben. **B:** Schematische Darstellung der BZI-4 Sequenz und der Lage der für die RAGE verwendeten Primer. **C:** Potentieller Promotorbereich von BZI-4. Die ACGT-Elemente sind durch graue Kästen hervorgehoben. Der Adapter ist grau unterlegt. Die Bindestelle des AP2 ist eingezeichnet.

In diesem Bereich befinden sich Sequenzabschnitte, die TATA-Box ähnlich aussehen. Es könnte sich also um einen Bereich des BZI-4 Promotors handeln. Es sind auch zwei ACGT-Elemente in diesem Sequenzabschnitt vertreten, eine T-Box und eine T/G-Box. Zur

Untersuchung, ob *BZI-4* ein Zielgen von BZI-1 ist, ist es unerlässlich, weitere Promotorabschnitte zu isolieren, was aus zeitlichen Gründen im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchführbar war. Mit dem isolierten Promotor können dann GRA durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob BZI-1 direkt an diesen Promotor des *BZI-4* Gens bindet. In transienten Assays lässt sich weiter untersuchen, ob BZI-1 direkt einen Einfluß auf die *BZI-4* Transkription hat. Eine ChIP unter Verwendung von Blüten-Chromatin und α BZI-1-Antikörper könnte die Bindung von BZI-1 an den *BZI-4* Promotor *in planta* zeigen.

5 Diskussion

5.1 BZI-2, BZI-3 und BZI-4 lassen sich der Gruppe S der bZIP-Transkriptionsfaktoren zuordnen

Im Hefe Two Hybrid Screen konnten drei verschiedene bZIP-Proteine isoliert werden, die mit BZI-1 interagieren. BZI-2, BZI-3 und BZI-4 lassen sich der Gruppe S (Jacoby *et al.*, 2002) der bZIP-Transkriptionsfaktoren zuordnen. Alle *Arabidopsis thaliana* Mitglieder dieser Gruppe S zeichnen sich durch einen sehr langen bZIP-Bereich über 8 bis 9 Wiederholungen und eine konservierte DNA-Bindedomäne aus. Auf genomischer Ebene weisen die für die Proteine der Gruppe S kodierenden Gene keine Introns auf. Der Homologievergleich der Aminosäuresequenz ausgewählter bZIP-Faktoren der Familie S ergab, dass man mindestens zwei Untergruppen unterscheiden kann, eine BZI-3 ähnliche Gruppe und eine BZI-2 ähnliche Gruppe (siehe Abb. 5.1). Die BZI-2 Gruppe unterscheidet sich von der BZI-3 Gruppe durch einen etwas verlängerten und serinreichen Aminoterminus. Serinreiche Regionen können aktivierende Funktion haben (Theill *et al.*, 1989). Die BZI-2 ähnlichen bZIP-Faktoren weisen außerdem eine C-terminale Extension auf. Die BZI-3 Gruppe hat als Charakteristikum einen konservierten C-Terminus. Dieser Carboxyterminus beinhaltet viele Proline. Prolinreiche Regionen können als Aktivierungsdomänen wirken (Schindler *et al.*, 1992, Sprenger-Haussels und Weisshaar, 2000). BZI-4 läßt sich der Gruppe der BZI-3 ähnlichen Proteinen zuordnen. BZI-2 weist die größten Homologien zu PPI1 aus Chili (Acc.#: AF127797), CPRF7 aus Petersilie (Rügner *et al.*, 2001), ATB2 und zwei weiteren Proteinen AtbZIP2 und AtbZIP44 aus *Arabidopsis thaliana* auf (Rook *et al.*, 1998a, Jacoby *et al.*, 2002). Die Aminosäureidentitäten sind in Tabelle 5.1 wiedergegeben.

Tabelle 5.1: Aminosäureidentitäten zwischen BZI-2 und anderen bZIP-Transkriptionsfaktoren der Familie S

bZIP-Protein	Species	Aminosäureidentität	Referenz
PPI1	<i>Capsicum chinense</i>	87 %	Lee <i>et al.</i> , 2002
ATB2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	58 %	Rook <i>et al.</i> , 1998
CPRF7	<i>Petroselinum crispum</i>	53 %	Rügner <i>et al.</i> , 2001
AtbZIP2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	48 %	Jacoby <i>et al.</i> , 2002
AtbZIP44	<i>Arabidopsis thaliana</i>	44 %	Jacoby <i>et al.</i> , 2002

BZI-3 zeigt große Homologien zu *L.e.* bZIP (Acc.#: AF176641), *N.t.* TBZ17 (Kusano *et al.*, 1995), *R.s.* RDLIP (Acc.#: AB015187) und *P.c.* CPRF6 (Rügner *et al.*, 2001). Es ist identisch zu *N.t.* TBZF, das gleichzeitig zu BZI-3 isoliert wurde (Yang *et al.*, 2001). Auch bei den Monokotyledonen finden sich zahlreiche BZI-3 ähnliche Proteine, deren RNA-Expression wie auch die *BZI-3* RNA, durch Kälte induzierbar ist. Dazu gehören *Z.m.* mLIP15 (Kusano *et al.*, 1995), *Z.m.* OBF (Singh *et al.*, 1990) und *O.s.* LIP19 (Aguan *et al.*, 1993). Die Homologie zwischen BZI-3 und den Proteinen aus Monokotyledonen ist deutlich geringer als die Homologie zwischen BZI-3 und den Proteinen aus Dikotyledonen. In Tabelle 2 sind die Aminosäureidentitäten zwischen BZI-3 und anderen Proteinen der Familie S wiedergegeben.

Tabelle 5.2: Aminosäureidentitäten zwischen BZI-3 und anderen bZIP-Transkriptionsfaktoren der Familie S

bZIP-Protein	Species	Aminosäureidentität	Referenz/ Acc. #
Dicotyledonen			
TBZF	<i>Nicotiana tabacum</i>	99 %	Yang <i>et al.</i> , 2001
LeBZIP	<i>L. esculentum</i>	92 %	AF176641
TBZ17	<i>Nicotiana tabacum</i>	75 %	Kusano <i>et al.</i> , 1998
RDLIP	<i>Raphanus sativus</i>	71 %	AB015187
CPRF6	<i>Petroselinum crispum</i>	61 %	Rügner <i>et al.</i> , 2001
Monocotyledonen			
mLIP15	<i>Zea mais</i>	51 %	Kusano <i>et al.</i> , 1995
OBF	<i>Zea mais</i>	44 %	Singh <i>et al.</i> , 1990
LIP19	<i>Oryza sativa</i>	42 %	Aguan <i>et al.</i> , 1993

BZI-4 zeigt ebenfalls Ähnlichkeiten zu bZIP Proteinen der Familie S, die Ähnlichkeiten sind aber geringer als bei den anderen beschriebenen Proteinen (Tabelle 5.3). Die größten Homologien gibt es zwischen BZI-4 und *P.c.* CPRF6, *A.m.* BZIP1 und *A.m.* BZIP2.

Tabelle 5.3: Aminosäureidentitäten zwischen BZI-4 und anderen bZIP-Transkriptionsfaktoren der Familie S

bZIP-Protein	Species	Aminosäureidentität	Referenz
BZIP2	<i>Antirrhinum majus</i>	59 %	Martinez-Garcia <i>et al.</i> , 1998
BZIP1	<i>Antirrhinum majus</i>	55 %	Martinez-Garcia <i>et al.</i> , 1998
CPRF6	<i>Petroselinum crispum</i>	53 %	Rügner <i>et al.</i> , 2001
BZI-3	<i>Nicotiana tabacum</i>	49 %	diese Arbeit
BZI-2	<i>Nicotina tabacum</i>	38 %	diese Arbeit

Im 5'-untranslatierten Bereich von BZI-2, BZI-3 und BZI-4 befinden sich uORFs. uORFs spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Translation von mRNAs (zur Übersicht siehe Morris und Geballe, 2000). uORF-Bereiche finden sich auch in den 5'-Leader-Sequenzen von vielen Genen der bZIP Transkriptionsfaktoren der Gruppe S. Für ATB2 konnte gezeigt werden, dass diese uORFs eine wichtige Funktion bei der Regulation der Proteinexpression spielen (Rook *et al.*, 1998). Untersuchungen unter der Verwendung des GUS-Reportergens, das unter der Kontrolle des *ATB2* Promotors inklusive des 5'-Leader exprimiert wurde, zeigten, dass die GUS-Aktivität durch Saccharose reprimiert wird. Deletion der uORFs führte zu einem Verlust der Reprimierbarkeit der GUS-Aktivität durch Saccharose. Die abgeleitete Aminosäuresequenz bestimmter uORFs der Gruppe S ist konserviert (Abb. 5.2). Das könnte bedeuten, dass ein Selektionsdruck auf diese uORF-Sequenzen einwirkt. Möglicherweise haben die codierten Proteine eine regulative Funktion, wie das z.B. für die Peptide, die in der 5'-Leadersequenz des Hefegens *CPAI* kodiert werden, gezeigt wurde (Werner *et al.*, 1987). Bei *CPAI* konnte man beobachten, dass eine Sequenzveränderung der uORF-Bereiche nur Auswirkungen hatte, wenn damit auch die Aminosäurezusammensetzung verändert wurde. Der Ersatz von einem Basentriplett mit einem anderen Basentriplett, daß für die gleiche Aminosäure kodiert, hatte keine Auswirkung auf die Repression der Translation (Werner *et al.*, 1987). Auch *cis*-dominante Effekte, wie der Gebrauch bestimmter Codons, der zur Verarmung der Zelle an bestimmten tRNAs führt, können durch diese uORFs bewirkt werden. In den Basensequenzen der uORFs von BZI-2 und ATB-2 findet sich das selten benutzte Codon CGC, das für Arginin kodiert. Dieses Codon wird, wie Untersuchungen an *Arabidopsis thaliana* ergeben haben, nur in 7 % der Fälle benutzt (http://www.arabidopsis.org/ath_cod.html). Die Verwendung seltener tRNAs führt zu einer Verlangsamung der Translation, da die Belieferung des Ribosoms mit der seltenen tRNA länger dauert als bei Verwendung eines Codons, dessen tRNAs häufiger in der Zelle vertreten sind. Für die uORFs der Gene *gp48* (Cao und Geballe, 1996a; 1996b) und *AdoMetDC* (Hill und Morris, 1993) wird angenommen, dass die von den uORFs kodierten Peptide die Termination der Translation durch Interaktion mit den Ribosomen verhindern, und so das „Scannen“ der Ribosomen in Richtung des Haupt-ORFs behindern (zur „Scanning“- Theorie der Ribosomen siehe Kozak, 1989). Es kommt somit zu einem „Ribosomenstau“, der die Translation des Haupt-ORFs reprimiert. Auf Ebene der Basensequenz können Reinitiationsstellen, aber auch Regionen, die ein Scannen der Ribosomen verhindern, eine regulatorische Rolle spielen. Für ATB2 konnte gezeigt werden, dass der Abstand zwischen uORF und der für ATB2 kodierenden Sequenz wichtig für die

Translationsregulation ist (Wiese und Smeekens, persönliche Mitteilung). Dies kann darauf hindeuten, dass die Wiederbeladung des Ribosoms nach Translation des uORFs mit eIF2-GTP-Met-tRNA ein kritischer Schritt für die Translation des ORFs ist (Grant und Hinnebusch, 1994; Grant *et al.*, 1994; Grant *et al.*, 1995).

<i>N. t.</i> .BZI-3MTLMRRIRIMHSFSVVF LYWFYVFS	
<i>N. t.</i> .TBZ17MTYAIQMRIRIRILHSFSVVF LYWFYVIS	
<i>P. c.</i> .CPRF6MIFMRRIRIRILHSFSVVF LYWFYVFS	
<i>A. t.</i> .bZIP53MSYSILFRIRIRILHSFSVVF LYTYVFS	
<i>A. m.</i> .BZIP1MMLMRRVRVHHSFSVVF LYWFYVFS	
<i>A. m.</i> .BZIP2MNRILLHSFSVVF LYWFYVFS LVSPMVSEFN	
<i>A. t.</i> .bZIP1MINLNQFLVYHSISVVF LHWFYVIS	
<i>N. t.</i> .BZI-4MISVISTTLLGICLLQSF SVMF LYHFYVFS.....	
<i>N. t.</i> .BZI-2	.MSAIISE LF LSGFMINSTYRRRAHLVQSF SVVF LYWFY.....	
<i>C. c.</i> .PPI1	.MSAIISE LF LSGFMINSTYRRRTHLVQSF SVVF LYWFYFIS.....	
<i>P. c.</i> .CPRF7?INSLRRRSHLVQSF SVS FLYWFYVYDTSSS.....	
<i>A. t.</i> .bZIP2	.MTPVLCETLLSGLTVKALCRTHLVQSF SVVF LYWFYNVS.....	
<i>A. t.</i> .ATB2	MSPIILSEIFLSGFMLNSTIRRRTHLVQSF SVVF LYWLYVVS.....	
<i>A. t.</i> .bZIP44	.MSPVISEILLRSGLTIDSSLRRRTHLVQSF SVVF LYWFYVFS.....	

Abb. 5.2: Aminosäuresequenzvergleich der potentiell von den uORFs kodierten Peptide ausgewählter bZIP-Proteine der Gruppe S, am Beispiel des uORFs2 von BZI-2. In blauen Buchstaben sind die Sequenzidentitäten dargestellt, wenn die entsprechenden Aminosäuren bei mehr als 50 % der BZI-Proteine identisch sind. In roten Buchstaben sind Aminosäuren dargestellt, die in allen BZI-Proteinen an der Position identisch sind. Die Einordnung in die BZI-3 ähnliche Gruppe ist am rechten Rand der Abbildung durch einen weißen Balken vermerkt, die BZI-2 ähnliche Gruppe ist durch einen grauen Balken gekennzeichnet. Das konservierte Motiv der BZI-2 ähnlichen uORF-Peptide ist grau unterlegt dargestellt. Das ? bedeutet, dass die weitere Sequenz nicht in der Datenbank vorhanden ist. Verwendete Sequenzen: *A. t.* bZIP53; *A. t.* bZIP1; *A. t.* bZIP2; *A. t.* bZIP44: Jacoby *et al.*, 2002; *A. m.* BZIP1; *A. m.* BZIP2: Martínez-García *et al.*, 1998; *P. s.* CPRF6; *P. s.* CPRF7: Rügner *et al.*, 2001; *C. c.* PIP1: Lee *et al.*, 2002; *N. t.* TBZF: Kusano *et al.*, 1998.

Wie oben beschrieben lassen sich ausgewählte bZIP-Proteine der Familie S aufgrund ihrer Aminosäurehomologien in zwei Gruppen einteilen, die BZI-2 Gruppe und die BZI-3 Gruppe. Der Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz der uORFs (in Abb. 5.2 am Beispiel des zweiten uORFs von BZI-2) verschiedener bZIP-Proteine bestätigt deutlich die Einteilung der bZIP-Proteine in diese beiden Gruppen. Der Carboxyterminus der abgeleiteten Peptidsequenzen aller untersuchten uORFs ist am stärksten konserviert. Daneben kann man aber wichtige Unterschiede beobachten: Die BZI-2 ähnliche Gruppe zeigt eine aminoterminal Extension des abgeleiteten Peptids mit einem stark konserviertem E(L/I)(F/L)(L/R)SG-Motiv. Im mittlerem Bereich des Peptides befindet sich ein HLVQ-Motiv, das sich bei den abgeleiteten Peptiden der BZI-3 ähnlichen Gruppe nicht findet. Das abgeleitete Peptid von BZI-4 läßt sich in die BZI-3 ähnliche Gruppe einordnen. Für die Regulation der bZIP-Proteine BZIP1 und BZIP2 aus *Anthrimum majus*, die beide zur Gruppe von BZI-3 gehören, konnte gezeigt werden, dass in transgenen Tabakpflanzen die Menge an mRNA des Gens mit 5'-Leader um 60% gegen den mRNA-Gehalt des Gens ohne 5'-Leader verringert ist (Martínez-García *et al.*, 1998). Es handelt sich hier also vermutlich um keinen

Regulationsprozeß, der auf Ebene der Translation eingreift, sondern um eine Regulation der Transkription oder der RNA-Stabilität. Ob diese Regulation auch für die Transkription der BZI-3 RNA zutrifft, ist zu überprüfen.

5.2 Die für die BZI-Transkriptionsfaktoren kodierenden Gene weisen spezifische Expressionsmuster auf

Die räumliche und zeitliche Verteilung der Expression der BZI-Proteine kann eine wichtige Regulationsmöglichkeit für die Dimerbildung und damit letztlich für die Regulation der Zielgenexpression sein.

Die Expression von *BZI-1* kann in allen pflanzlichen Geweben nachgewiesen werden (Heinekamp *et al.*, 2001). Auch die *BZI-1*-Homologe CPRF2 und OHP1 werden ubiquitär in der Pflanze exprimiert (Kircher *et al.*, 1998; Pysh *et al.*, 1993). Dagegen weisen *BZI-2*, *BZI-3* und *BZI-4* entwicklungs- bzw. organspezifische Expressionsmuster auf. *BZI-2* wird vor allem in Sink-Organen, wie Blüten, Sproß, Wurzeln exprimiert. Auch *ATB2* zeigt ein vergleichbares Expressionsmuster. Die *ATB2* RNA lässt sich in den Wurzeln, im Sproß, in den Rosettenblättern, in den Samenständen und Blüten nachweisen. *BZI-3* hat einen Expressionsschwerpunkt in der Blüte. Für das *BZI-3* identische Gen *TBZF* (Yang *et al.*, 2001) konnte gezeigt werden, dass die *TBZF*-RNA in Blüten und den Schließzellen seneszenten Blätter akkumuliert. In Tabak gibt es noch ein weiteres Protein mit großer Homologie zu *BZI-3*, *TBZ17* (Kusano *et al.*, 1998). Transkription von *TBZ17* wird im Unterschied zu *BZI-3* jedoch nur sehr schwach durch Kälte induziert. Es konnte von Yang *et al.*, 2001 gezeigt werden, dass das *TBZ17* Transkript wie *TBZF* ebenfalls in Schließzellen und seneszenten Blättern akkumuliert. Im Unterschied zu *TBZF* findet sich aber keine Akkumulation des Transkriptes in der Blüte. Daraus kann man schließen, dass diese beiden sehr ähnlichen Transkriptionsfaktoren zwar zum Teil überlappende, aber auch spezifische Funktionen, wie im Rahmen der Blütenentwicklung, haben.

BZI-4 wird in der Blüte und vor allem in den Stamina exprimiert. Die *Anthirrhinum majus* bZIP Transkriptionsfaktoren *A.m. BZIP1* und *A.m. BZIP2* werden ebenso wie *BZI-4* hauptsächlich in den Blüten exprimiert (Martinez-Garcia *et al.*, 1998). Die Expressionsschwerpunkte von *A.m. BZIP1* und *A.m. BZIP2* liegen besonders in den Ovarien und Antheren, daneben aber auch im Leitbündelgewebe der Sepalen und dem Stengel der

jungen Infloreszenzen. *A.m. BZIP1* wird daneben aber auch in Wurzeln exprimiert, das ist bei *BZI-4* nicht der Fall.

Neben diesen organspezifischen Expressionsmustern, kann man auch eine stimulusabhängige Transkription beobachten. Auch hier verhalten sich die einzelnen BZI Gene sehr spezifisch. Die Transkription von *BZI-1* wird durch virale und bakterielle Pathogene induziert (Heinekamp *et al.*, 2001). Das Transkript oszilliert im Tagesverlauf, in der Nacht steigt die Transkription an, tagsüber sinkt die Transkriptmenge. Das Transkriptionsmuster von *BZI-2* verhält sich entgegengesetzt: nach Belichtung steigt die Transkriptmenge an. Die Oszillation der *BZI-1* und *BZI-2* Transkripte im Tagesverlauf wird nicht unabhängig vom Licht fortgesetzt, wie Experimente an Pflanzen, die fünf Tage unter dauerhafter Belichtung kultiviert wurden, ergeben haben. Daher kann eine Steuerung der Oszillation der Transkriptmengen von *BZI-1* und *BZI-2* durch cirkadiane Rhythmik ausgeschlossen werden. Der Stimulus für die Oszillation kann direkt das Licht sein. Es kann sich aber auch um indirekte Lichteffekte handeln. Da Licht für die Photosynthese und somit zum Kohlenhydrataufbau von der Pflanze genutzt wird, könnten auch Stoffwechsel- oder Metabolitsignale die Oszillation der *BZI-1* und *BZI-2* Transkriptmenge bewirken. *BZI-2* und *BZI-1* werden durch Licht gegenläufig in ihrer Expression reguliert. *BZI-3* weist dagegen eine konstante Expression im Tagesverlauf auf. Es ist also möglich das unterschiedliche Verteilungen (resultierend aus den vorhandenen Proteinmengen) der *BZI-1* oder *BZI-2* Homodimere und der Heterodimere aus *BZI-1* und *BZI-2*, die koordinierte Expression von Zielgenen in Abhängigkeit von der Belichtung, der Photosyntheserate oder der Zuckerverteilung regulieren. Das könnte beispielsweise im Rahmen der Photosynthese und der Sink-Source Regulation eine Rolle spielen. Eine Regulation der Proteinmenge in Abhängigkeit von der Belichtung konnte für den *Arabidopsis thaliana* bZIP-Transkriptionsfaktor HY5 (Oyama *et al.*, 1997, Ang *et al.*, 1998) gezeigt werden. Dieser Transkriptionsfaktor bindet an G-Box-Motive in den Promotoren verschiedener lichtinduzierbarer Gene (Ang *et al.*, 1998; Chattopadhyay *et al.*, 1998a und 1998b). Bei Dunkelheit wird HY5 abgebaut (Osterlund *et al.*, 1999; Osterlund *et al.*, 2000). Dieser Abbau wird durch COP1 vermittelt. (von Armin und Deng, 1994; Ang *et al.*, 1998, Osterlund *et al.*, 2000).

Die Inkubation mit den Zuckern Saccharose und Glucose, Produkten der Photosynthese, führt zu einer verstärkten *BZI-2* Transkription, die anderen BZI-Gene werden durch Zucker nicht reguliert. Einen Anstieg der Transkriptmenge durch Zucker konnte auch für *ATB2* gezeigt werden (Rook *et al.*, 1998a). Fasst man die stimulusabhängigen und gewebespezifischen

Expressionsdaten von *BZI-2* zusammen, so zeichnet sich eine Verbindung zum Zuckerstoffwechsel bzw. -verteilung oder der Photosynthese ab. Möglicherweise regulieren *BZI-2* Homodimere, oder aber Heterodimere mit den anderen *BZI*-Proteinen die Expression von Zielgenen, die mit dem Zuckerstoffwechsel im Zusammenhang stehen. Für *ATB2* aus *Arabidopsis thaliana* konnten ähnliche Expressionsmuster wie für *BZI-2* beobachtet werden (Rook *et al.*, 1998a). *BZI-2* und *ATB2* werden vor allem in Sink-Organen exprimiert. Die Transkription steigt durch Belichtung und Inkubation mit Zuckern. Analysen der Expression eines *ATB2*-Promotor-GUS-Reportergen-Konstruktes zeigen eine erhöhte GUS-Aktivität im Bereich der Leitgewebe der Blätter, in den Funikuli nach der Befruchtung und bei der Embryoentwicklung. Desweiteren konnte für *ATB2* eine post-transkriptionelle Repression der Expression durch Saccharose gezeigt werden, die über die uORFs in der 5'-Leadersequenz vermittelt wird (Rook *et al.*, 1998b). Es kann für beide Gene eine Beteiligung an der Source-Sink Kontrolle vermutet werden. Die Zielgene von *ATB2* sind aber nicht bekannt. Möglicherweise handelt es sich bei *ATB2* um das orthologe Protein zu *BZI-2*, wie die strukturellen Daten und die Expressionsanalysen vermuten lassen. *BZI-2* weist darüber hinaus eine hohe Homologie zu dem Protein PIP1 aus *Capsicum chinense* auf (Lee *et al.*, 2002). Die Transkriptmenge der PIP1 RNA steigt pathogeninduziert während einer inkompatiblen Reaktion an. Getestet wurden die Pathogene PMMV, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 51 und *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Für *BZI-2* konnte dagegen keine Induktion nach Befall mit TMV oder *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, gezeigt werden.

Die *BZI-3* Transkription wird durch Kälte induziert. Diese Induzierbarkeit durch Kälte kann man bei einer Reihe von bZIP-Proteinen der Familie S beobachten, so bei *O.s.* LIP19, (Aguan *et al.*, 1993), *Z.m.* mLIP15 (Kusano *et al.*, 1995), *O.s.* OBF1 (Singh *et al.*, 1990) und *R.s.* rdLIP (Acc. #: AB015187). Die anderen *BZI*-Proteine weisen keine Kälteinduzierbarkeit auf. Durch Hitzestress lässt sich die Transkription von *BZI-3* nicht induzieren. Möglicherweise spielen *BZI-3* Homo- oder Heterodimere eine Rolle bei der kältespezifischen Genregulation. Die potentiellen Zielgene, auch der ähnlichen Faktoren, sind aber unbekannt. Yang *et al.*, (2001) konnten zeigen, daß das zu *BZI-3* identische Gen *TBZF* seneszenzspezifisch akkumuliert. *BZI-3*/*TBZF* hat damit wohl auch eine wichtige Funktion bei der Regulation von Entwicklungsprozessen. Für *Z.m.* OBF1, einen bZIP Transkriptionsfaktor mit großer Homologie zu *BZI-3*, konnte gezeigt werden, dass das Transkript sich in den noch nicht vollständig differenzierten Bereichen eines sich entwickelnden Blattes anreichert (Singh *et al.*, 1990). Das auch *BZI-3* eine Rolle bei Entwicklungsprozessen in der Pflanze spielt, zeigt

sich am Phänotyp der BZI-3-Oex Pflanze, der deutliche Abweichungen zum Wildtyp im Bezug auf die Stellung der Blätter und die Blütenorgangrößen aufweist.

In dieser Arbeit wurden lediglich die Transkriptmengen der cDNAs untersucht, die für BZI-2, BZI-3 und BZI-4 kodieren. Die Transkriptmenge kann einen ersten indirekten Hinweis auf die Verteilung der Proteine geben. Die cDNAs von *BZI-2*, *BZI-3* und *BZI-4* enthalten uORFs in ihrer 5' Leadersequenz, die möglicherweise eine Rolle in der post-transkriptionelle Regulation der Proteinverteilung spielen. Für *ATB2* konnte gezeigt werden, dass die Transkriptmenge durch Saccharoseinduktion ansteigt, auf die Proteinexpression wirkt sich Saccharose aber in Konzentrationen von über 25 mM hemmend aus, was über die uORF-Bereiche in der 5'-Leadersequenz vermittelt wird (Rook *et al.*, 1998b). Dieses Beispiel zeigt, wie wichtig es ist, neben der Transkriptverteilung auch die Proteinverteilung zu untersuchen. Daher sollte in Zukunft auch die Proteinverteilung der BZI-Proteine untersucht werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Verfügbarkeit von BZI-Proteinen für die Bildung von Homo- und Heterodimeren einer komplexen und spezifischen Regulation unterliegt. Dabei kann man eine organspezifische Verteilung aller *BZI* Transkripte beobachten. Die stressabhängige Induktion der *BZI* RNAs ist spezifisch für die einzelnen Gene. Eine entwicklungspezifische Verteilung ist für das *BZI-3* identische Gen *TBZF* gezeigt worden (Yang *et al.*, 2001). Diese räumliche, stimulusabhängige und zeitliche Regulation der Verteilung der bZIP-Transkriptionsfaktoren bestimmt die Verfügbarkeit der Proteine für die Homo- und Dimerbildung. Durch Kombination der Proteine bei der Dimerbildung ist eine gezielte Zielgenaktivierung in Abhängigkeit vom Gewebe, des Entwicklungsstadiums und der Reizverarbeitung wahrscheinlich.

5.3 Der Gruppe C bZIP-Transkriptionsfaktor BZI-1 heterodimerisiert spezifisch mit den BZI-Transkriptionsfaktoren der Gruppe S

Die Proteine BZI-2, BZI-3 und BZI-4 wurden in einem Hefe Two Hybrid Screen als Heterodimerisierungspartner von BZI-1 isoliert (Strathmann *et al.*, 2001).

Heterodimerisierung konnte auch für andere bZIP-Faktoren gezeigt werden. Die GBF-Proteine aus *Arabidopsis thaliana* zeigen ein sehr differenziertes Dimerisierungsverhalten *in vitro*. GBF1, GBF2 und GBF3, Familie G (Jacoby *et al.*, 2002), bilden sowohl Homodimere als auch wechselseitig Heterodimere (Schindler *et al.*, 1992). GBF4, Familie A in der Einteilung nach Jacoby *et al.*, (2002), homodimerisiert nicht, bildet aber Heterodimere mit

GBF2 und GBF3 (Menkens und Cashmore, 1994). Die bZIP-Proteine HYH und HY5 aus *Arabidopsis thaliana* können sowohl Homodimere als auch Heterodimere bilden (Holm *et al.*, 2002). Für die Proteine BZIP1 und BZIP2 aus *Anthriscum majus*, beide Familie S, konnte eine Heterodimerisierung gezeigt werden (Martínez-García *et al.*, 1998). Auch die bZIP-Proteine aus Petersilie heterodimerisieren sehr spezifisch: CPRF1, CPRF2 und CPRF3 bilden bevorzugt Heterodimere (Armstrong *et al.*, 1992). CPRF4a bildet sowohl Homodimere als auch Heterodimere mit CPRF1, aber nicht mit CPRF2 (Kircher *et al.*, 1998). CPRF2 weist eine hohe Homologie zu BZI-1 auf (Heinekamp *et al.*, 2001), es könnte sich um das orthologe Protein aus Petersilie handeln. Für CPRF2 konnte gezeigt werden, dass das Protein in Hefe mit CPRF6 und CPRF7 (Rügner *et al.*, 2001) interagiert. CPRF6 und CPRF7 sind den Proteinen BZI-2, BZI-3 und BZI-4 sehr ähnlich. In der Hefe interagiert BZI-1 ebenfalls mit CPRF6 und CPRF7, die Interaktion zwischen bZIP-Proteinen der Gruppe S und der Gruppe C ist also spezieübergreifend. CPRF5 wurde als Interaktionspartner von CPRF1 isoliert (Rügner *et al.*, 2001). Eine Interaktion zwischen BZI-1 und CPRF5, das zur Gruppe G in der Einteilung nach Jacoby *et al.*, (2002) gehört, findet nicht statt. BZI-1 interagiert auch nicht mit den TGA Faktoren TGA2.1 und TGA2.2 (Gruppe D). Die Interaktion von BZI-1 mit anderen Proteinen ist also spezifisch, dabei konnte bisher lediglich eine Interaktion von BZI-1 mit bZIP-Proteinen der Familie S gezeigt werden. Die BZI-Proteine zeichnen sich durch ihre extrem langen Leucinzipper aus, die über bis zu neun Wiederholungen gehen. Die Struktur des Zippers könnte die Interaktionsspezifität bewirken. Die Interaktion zweier Monomere wird maßgeblich von der Möglichkeit der Proteine bestimmt, coiled-coil Formationen auszubilden (Lupas, 1996, zur Übersicht siehe Vinson *et al.*, 2002). Zwei Monomere können sich parallel aneinanderlagern. Dabei bilden die Aminosäuren in Position d (das Leucin des Zippers) und die Aminosäure an Position a (Nomenklatur nach Mc Lachlan und Steward, 1975) durch elektrostatische Wechselwirkungen ein hydrophobes Zentrum (siehe Abbildung 1.1). Die amphipatische α -Helix erlaubt polaren oder geladenen Aminosäuren an Position e und g eines bZIP-Proteins, mit den Aminosäuren an den korrespondierenden Positionen eines anderen bZIP-Proteins über Wasserstoffbrückenbindungen oder hydrophile Wechselwirkungen zu interagieren. Stoßen sich die Aminosäuren an Position e und g ab, oder ist aus sterischen Gründen keine Interaktion möglich, so findet keine Dimerisierung statt. Auf diese Art und Weise kann eine Spezifität der Dimerisierung erreicht werden (zur Übersicht siehe Siberil *et al.*, 2001; Vinson *et al.*, 2002).

Das „Coils“-Programm (Lupas *et al.*, 1991; Lupas, 1996) berechnet für alle BZI-Proteine eine hohe Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung von coiled-coil-Strukturen im Bereich des

Leucinzippers (siehe Anhang). Interessanterweise weisen alle untersuchten Proteine einen sehr langen Zipper-Bereich auf, BZI-1 und BZI-2 über 9 Wiederholungen, BZI-3 und BZI-4 über 8 Wiederholungen. In jedem der Proteine sieht man einen deutlichen Rückgang der Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung einer coiled-coil Konformation im Bereich der 4. Wiederholung (BZI-2 und BZI-3) bzw. der 5. Wiederholung (BZI-1 und BZI-4). Dann steigt die Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung von coiled-coil Strukturen bei allen BZI-Proteinen wieder an. Bei BZI-4 ist die Wahrscheinlichkeit für coiled-coil Strukturen im C-terminalem Bereich des Zippers nicht so hoch wie bei den anderen BZI-Proteinen. Die bZIP-Proteine, die nicht mit BZI-1 interagieren, also die TGA-Faktoren und CPRF5 weisen viel kürzere Leucinzipper-Bereiche auf als die BZI Proteine. Die Zipper der TGA-Faktoren erstrecken sich lediglich über drei Wiederholungen, und der Zipper von CPRF5 erstreckt sich über fünf Wiederholungen. Die Zipper dieser Proteine weisen keine Unterbrechungen in der Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung von coiled-coil Konformationen auf. Bei kurzen Zippern ist die Proteinsequenz des Zippers generell weniger flexibel, da die Aminosäuren dieses kurzen Bereichs für die Dimerbildung optimiert sein muß (Vinson *et al.*, 2002). Möglicherweise ist die Länge des Zippers und auch die Struktur demnach entscheidend für eine Interaktion und Dimerbildung. Eine Interaktion ließ sich nur zwischen den Proteinen nachweisen, die einen langen Leucinzipper aufweisen und eine Unterbrechung in der coiled-coil Wahrscheinlichkeit haben, wie den BZI-Proteinen.

BZI-1 kann in Hefezellen auch homodimerisieren, die Interaktion der Homodimere ist aber um den Faktor 6 bis 10 geringer als die Interaktion der Heterodimere von BZI-1 mit BZI-2, BZI-3 oder BZI-4, wie die β -Galaktosidaseaktivitäten des oNPG Tests zeigen. Das korreliert mit der Tatsache, dass im Hefescreen auch kein BZI-1 Klon als Interaktionspartner von BZI-1 isoliert wurde, obwohl dieser Klon in der Bank repräsentiert war (Strathmann, 1999). Möglicherweise wird demnach die Heterodimerisierung von BZI-1 mit den anderen BZI-Proteinen vor der Homodimerisierung bevorzugt. Eine Kartierung der Interaktionsdomänen in Hefe ergab, dass der bZIP-Bereich die Interaktion von BZI-1 mit den Proteinen BZI-2, BZI-3 und BZI-4 vermittelt.

Die Interaktion von BZI-1 mit den anderen BZI-Proteinen, die *in vivo* in Hefe gefunden wurde, konnte auch *in vitro* bestätigt werden. In „Far Western“ Analysen konnte die Heterodimerisierung von BZI-1 mit BZI-2, BZI-3 und BZI-4 bestätigt werden. Es konnte auch gezeigt werden, dass BZI-1 nicht mit TGA-Faktoren und BSA interagiert. Die „Far Western“ Analysen bestätigt also die in Hefe gewonnenen Daten. In GRA kann die Bindung der Homo- und Heterodimere an DNA gezeigt werden. Hier konnte sowohl die

Homodimerisierung der BZI-Proteine als auch die Heterodimerisierung von BZI-1 mit BZI-2, BZI-3 und BZI-4 über die Bindung der Dimere an radioaktiv markierte DNA-Fragmente gezeigt werden. Ein Beweis der Interaktion *in planta* muß noch erbracht werden. Dazu würde sich eine Coimmunoprecipitation gut eignen (wie beispielsweise in Straub *et al.*, 1996 beschrieben). Für eine Coimmunoprecipitation sind gute Antikörper, die die zu untersuchenden Proteine erkennen, essentiell. Bisher liegt der Antikörper gegen BZI-1 in einer guten Qualität vor. Ein Antikörper gegen BZI-4 wurde während dieser Arbeit hergestellt. Die Herstellung von Antikörpern gegen BZI-2 und BZI-3 ist bisher noch nicht befriedigend gelungen.

Die spezifische Heterodimerisierung von bZIP Transkriptionsfaktoren kann die Zielgenspezifität bewirken. Im tierischen System konnte für die Mitglieder der „small“-Maf Familie von bZIP-Transkriptionsfaktoren gezeigt werden, dass sie mit dem erythroidspezifischen bZIP-Protein NF-E2 p45 interagieren (Andrews und Faller, 1991; Andrews *et al.*, 1993; Fujita *et al.*, 1991). Dieses Heterodimer aktiviert die Transkription erythroidspezifischer Gene unter der Kontrolle von Promotoren, die die NF-E2 Consensus Bindestelle enthalten. Auch Heterodimere aus Fos und den „small“-Maf Proteinen können an die gleiche Bindestelle binden, die Transkription wird dann nicht aktiviert (Kataoka *et al.*, 1995). Es wird daher von den Autoren postuliert, dass die gewebespezifische Expression der Zielgene und Differenzierung der Erythroidzellen von der Competition zwischen Fos und NF-E2 p45 um die „small“-Maf-Heterodimerisierungspartner und die Besetzung der DNA-Bindestellen reguliert wird.

Die Proteine HYH und HY5 aus *Arabidopsis thaliana* können Homo- und Heterodimere bilden und binden an das gleiche *cis*-Element, eine G-Box in lichtregulierten Promotoren (Chattopadhyay *et al.*, 1998a und 1998b; Holm *et al.*, 2002). Die Phänotypen der Mutanten *hy5* und *hyh* sind ähnlich, *hyh* reagiert aber stärker in Bezug auf Blaulicht als auf andere Lichtqualitäten. In Bezug auf Zielgene zeigte sich in einem EST Mikroarray, dass die Regulation der Genexpression von potentiellen Zielgenen zwar überlappt, 135 von 149 Gene werden in den Mutanten *hy5*, *hyh* und *hyh/hy5* gleich reguliert, es werden aber auch Gene, 11 von 149, sehr distinkt und unterschiedlich direkt oder indirekt durch die beiden Transkriptionsfaktoren HYH und HY5 reguliert (Holm *et al.*, 2002). Diese Beispiele zeigen deutlich, dass selektive Homo- oder Heterodimerisierung eine Möglichkeit ist, um die Zielgenspezifität zu regulieren.

werden, dass die „hinge“-Region und die N-terminale Region für die DNA-Bindenspezifität von Bedeutung sind (Niu *et al.*, 1999). Beim Vergleich der Bindedomänen von BZI-1, BZI-2, BZI-3 und BZI-4 (Abb. 5.3) ist zu erkennen, dass die „core“-Region hochkonserviert ist. Lediglich an vier Aminosäurepositionen innerhalb dieser „core“-Region sind unterschiedliche Aminosäuren eingebaut. Vergleicht man die BZI-Proteine der Gruppe S, ist sogar nur an zwei Positionen eine unterschiedliche Aminosäure eingebaut. Im Bereich der „hinge“-Region und der N-terminale Region zeigt sich eine wesentlich geringere Homologie. Das könnte ein Hinweis auf eine unterschiedliche Präferenz für verschiedene *cis*-Elemente sein. Durch Austausch der „hinge“-Region und der N-terminale Region könnte untersucht werden, ob diese Bereiche die Bindenspezifität an bestimmte *cis*-Elemente beeinflussen. Ein vergleichbares Experiment wurde von Niu *et al.*, (1999) für die Transkriptionsfaktoren EmBP-1 und TGA1a durchgeführt.

BZI-1 bindet in GRA an ACGT-Elemente im *GH3* Promotor. BZI-1- Δ N bindet an das E1 Fragment, es handelt sich um ein hybrides G/C-Element und an das G-Box Element im D1 Fragment. Die Bindung von BZI-1 an den *GH3* Promotor konnte *in planta* mittels Chromatin-Immunopräzipitation bestätigt werden. Das ChIP Experiment wurde dreimal mit gleichem Ergebnis durchgeführt. Lediglich im mit α BZI-1-Antikörper inkubierten Ansatz konnte ein *GH3* Promotorfragment über eine PCR detektiert werden. In Kontrollansätzen mit Präimmunserum, α HA-Antikörper oder lediglich Protein A-gekoppelter Sepharose konnte kein *GH3* Promotorfragment detektiert werden. Eine Kontroll-PCR mit Primern gegen ein Promotorfragment eines anderen Gens, *PMT2* (Putrescine N-Methyltransferase; Riechers und Timko, 1999), war ebenfalls negativ. Die Präzipitation des *GH3* Promotorfragments mit dem α BZI-1 Antikörper ist demnach spezifisch, BZI-1 bindet *in planta* an den *GH3* Promotor. Es handelt sich also bei *GH3* um ein direktes Zielgen von BZI-1.

Die Untersuchung der Bindung verschiedener BZI-1, BZI-2, BZI-3 und BZI-4 Heterodimere an die hybride G/C Box *in vitro* ergab, dass alle getesteten Homodimere und die Heterodimere zwischen BZI-1 und den Gruppe S Transkriptionsfaktoren an dieses Element binden. Eine Veränderung der Spezifität der Bindung durch die Dimerisierung kann an der E1 Box des *GH3* Promotors *in vitro* nicht beobachtet werden. Die Bindung von bZIP-Proteinen der Familie S an hybride ACGT-Elemente konnte auch schon für *A.m.* BZIP1 und BZIP2 gezeigt werden, die bevorzugt an eine hybride G/C-Box binden (Martinez Garcia *et al.*, 1998). TBZF und TBZ17 binden ebenfalls bevorzugt an hybride Elemente, und zwar eine A/G-Box (TACGTG) und eine C/G-Box (GACGTG). Am *NIN88* Promotor (Goetz *et al.*, 2001) kann eine spezifische Bindung von BZI-4 an eine G-Box beobachtet werden. BZI-1 zeigt keine

Bindung an dieses Element, BZI-2 und BZI-3 zeigen allenfalls eine extrem geringe Bindung und auch die Heterodimere binden nicht an dieses Element. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass BZI-1 in GRA an eine G-Box im *GH3* Promotor bindet, an die G-Box im *NIN88* Promotor aber nicht bindet. Möglicherweise haben also die Umgebungssequenzen des ACGT-Elementes einen Einfluß auf die Spezifität der Bindung des BZI-1 Proteins an diese *cis*-Elemente, wie Izawa *et al.*, (1993) für die Bindung verschiedener bZIP-Proteine an G- und C-Box Elemente mit unterschiedlichen flankierenden Regionen, zeigen konnten. Eine hybride T/G-Box im *NIN88* Promotor wird von keinem der Proteine gebunden. Es konnte somit die Spezifität der Bindung von BZI-4-Homodimeren an die G-Box im *NIN88* Promotor gezeigt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit besagen, dass bestimmte *cis*-Elemente, wie hybride G/C-Box im *GH3* Promotor von verschiedenen Homo- und Heterodimeren promiskuitiv gebunden werden. Andererseits sieht man am Beispiel der G-Box des *NIN88*-Promotors eine spezifische Bindung des Homodimers von BZI-4. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß über die Dimerisierung eine Spezifität der Bindung an bestimmte *cis*-Elemente und damit eine Zielgenspezifität erreicht werden kann. In Zukunft sollte man die *in vivo* Bindung von BZI-4 an den *NIN88* Promotor durch Chromatin-IP mit Blütenchromatin untersuchen.

5.5 Die Genexpression der Zielgene hängt von den Aktivierungseigenschaften der BZI-Transkriptionsfaktoren ab

Die Regulation der Transkription von Zielgenen durch Transkriptionsfaktoren hängt auch davon ab, ob die Transkriptionsfaktoren aktivierend oder reprimierend wirken. Transkriptionsaktivatoren sind modulare Proteine mit einer DNA-Bindedomäne und einer Aktivierungsdomäne (Johnson und McKnight, 1989; Triezenberg 1995). Die Bindedomäne lokalisiert diese Proteine auf der DNA und die Aktivierungsdomäne kann die basale Transkriptionsmaschinerie an den Promotor rekrutieren (Ptashne und Gann, 1997, Stargell und Struhl, 1996). Die Aktivierungseigenschaften von BZI-1 sind gut untersucht (Heinekamp, 2002 und diese Arbeit): das Protein kann in Hefe und in Protoplasten die Transkription von Genen einleiten. Deletiert man den Aminoterminus, d.h. die ersten 72 Aminosäuren, so verliert BZI-1 seine Aktivatorfunktion. Auch für BZI-2 konnte eine Aktivierung von Reportergenen in Hefe und Protoplasten festgestellt werden. Der Aminoterminus von BZI-2 enthält viele Serine. Serinreiche Regionen können als Aktivierungsdomänen wirken (Theil *et*

al., 1989). Für das BZI-2 ähnliche Protein PPI1 (Lee *et al.*, 2002) konnten ebenfalls Aktivierungseigenschaften in Hefe gezeigt werden. Für BZI-3 konnte eine leichte Transkriptionsaktivierung durch Bindung an das E1-Element des *GH3* Promotors in BY-2 nachgewiesen werden. Yang *et al.*, (2001) beschreiben für das BZI-3 identische TBZF-Protein eine Bindung an A/G und C/G-Hybridboxen und ebenfalls Reporter-genaktivierung in BY-2 Zellen. BZI-3 weist einen konservierten Carboxyterminus mit zahlreichen Prolinen auf, die aktivierend wirken können (Schindler *et al.*, 1992, Sprenger-Hausseits und Weißhaar, 2000). Für das BZI-3 identische TBZF-Protein konnten Yang *et al.*, (2001) zeigen, dass der Carboxyterminus wichtig für die Genaktivierung ist. Dabei scheinen die letzten 10 Aminosäuren entscheidende Funktion zu haben. Auch für den im Carboxylterminus stark konservierten Tabak-Transkriptionsfaktor TBZ17 konnte gezeigt werden, dass besonders die letzten 10 Aminosäuren von großer Bedeutung für die aktivierende Wirkung sind. Die Versuche wurden mit gleichem Ergebnis sowohl in Hefe als auch in BY-2-Zellen durchgeführt.

BZI-4 wirkt in BY-2 Zellen mit der 4xE1-Box als *cis*-Element im Promotorbereich als Repressor der Reporter-genexpression. Wenn lediglich BZI-4 in den BY-2 Zellen exprimiert wird, sieht man lediglich eine Hintergrund-GUS-Aktivität, wie auch nach der Transformation mit dem leeren Kontrollvektor. Einen vergleichbaren Effekt sieht man auch bei der Coexpression von BZI-1 und BZI-4. Da in diesem Experiment eine 4xE1-Box als *cis*-Element benutzt wurde, kann nicht genau bestimmt werden, auf welche Dimerkombinationen diese Repression zurückzuführen ist. BZI-4 Homodimere könnten alle vier Bindestellen besetzen, das wäre beispielsweise der Fall, wenn die Affinität der BZI-4 Homodimere an diese Fragment wesentlich höher ist, als die der BZI-1 Homodimere oder der Heterodimere aus BZI-1 und BZI-4. Denkbar ist auch, daß ein Teil der Bindestellen von BZI-1-Homodimeren und ein Teil von BZI-4 Homodimeren besetzt wird. Dann würde die additive Besetzung der Bindestellen durch BZI-4 Homodimere die Repression bewirken. Es ist auch möglich, dass BZI-1/BZI-4 Heterodimere diese Repression hervorrufen. Die Daten aus GRA haben gezeigt, dass BZI-4 sowohl als Homo- als auch als Heterodimer mit BZI-1 an DNA binden kann. Um genauere Rückschlüsse auf die Regulation der Expression der Zielgene durch die Homo- und Heterodimere zu erhalten, kann es sinnvoll sein, in experimentellen Ansätzen eine spezifische Homo- oder Heterodimerisierung zu bewirken. Zur Untersuchung der spezifischen Wirkung von Homo- bzw. Heterodimeren der Transkriptionsfaktoren Maf und Jun im tierischen System, hat man beispielsweise die Zipperbereiche von Maf und Jun gegen den Zipper von GCN4 ausgetauscht. Dann können selektiv nur die Proteine, die diesen GCN4-Zipper

enthalten, interagieren und somit kann die Wirkung von bestimmten Homo- und Heterodimeren untersucht werden (Kataoka *et al.*, 2001).

Der Aminosäurevergleich von BZI-4 mit BZI-2 oder BZI-3 ergibt signifikante Unterschiede. Der Aminoterminus von BZI-4 ist im Gegensatz zu dem Aminoterminus von BZI-2 verkürzt und weist weniger Serine auf. Der Carboxyterminus weist Unterschiede zu BZI-3 auf. BZI-4 enthält weniger Proline. Es ist also möglich, dass dem BZI-4-Protein eine eigene Aktivierungsdomäne fehlt, und es daher in bestimmten Funktionszusammenhängen als Repressor fungiert. Weitere mögliche Ursachen für die reprimierende Wirkung von BZI-4 sind ein fehlender Kerntransport oder eine Repressordomäne (Ohta *et al.*, 2001, Hiratsu *et al.*, 2002) im Protein. Gegen eine Retention des BZI-4 Proteins im Cytoplasma spricht eine mögliche bipartive NLS (Van der Krol und Chua, 1991; Varagona und Raikhel, 1994) in der Bindedomäne des BZI-4 Proteins. Auch die experimentellen Daten in transienten Assays sprechen gegen eine Retention im Cytoplasma. Es konnte gezeigt werden, dass Cotransformation von BZI-1 und BZI-4 in BY-2 Zellen zu einer Repression der GUS-Aktivität führt. Bei einer Retention von BZI-4 im Cytoplasma sollte BZI-1 alleine die Aktivierung der GUS-Expression bewirken. Daher ist ein fehlender Kerntransport von BZI-4 als Auslöser der reprimierenden Wirkung unwahrscheinlich. Repressordomänen wurden in Pflanzen noch selten beschrieben. Für Klasse II ERF Transkriptionsfaktoren und bestimmte Zink Finger Proteine in *Arabidopsis thaliana* konnte das Motiv ${}^L/F\text{DLN}{}^L/F(\text{X})\text{P}$ als Repressordomäne bestimmt werden (Ohta *et al.*, 2001, Hiratsu *et al.*, 2002). Dieses Motiv lässt sich im BZI-4 Protein nicht nachweisen. Durch Deletionsanalyse könnte man untersuchen, ob eine andere, bisher unbekannte Repressordomäne im Protein BZI-4 vorhanden ist. Möglicherweise handelt es sich bei BZI-4 aber auch um einem passiven Repressor der Genexpression (Hanna-Rose und Hansen, 1996), und BZI-4 enthält keine Repressordomäne, kann aber aufgrund des Fehlens einer Aktivierungsdomäne nicht aktivieren.

Für die *Antirrhinum majus* Proteine BZIP1 und BZIP2 konnte gezeigt werden, dass ihre Überexpression in Tabak sowohl Repression als auch Aktivierung in Abhängigkeit von unterschiedlichen Zielgenen bewirken kann (Martinez-Garcia *et al.*, 1998). Bei bZIP-Proteinen der „small“ MAF-Familie bei Wirbeltieren, die keine potentielle Aktivierungsdomäne aufweisen, hat die Dimerisierung Auswirkungen auf die Aktivierungseigenschaften. Die „small“ MAF-Proteine können als Homodimere die Transkription von Genen reprimieren. Heterodimere von Mitgliedern der „small“ MAF-Familie und Fos zeigen ebenfalls keine aktivierende Wirkung auf die Expression von

bestimmten Genen. Heterodimere mit NF-E2 p45 wirken jedoch *in vivo* aktivierend auf die Transkription (Igarashi *et al.*, 1994; Kataoka *et al.*, 1995) von Genen.

5.6 Die BZI-Transkriptionsfaktoren spielen eine Rolle im Rahmen der Auxinantwort der Pflanze

Um die Funktion der BZI-Proteine in der Pflanze aufzuklären, ist es wichtig die Bedeutung der BZI-Proteine für die Regulation der Expression von Zielgenen zu untersuchen. Dazu wurden die in dieser Arbeit hergestellten transgenen Pflanzen untersucht.

Die Samen der BZI-3-Oex und BZI-4-Oex Pflanzen zeigen ein normales Keimungsverhalten. Die BZI-4-Oex Pflanzen sind zwar kräftiger als Wildtyppflanzen, was auf eine bessere Ernährung hindeuten könnte, die eigentliche Keimung ist jedoch unbeeinflusst. An der Keimung sind verschiedene Pflanzenhormone beteiligt, so hemmt Abscisinsäure die Samenkeimung. Gibberelin ist notwendig für die Beendigung der Samenruhe und Brassinosteroide wirken sich auf die Entwicklung der Keimlinge im Dunkeln aus (zur Übersicht siehe Koorneef *et al.*, 2002). Die genannten Prozesse sind bei der Keimung der BZI-3-Oex und BZI-4-Oex Pflanzen nicht betroffen, eine Beteiligung von BZI-3 und BZI-4 in den Signaltransduktionswege der Hormone Gibberelin, Abscisinsäure und Brassinosteroide ist damit wenig wahrscheinlich. Auch die Keimung von BZI-1- Δ N Samen ist unverändert zur Keimung des Wildtyps (Heinekamp, 2002). Für das BZI-3 Homolog *TBZF* konnte gezeigt werden, dass sich ABA, Ethylen, Brassinosteroide und Jasmonsäure nicht auf die Expression des *TBZF* Gens auswirken (Yang *et al.*, 2001).

Die BZI-3-Oex Pflanze zeigt einen pleiotropen Phänotyp. Die Internodienabstände sind verkürzt, die Blattwinkel, d.h die Winkel zwischen Blattstiel und Sprossachse, sind kleiner. Daher weisen die Blätter steiler zur Sprossspitze als bei Wildtyppflanzen. Die Blütenorgane der BZI-3-Oex Pflanzen sind in ihrer Größe verkleinert. Dieser komplexe Phänotyp deutet auf eine veränderte Hormonantwort hin. Die Untersuchung der hormoninduzierten Organogenese an Blattscheiben ergab, dass die auxinvermittelte Wurzelbildung in den BZI-3-Oex-Pflanzen reduziert ist, eine Wurzelbildung findet nicht statt. Die epinastische Krümmung von Blattsegmenten, die auf Puffer mit Auxin inkubiert wurden, ist herabgesetzt. Diese epinastische Krümmung wird dadurch hervorgerufen, dass Auxin die Zellstreckung im oberen Palisadenparenchyms und der Epidermis anregt (Keller und Van Volkenburgh, 1997). Einen identischen Phänotyp in Bezug auf Wurzelbildung und Epinastie kann man auch bei BZI-1-

ΔN Pflanzen beobachten. Die Auxinsignaltransduktionswege unterscheiden sich in Bezug auf hohe oder niedrige Auxinkonzentrationen. Eine geringe Auxinkonzentration führt zur Zellstreckung (Chen *et al.*, 2001a; 2001b). Diese Auxinantwort wird durch den möglichen Auxinrezeptor Auxin-binding Protein 1 (ABP1, Batt *et al.*, 1976; Ray *et al.*, 1977; Jones und Venis, 1989; zur Übersicht siehe Napier *et al.*, 2002) vermittelt. Es konnte von Jones *et al.*, (1998) gezeigt werden, dass die ektopische, induzierbare Expression von ABP1 die Auxinvermittelte Zellstreckung in Zellen bewirkt, die eigentlich keine Auxinresponsivität haben. Eine „Antisense“-Expression von ABP1 führt dagegen dazu, dass Auxin keine Zellstreckung induzieren kann, die Zellteilung ist dagegen unbeeinflusst (Chen *et al.*, 2001). Heinekamp (2002) konnte am Beispiel der Staminazellzahl der BZI-1- ΔN Pflanze zeigen, dass die Zellzahl unverändert ist, aber die Zellstreckung viel geringer ist, was zu verkürzten Stamina führt. Auch im Epinastietest zeigt die BZI-1- ΔN Pflanze, genau wie die BZI-3-Oex Pflanze eine verringerte Zellstreckung. Möglicherweise handelt es sich dabei also um einen von ABP1 vermittelten Effekt. In *Arabidopsis thaliana* wurde von Nakazawa *et al.*, (2001) die Mutante *dfl1-D* beschrieben. Diese Mutante ist resistent gegen die Gabe von exogenem Auxin. Das *DFL1* Gen codiert für ein *GH3*-Gen Homolog.

In der Pflanze ist Auxin an vielen Vorgängen beteiligt, dazu gehören Phototropismus, Gravitropismus, Apikaldominanz, Seitenwurzelbildung, Zellteilung und Zellstreckung (zur Übersicht siehe Walker und Estelle, 1998; Berleth und Sachs, 2001). Die Signaltransduktionswege der Auxinantwort sind dabei sehr komplex (zur Übersicht siehe Vogler und Kuhlemeier, 2003). BZI-3-Oex Pflanzen haben eine veränderte Blattstellung, die Blätter sind vertikaler angeordnet als im Wildtyp. Für die monokotyledone Pflanze Mais gibt es Untersuchungen zur Blattstellung bei verschiedenen Linien (Fellner *et al.*, 2002). Die Pflanzen einer neueren Maiszüchtung, der Linie 3394, zeigen eine vertikaleren Anordnung der Blätter im Vergleich zu einer älteren Züchtung, der Linie 307 (Fellner *et al.*, 2002). Die neuere Züchtung zeigt, wie auch die Pflanze BZI-3-Oex, eine geringere Auxinantwort. Die Antwort der beiden Linien 3394 und 307 auf Auxin ist bei vergleichbaren Auxinmengen am höchsten, der Verlauf der Antwort ist jedoch verändert. Es wird daher postuliert, dass die Menge der Auxinrezeptoren bei der moderneren Linie 3394 geringer ist.

Auxin wirkt sich auch auf die Blütenentwicklung aus: die auxinresistente *axr1* Mutante in *Arabidopsis thaliana* bildet kleinere Blütenorgane (Lincoln *et al.*, 1990). Die Bildung kleinerer Blüten der BZI-3-Oex Pflanze könnte also ein Auxineffekt sein. Für einen Überblick über Auxinwirkung bei der Blütenentwicklung siehe Nemhauser *et al.*, (1998).

Die BZI-4 Pflanze zeigt ebenfalls einen pleiotropen Phänotyp. Die Internodienabstände sind verkürzt und die Blütenorgane sind verkleinert. Die Regeneration von Blattscheiben der BZI-4-Oex Pflanzen zeigt aber keine Veränderung in der Auxin- oder Cytokininantwort, im Epinastietest verhalten sich die Blattausschnitte dieser Pflanze wie der Wildtyp. Es ist daher bisher noch nicht geklärt, wodurch der pleiotrope Phänotyp der BZI-4-Oex Pflanze hervorgerufen wird. Es ist beispielsweise denkbar, dass die Veränderung der Auxinantwort nur sehr spezifisch in bestimmten Geweben, im Zusammenspiel mit weiteren Signaltransduktionswegen und zur bestimmten Entwicklungszeiten erfolgt. Dann wäre ein Epinastietest oder der Organogenesetest unter Umständen nicht geeignet, um einen Auxineffekt sichtbar zu machen.

Alle BZI-Proteine binden als Homo- und Heterodimere an die E1-Box im *GH3* Promotor. Das *GH3* Gen ist ein gut untersuchtes Markergen für eine frühe Auxinantwort (Roux und Perrot-Rechenmann, 1997). Im Northern-Blot lässt sich eine Repression der Expression von *GH3* in BZI-1- Δ N Pflanzen beobachten, in BZI-1-Oex Pflanzen sieht man jedoch keinen Effekt auf die *GH3* Expression (Heinekamp, 2002). Auch in den BZI-2-Oex, BZI-3-Oex und BZI-4-Oex Pflanzen kann man keine Auswirkung des Transgens auf die Expression des *GH3* Gens beobachten. Da der Effekt auf die *GH3* Expression nur im dominant negativen BZI-1- Δ N Konstrukt auftritt, die jeweiligen Überexprimierer aber keinen Effekt haben, kann es möglich sein, dass die kompetitive Verdrängung der endogenen Faktoren durch das BZI-1- Δ N Derivat aus der Bindung an die *cis* Elemente diesen Effekt hervorruft. Möglicherweise bestimmen auch die endogen vorliegenden Heterodimerisierungspartner die Transkription des *GH3* Gens und Überexpression hat daher keinen deutlichen Effekt. Für BZI-1- Δ N Pflanzen konnte gezeigt werden, dass sich dieses Konstrukt auch negativ auf die Expression anderer auxininduzierbarer Gene, wie *PARA*, *PARC* und *ARCA* auswirkt. Dabei sind die Effekte aber schwächer als die Auswirkungen auf die *GH3* Expression.

Die Auswirkung von den BZI-3-Oex und BZI-4-Oex Pflanzen auf die Expression dieser und weiterer Auxin induzierbarer Gene sollte untersucht werden, da möglicherweise auf die *GH3* Transkription, trotz der Bindung der Proteine an den Promotorbereich dieses Gens, kein Effekt sichtbar ist. Antisense-Pflanzen, also Pflanzen mit reduziertem Gehalt der BZI Proteine, könnten weitere Hinweise auf die Rolle dieser Proteine im Bereich der Auxinantwort geben. Dieser Ansatz würde sich massiv auf die Genexpression auswirken, da sowohl die Homodimer- als auch die Heterodimerbildung unterbunden wird.

5.7 BZI-1 und BZI-4 sind an der Regulation der *NIN88* Expression beteiligt

BZI-1- Δ N Pflanzen und BZI-4-Oex Pflanzen zeigen eine Repression der *NIN88* Transkriptmenge. Das korreliert mit der Tatsache, dass sowohl BZI-1- Δ N als auch möglicherweise BZI-4 Repressoren der Genexpression sind. In GRA konnte aber lediglich eine Bindung von BZI-4 an die G-Box im *NIN88* Promotor (Goetz *et al.*, 2001) gezeigt werden. Es gibt aber im *NIN88* Promotor weitere ACGT-Elemente, die bisher noch nicht in GRA als putative Bindestellen der BZI-Proteine untersucht wurden, da sie weiter vom Start-ATG entfernt liegen (siehe Anhang). Möglicherweise handelt es sich hier um Bindestellen für BZI-1. Außerdem konnten die in GRA eingesetzten Proteinmengen nicht quantifiziert werden, daher kann nicht völlig ausgeschlossen werden, ob BZI-1, nicht doch an die G-Box im *NIN88* Promotor bindet. Denkbar ist auch, daß post-translationale Modifikationen eine Bindung von BZI-1 vermitteln. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass BZI-1 pathogeninduziert serinspezifisch durch eine cytosolische Kinase phosphoryliert wird (Kuhlmann, 2002). Diese Phosphorylierung verstärkt die *in vitro* DNA-Bindung (Dröge-Laser *et al.*, 1997). Für den Transkriptionsfaktor *Z.m. Opaque2* konnte ebenfalls eine Phosphorylierung nachgewiesen werden, die seine DNA-Bindung beeinflusst. Die Phosphorylierung von *Opaque2* wird diurnal gesteuert (Ciceri *et al.*, 1997). Phänotypisch zeigen die Pollen von BZI-1- Δ N und BZI-4-Oex einen wichtigen Unterschied: die BZI-4-Oex-Pollen sehen wie Wildtyppollen aus, der Samenansatz der Pflanze ist normal. Die Pollen von BZI-1- Δ N sind degeneriert, ein normaler Samenansatz findet nicht statt. Für BZI-1- Δ N wurde von Heinekamp *et al.*, (2002) diskutiert, dass die Repression der *NIN88* diesen Pollenphänotyp bewirkt, da die Ernährung des Pollens gestört sein könnte. Für Antisensepflanzen der *NIN88* konnte ein identischer Pollenphänotyp beobachtet werden (Goetz *et al.*, 2001). Es bleibt damit die Frage, warum die Pollen der BZI-4-Oex Pflanze phänotypisch normal sind. In Northern Blot Analysen zeigt die BZI-4-Oex Pflanze eine geringere Repression der *NIN88* als die BZI-1- Δ N Pflanze. Es könnte sich somit um einen quantitativen Effekt handeln. Auch andere bZIP-Proteine könnten die BZI-4-Oex Wirkung verringern. Denkbar ist auch, dass andere Invertasen, wie die *NIN77* (Roitsch, persönliche Mitteilung) zwar von BZI-1- Δ N reprimiert werden, BZI-4 aber keinen Effekt auf sie hat. Dann könnte die *NIN77* den Effekt der *NIN88* Suppression durch BZI-4 kompensieren.

5.8 BZI-1, BZI-3 und BZI-4 sind an der Regulation der Blütenentwicklung beteiligt

Die Analyse der BZI-1- Δ N, BZI-3-Oex und BZI-4-Oex Pflanzen deutet daraufhin, dass die bZIP Transkriptionsfaktoren BZI-1, BZI-3 und BZI-4 an der Regulation der Blütenentwicklung beteiligt sind. Die Expression eines BZI-1- Δ N-Derivates, das dominant negativ wirkt, führt zu einer Verkleinerung der Blütenorgane. Die Petalen, Stamina und das Pistill sind in ihrer Größe reduziert. Auch BZI-3 und BZI-4 Überexpression führt zu einer kleineren Blüte mit kleineren Organen. Die Effekte von BZI-3 und BZI-4 sind also in Teilaspekten vergleichbar mit denen des dominant negativen BZI-1- Δ N Derivates. Möglicherweise wirken diese Proteine also auf gleiche Zielgene. Die BZI-2-Oex Pflanze zeigt eine normale Blüte. Das zeigt, dass es sich bei dem Blütenphänotyp der BZI-1- Δ N, BZI-3-Oex und BZI-4-Oex Pflanzen nicht um einen unspezifischen Effekt handelt, sondern das spezifische in die Pflanze übertragene Transgen die Wirkung auf die Blüte vermittelt.

Bei BZI-1- Δ N handelt sich hierbei um ein Konstrukt von BZI-1, dem die Aktivierungsdomäne fehlt, und das damit die Expression von Zielgenen nicht einleiten kann. Im Umkehrschluß ist demnach anzunehmen, dass BZI-1 eine aktivierende Wirkung auf die von BZI-1- Δ N negativ regulierten Gene haben könnte. Da der Phänotyp der BZI-1- Δ N Blüten ähnlich zu dem der Blüten der BZI-3-Oex und BZI-4-Oex Pflanzen ist, kann geschlossen werden, dass BZI-3 und BZI-4 in der Blüte eine antagonistische Wirkung gegenüber BZI-1 ausüben. BZI-3 und BZI-4 werden in Wildtyppflanzen vor allem in den Blütenorganen exprimiert. Für BZI-4 konnte die höchste Transkriptakkumulation speziell in den Antheren gezeigt werden. BZI-1 wird in allen pflanzlichen Organen transkribiert. Möglicherweise wird also die BZI-1 Wirkung in der Blüte durch Heterodimerisierung mit BZI-3 oder BZI-4 vermittelt.

Da BZI-4, wie transiente Analysen in BY-2 Zellen gezeigt haben, ein Repressor der Genexpression ist, könnte BZI-4 eine reprimierende Wirkung auf die Transkription von Genen haben, die von BZI-1 aktiviert werden. BZI-4 könnte kompetitiv an gleiche *cis*-Elemente binden und die Expression der Zielgene reprimieren. BZI-4 könnte auch als Heterodimer mit BZI-1 die Zielgenexpression reprimieren. Die Daten aus transienten Assays deuten auf eine reprimierende Wirkung von BZI-4 hin, allerdings sollte dieser Versuch in Zukunft wiederholt werden, da aus Zeitgründen nur ein unabhängiges Experiment mit einer Doppelbestimmung durchgeführt worden ist.

Bei BZI-3 handelt es sich in transienten Assays um einen Aktivator (auch dieses Experiment sollte in Zukunft wiederholt werden), der die Expression von reprimierenden Transkriptionsfaktoren bewirken könnte, die wiederum zur Repression von BZI-1 aktivierten Genen führen könnte. In Abbildung 5.4 ist ein Schema für die mögliche Regulation von blütenspezifischen Genen durch BZI-1, BZI-4 und BZI-3 wiedergegeben.

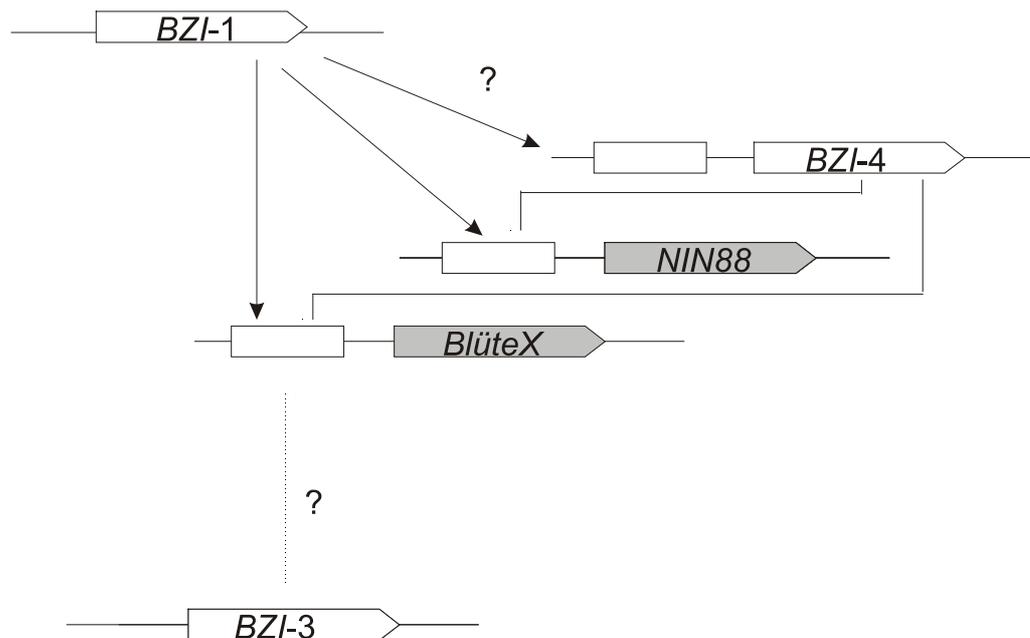


Abb. 5.4: Darstellung eines Modells für die Regulation von blütenspezifischen Genen durch BZI-1, BZI-2 und BZI-3. *BlüteX*: bisher noch unbekannte Zielgene.

In der vorliegenden Arbeit konnten Hinweise dafür gegeben werden, dass die BZI-Faktoren wichtige Knotenpunkte in einem genetischen Netzwerk sein könnten, welches für die geordnete Regulation des Blütenwachstums essentiell ist.

5.9 Die Genexpression von Zielgenen kann auf verschiedenen Ebenen durch die BZI-Transkriptionsfaktoren reguliert werden

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit konnten Beispiele für die spezifische Regulation der Zielgenexpression durch die Proteine BZI-1, BZI-2, BZI-3 und BZI-4 auf verschiedenen Ebenen gezeigt werden. Die Abbildung 5.5 gibt schematisch die einzelnen Regulationsebenen wieder.

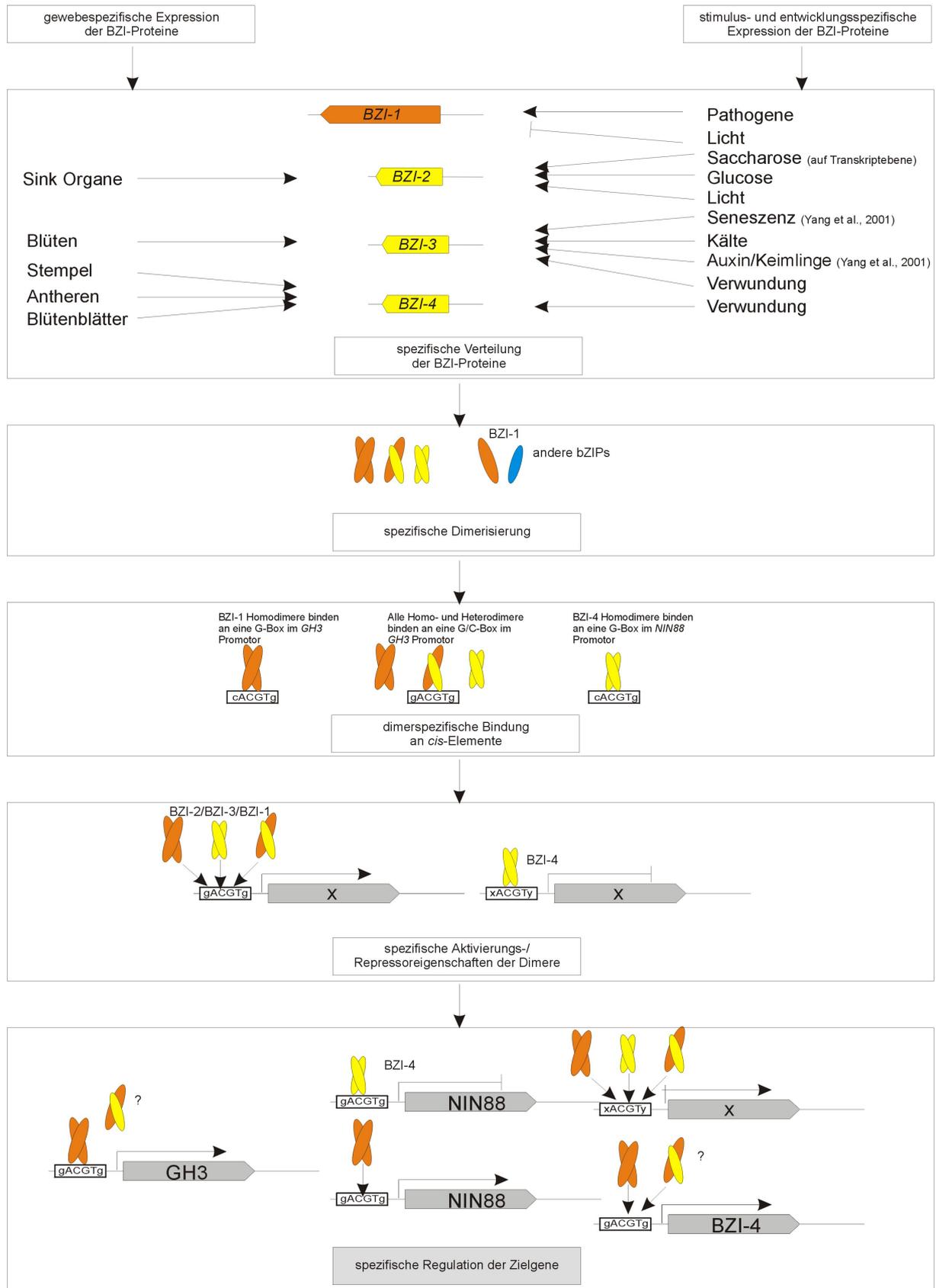


Abb. 5.5: Schematische Darstellung der Regulationsebenen für die spezifische Genaktivierung durch BZI-Dimere.

6 Zusammenfassung

Der Gruppe C bZIP Transkriptionsfaktor BZI-1 interagiert über seine bZIP-Domäne mit den Proteinen BZI-2, BZI-3 und BZI-4. Diese bZIP-Transkriptionsfaktoren lassen sich der Gruppe S der bZIP-Transkriptionsfaktoren zuordnen (Jacoby *et al.*, 2002). Sie weisen ein geringes Molekulargewicht von unter 20 kD und einen langen Leucinezipper über 8-9 Wiederholungen auf, der eine Rolle bei der Spezifität der Dimerbildung spielen könnte. In der 5'-Leadersequenz dieser cDNAs befinden sich uORFs mit möglicherweise regulativer Funktion. Im Gegensatz zu BZI-1, das ubiquitär exprimiert wird, zeigen die kleinen BZI-Proteine differenzielle Expressionsmuster. Die spezifische Verteilung der BZI-Proteine kann die Bildung der Dimere regulieren. *BZI-2* wird vor allem in den Sink-Organen wie der Blüte, den Wurzeln, aber auch im Stengel und in jungen Blättern exprimiert. Die *BZI-3* RNA wird vor allem in der Blüte transkribiert, liegt aber auch in allen anderen Geweben vor. *BZI-4* wird in der Blüte exprimiert, in den Stamina ist Expression von *BZI-4* am höchsten. Neben dieser gewebespezifischen Regulation der Transkriptmengen lässt sich auch eine stimulusabhängige Regulation beobachten. Die *BZI-2* Transkriptmenge wird durch Licht und Zucker induziert. Das *BZI-3* Transkript akkumuliert nach einem Kältestimulus. Die Überexpression von BZI-3 und BZI-4 führt zu pleiotropen Veränderungen der Pflanze.

Die BZI-3 überexprimierende Pflanze zeigt eine vertikalere Blattstellung und verkleinerte Blütenorgane. Die durch Auxin hervorgerufene Zellstreckung und Wurzelregeneration von Blattscheiben sind in dieser Pflanze reduziert. Die BZI-4 überexprimierende Pflanze ist kleiner und weist verkürzte Internodien auf. Auch die Blütenorgane dieser Pflanze sind verkürzt. Da für BZI-1 eine Beteiligung an der Regulation des Auxin induzierbaren *GH3* Gens gezeigt werden konnte, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Bindung der BZI-Proteine an Promotorelemente des *GH3*-Gens untersucht. Alle BZI-Proteine binden *in vitro* an den *GH3* Promotor. Für BZI-1 konnte diese Bindung auch *in planta* durch Chromatin Immunopräzipitation bestätigt werden. Die Oex-Pflanzen zeigen jedoch keine Auswirkungen auf die *GH3*-Transkriptmenge.

In dieser Arbeit konnte die selektive Bindung von BZI-4 Homodimeren an ein Promotorelement einer antherspezifischen Invertase, der *NIN88* gezeigt werden. Die *NIN88* ist ein potentiell Zielgen von BZI-4. Die Expression der *NIN88* ist in BZI-4-Oex Pflanzen reduziert. In transienten Assays konnte eine reprimierende Wirkung von BZI-4 auf die Genexpression gezeigt werden. BZI-2 und BZI-1 wirken in Hefe und in transienten Assays

aktivierend auf die Expression von Genen. Die potentielle Aktivierungsdomäne von BZI-1 konnte im Aminoterminus lokalisiert werden. BZI-3 wirkt in transienten Assays aktivierend. Es wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Modell vorgestellt, das die verschiedenen Regulationsebenen der Zielgenspezifität durch die BZI-Transkriptionsfaktoren darstellt.

7 Literatur

Abel, S., Ballas, N., Wong, LM., Theologis, A. (1996). DNA elements responsive to auxin. *Bioassays* 18: 647-654

Abel, S., Oeller, PW., Theologis, A. (1994). Early auxin-induced genes encode short-lived nuclear proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 326-330

Abel, S., Theologis, A. (1995). A polymorphic bipartite motif signals nuclear targeting of early auxin-inducible proteins related to PS-IAA4 from pea (*Pisum sativum*). *Plant J.* 8: 87-96

Aguan, K., Sugawara, K., Suzuki, N., Kusano, T. (1993): Low-temperature-dependent expression of a rice gene encoding a protein with a leucine-zipper motif. *Mol. Gen. Genet.* 240: 1-8

Allen, J.B., Walberg, M.W., Edwards, M.C., Elledge, S.J. (1995): Finding prospective partners in the library: the two-hybrid system and phage display find a match. *Trends Biochem. Sci.* 20: 511-516

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990): Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997): Gapped BLAST und PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402

Andrews, NC., Faller, DV. (1991). A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 19: 2499

Andrews, NC., Kotkow, KJ., Ney, PA. Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Orkin, SH. (1993). The ubiquitous subunit of erythroid transcription factor NF-E2 is a small basic-leucine zipper protein related to the v-maf oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11488-11492

Ang, LH., Chattopadhyay, S., Wei, N., Oyama, T., Okada, K., Batschauer, A., Deng, XW. (1998). Molecular interactions between COP1 and HY5 defines a regulatory switch for light control of Arabidopsis development. *Mol. Cell* 1: 213-222

Armstrong, G.A., Weisshaar, B., Hahlbrock, K. (1992): Homodimeric and heterodimeric leucine zipper proteins and nuclear factors from parsley recognize diverse promoter elements with ACGT cores. *Plant Cell* 4: 525-537

Bartel, P.L., Chien, C.-T., Sternglanz, R., Fields, S. (1993): Cellular interactions in development: A practical approach. Oxford: Oxford University Press

Batt, S., Wilkens, MB., Venis, MA. (1976). Auxin binding to corn coleoptile membranes: kinetics and specificity. *Planta* 130: 7-13

Baxevanis, AD., Vinson, CR. (1993). Interactions of coiled coils in transcription factors: where is the specificity? *Curr. Opin. Gen. Dev.* 3: 278-285

- Borisjuk, L., Walenta, S., Weber, H., Mueller-Klieser, W., Wobus, U. (1998). High-resolution histographical mapping of glucose concentrations in developing cotyledones of *Vicia faba* in relation to mitotic activity and storage processes: glucose as a possible developmental trigger. *Plant J.* 15: 583-591
- Böttner, S. (2003). Funktionelle Charakterisierung des Ankyrin-Domänen-Proteins ANK1 aus *Nicotiana tabacum*. Diplomarbeit Universität Göttingen
- Brachmann, R.K., Boeke, J.D. (1997): Tag games in yeast: the two-hybrid system and beyond. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 561-568
- Bradford, M.M. (1979). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- Brent, R., Ptashne, M. (1985): A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell* 43: 729-736
- Cao, JH., Geballe, AP. (1996). Coding sequence-dependent ribosomal arrest at termination of translation. *Mol. Cell. Biol.* 16: 603-608
- Cao, JH., Geballe, AP. (1996). Inhibition of nascent-peptide release at translation termination. *Mol. Cell. Biol.* 16: 7109-7114
- Chattopadhyay, S., Ang, LH., Puente, P., Deng, XW., Wei, N. (1998a). Arabidopsis bZIP protein HY5 directly interacts with light-responsive promoters in mediating light control of gene expression. *Plant Cell* 10: 673-683
- Chattopadhyay, S., Puente, P., Deng, XW., Wei, N. (1998b). Combinatorial interaction of light-responsive elements plays a critical role in determining the response characteristics of light-regulated promoters in Arabidopsis. *Plant J.* 15: 69-77
- Chen, JG., Shimomura, S., Sitbon, F., Sandberg, G., Jones, AM. (2001). The role of auxin-binding protein 1 in the expansion of tobacco leaf cells. *Plant J.* 28: 607-617
- Chen, JG., Ullah, H., Young, JC., Sussman, MR., Jones, AM. (2001a). ABP1 is required for organized cell elongation and division in Arabidopsis embryogenesis. *Genes. Dev.* 15: 902-911
- Cheng, WH., Taliencio, EW., Chourey, PS. (1996). The miniature1 seed locus of maize encodes a cell wall invertase required for normal development of endosperm and maternal cells in the pedicel. *Plant Cell* 8: 971-983
- Chien, C.-T.; Bartel, P.J., Sternglanz, R., Fields, S. (1991): The two-hybrid system. A method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 88: 9578-9582
- Church, G.M., Gilbert, W. (1984). Genomic Sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 1991-1995

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

Ciceri, P., Locatelli, F., Genga, A., Viotti, A., Schmidt, R.J. (1999). The activity of the maize Opaque2 transcriptional activator is regulated diurnally. *Plant Physiol.* 121: 1321-1328

Clontech (1996): *Yeast Protocols Handbook*

Corpet, F. (1988): Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* 16: 10881-10890

Devlin, P.F. (2001): Signs of the time : enviromental input to the circadian clock. *Journal of experimental botany*, 353 (374):1535-1550

Drews, G.N., Beals, T.P., Bui, A.Q., Goldberg, R.B. (1992). Regional and cell-specific gene expression patterns during petal development. *Plant Cell* 4: 1383-1404

Dröge-Laser, W., Kaiser, A., Lindsay, W.P., Halkier, B.A., Loake, G.J., Doerner, P., Dixon, R.A., Lamb, C. (1997): Rapid stimulation of a soybean protein-serin kinase that phosphorylates a novel bZIP DNA-binding protein, G/HBF-1, during the induction of early transcription-dependent defenses. *EMBO J.* 16: 726-738

Ellenberger, T. (1994): Getting a grip on DNA recognition: Structures of the basic region leucine zipper and the basic region helix-loop-helix DNA-binding domains. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 4: 12-21

Ellenberger, T.E., Brandel, C.J., Struhl, K., Harrison, S.C. (1992). The GCN4 basic domain region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted a helices: crystal structure of the protein-DNA complex. *Cell* 71: 1223-1237

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

Feldbrügge, M., Hahlbrock, K., Weisshaar, B. (1996). The transcriptional regulator CPRF1: expression analysis and gene structure. *Mol. Gen. Genet.* 251: 619-627

Fellner, M., Horton, L.A., Cocke, A.E., Stephans, N.R., Ford, D.E., Van Volkenburgh, E. (2003). Light interacts with auxin during leaf elongation and leaf angle development in young corn seedlings. *Planta* 216: 366-376

Fields, S., Sternglanz, R. (1994): The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet.* 10: 286-292

Fields, S., Song, O. (1989): A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340: 245-247

Foster, R., Takeshi, I., Chua, N.-H. (1994): Plant bZIP proteins gather at ACGT elements. *FASEB J.* 8: 192-200

- Frankel, AD., Kim, PS. (1991). Modular structure of transcription factors: implications for gene regulation. *Cell* 65: 717-719
- Fritz, C.C., Green, M.R. (1992): Fishing for partners. *Current Biol.* 2: 403-405
- Fujita, H., Yamamoto, M., Yamagami, T., Hayashi, N., Sassa, S. (1991). Erythroleukemia differentiation. Distinctive responses of the erythroid-specific and the nonspecific δ -aminolevulinic synthase mRNA. *J. Biol. Chem.* 266: 17494-17502
- Gatz, C., Kaiser, A., Wendenburg, R. (1992). Regulation of a modified CaMV 35S promoter by the Tn10-encoded Tet repressor in transgenic tobacco. *Mol. Gen. Genet.* 227: 229-237
- Gatz, C., Lenk, I. (1998). Promoters responding to chemical inducers. *Trends in Plant Sci.* 3: 352-358
- Giniger, E., Varnum, S.M., Ptashne, M. (1985): Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell* 40: 767-774
- Gish, W., States, D.J. (1993): Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nat. Genet.* 3: 266-272.
- Goetz, M., Godt, D.E., Guivarch, A., Kahmann, U., Chriqui, D., Roitsch T. (2001). Induction of male sterility in plants by metabolic engineering of the carbohydrate supply. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 6522-6527
- Grant, CM., Hinnebusch, AG. (1994). Effect of sequence context at Stop codons on efficiency of reinitiation in GCN4 translational control. *Mol. Cell. Biol.* 14: 606-618
- Grant, CM., Miller, PF., Hinnebusch, AG. (1994). Requirements for intercistronic distance and level of eukaryotic initiation factor 2 activity in reinitiation on GCN4 mRNA vary with downstream cistron. *Mol. Cell. Biol.* 14: 2616-2628
- Grant, CM., Miller, PF., Hinnebusch, AG. (1995). Sequences 5' of the first upstream open reading frame in GCN4 mRNA are required for efficient translational reinitiation. *Nucleic Acids Res.* 23: 3980-3988
- Gray, W.M., del Pozo, J.C., Walker, L., Hobbie, L., Risseuw, E., Banks, T., Crosby, W.L., Yang, M., Ma, H., Estelle, M. (1999). Identification of an SCF ubiquitin-ligase complex required for auxin response in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.* 13: 1678-1691
- Gray, W.M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O., Estelle, M. (2001). Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* 414: 271-276
- Gray, WM., Estelle, I. (2000). Function of the ubiquitin-proteasome pathway in auxin response. *Trends Biochem. Sci.* 25: 133-138
- Guarente, L. (1993): Strategies for the identification of interacting proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 1639-1641

- Guarente, L., Yocum, R.R., Gifford, P. (1982): A GAL10-CYC1 hybrid yeast promoter identifies the GAL4 regulatory region as an upstream site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 7410-7414
- Haasen, D., Köhler, C., Neuhaus, G., Merkle, T. (1999). Nuclear export of proteins in plants: AtXPO1 is the export receptor for leucine-rich nuclear export signals in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 20: 695-705
- Hagen, G., Guilfoyle, T. (2002). Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Mol. Biol.* 49: 373-385
- Halazonetis, T.D., Georgopoulos, K., Greenberg, M.E., Leder, P. (1988). c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities. *Cell* 55: 917-924
- Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-80
- Hanna-Rose, W., Hansen, U. (1996). Active repression mechanisms of eukaryotic transcription repressors. *Trends Genet.* 12: 229-234
- Hayama, R., Coupland, G. 2003: Shedding light on the circadian clock and photoperiodic control of flowering. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6(1):13-19
- Hecht, A., Strahl-Bolsinger, S., Grundstein, M. (1996). Spreading of transcriptional repressor SIR3 from telomeric heterochromatin. *Nature* 383: 92-96
- Heinekamp, T. (2002). Der bZIP-Transkriptionsfaktor BZI-1 aus *Nicotiana tabacum*: Analyse der in vivo Funktion durch Modulation der BZI-1-Aktivierungseigenschaften in transgenen Pflanzen. Dissertation Universität Göttingen
- Heinekamp, T., Kuhlmann, M., Lenk, A., Strathmann, A., Dröge-Laser, W. (2002). The tobacco bZIP transcription factor BZI-1 binds to G-box promoter cis-elements of phenylpropanoid pathway genes in vitro, but it is not involved in their regulation in vivo. *Mol. Gen. Genom.* 267: 16-26
- Herbers, K., Meuwly, P., Frommer, W.B., Métraux, J-P., Sonnewald, U. (1996). Systemic acquired resistance mediated by the ectopic expression of invertase: possible hexose sensing in the secretory pathway. *Plant Cell* 8: 793-803
- Herschbach, B.M., Johnson, A.D., (1993). Transcriptional repression in eukaryotes. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 9: 8928-8935
- Hill, J., Donald, K.A., Griffiths, D.E. (1991): DMSO enhanced whole cell yeast transformation. *Nucleic Acids Res.* 19: 5791-5791
- Hill, J.R., Morris, D.R. (1993). Cell-specific translational regulation of S-adenosylmethionine decarboxylase messenger RNA-dependence on translation and coding capacity of the cis-acting upstream open reading frame. *J. Biol. Chem.* 268 :726-731

- Hiratsu, K., Ohta, M., Matsui, K., Ohme-Takagi, M. (2002). The SUPERMAN protein is an active repressor whose carboxy-terminal repression domain is required for the development of normal flowers. *FEBS* 514: 351-354
- Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J., Schilperoort, R.A. (1983). A binary plant vector strategy based on separation of vir and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303, 179-180
- Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J., Schilperoort, R.A. (1983). A binary plant vector strategy based on separation of vir and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303, 179-180
- Holm, M., Ma, L.G., Qu, L.J., Deng, X.W. (2002). Two interacting bZIP proteins are direct targets of COP1-mediated control of light-dependent gene expression in *Arabidopsis*. *Genes. Dev.* 16: 1247-1259
- Igarashi, K., Kataoka, K., Itoh, K., Hayashi, N., Nishizawa, M., Yamamoto, M. (1994): Regulation of transcription by dimerisation of erythroid factor NF-E2 p45 with small Maf proteins. *Nature* 367: 568-572
- Ito, H., Fukada, Y., Murata, K., Kimura, A. (1983): Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153: 163-168
- Iwabuchi, K., Li, B., Bartelt, P., Fields, S. (1993): Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene* 8: 1693-1696
- Izawa, T., Foster, R., Nakajima, M., Shimamoto, K., Chua, N.H. (1994): The rice bZIP transcriptional activator RITA-1 is highly expressed during seed development. *Plant Cell* 6: 1277-1287
- Jakoby, M., Weisshaar, B., Dröge-Laser, W., Tiedemann, J., Kroij, T., Parcy, F. (2002). The family of bZIP transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *Trends Plant Sci.* 7: 1360-1385
- James, P., Halladay, J., Craig, E.A. (1996): Genomic libraries and host strains designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144: 1425-1436
- Johnson, P.F., McKnight, S.L. (1989): Eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 799-839
- Johnson, C., Boden, E., Desai, M., Pascuzzi, P., Arias, J. (2001). In vivo target promoter-binding activities of a xenobiotic stress-activated TGA factor. *Plant J.* 28: 237-243
- Jones, A.M., Im, K.H., Savka, M.A., Wu, M.J., DeWitt, G., Shillito, R., Binns, A.N. (1998). Auxin-dependent cell expansion mediated by overexpressed auxin-binding protein 1. *Science* 282: 1114-1117
- Jones, A.M., Venis, M.A. (1989). Photoaffinity labeling of auxin-binding proteins in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 6153-6156

- Kataoka, K., Igorashi, K., Itoh, K., Fujiwara, K.T., Noda, M., Yamamoto, M., Nishizawa, M. (1995): Small Maf proteins heterodimerize with Fos and may act as competitive repressors of the NF-E2 transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* 15: 2180-2190
- Kataoka, K., Shioda, S., Yoshitomo-Nakagawa, K., Handa, H., Nishizawa, M. (2001). Maf und Jun nuclear oncoproteins share downstream target genes for inducing cell transformation. *J. Biol. Chem.* 276: 36849-36856
- Kato, K., Makino, Y., Kishimoto, T., Yamauchi, J., Kato, S., Muramatsu, M., Tamura, T. 1994; Multimerization of mouse TATA-binding protein (TBP) driven by its C-terminal conserved domain. *Nucleic Acids Res.* 7: 1179-1185
- Keegan, L., Gill, G., Ptashne, M. (1986): Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science* 231: 699-704
- Keller, CP., Van Volkenburgh, E. (1997). Auxin-induced epinasty of tobacco leaf tissues. A non-ethylene mediated response. *Plant Physiol.* 113: 603-610
- Keller, W., König, P., Richmond, TJ. (1995). Crystal structure of a bZIP/DNA complex at 2.2 Angström: determinants of DNA specific recognition. *J. Mol. Biol.* 254: 657-667
- Kircher, S., Ledger, S., Hayashi, B., Weisshaar, B., Schäfer, E., Frohnmeyer, H. (1998): CPRF4a, a novel plant bZIP protein of the CPRF family: Comparative analyses of light-dependent expression, post-transcriptional regulation, nuclear import and heterodimerisation. *Mol. Gen. Genet.* 257: 595-605
- Koch, KE. (1996). Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.* 47: 509-540
- König, O., Richmond, TJ. (1993). The X-ray structure of the GCN4-bZIP bound to ATF/CREB site DNA shows the complex depends on DNA flexibility. *J. Mol. Biol.* 233: 139-154
- Koornneef, M., Benstink, L., Hilhorst, H. (2002). Seed dormancy and germination. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 33-36
- Kozak, M. (1989): The scanning model for translation: An update. *J. Cell Biol.* 108: 229-241.
- Kuhlmann, M. (2002). Charakterisierung der konservierten Domänen des Transkriptionsfaktors N.t. BZI-1. Dissertation Universität Göttingen
- Kuhlmann, M., Horvay, K., Strathmann, A., Heinekamp, T., Fischer, U., Böttner, S., Dröge-Laser, W. (2003). The alpha-helical D1 domain of the tobacco bZIP transcription factor BZI-1 interacts with the ankyrin-repeat protein ANK-1 and is important for BZI-1 function, both in auxin signalling and pathogene response. *J. Biol. Chem.* 278: 8786-8794
- Kusano, T., Berberich, T., Harada, M., Suzuki, N., Sugawara, K. (1995): A maize DNA-binding factor with a bZIP motif is induced by low temperature. *Mol. Gen. Genet.* 248: 507-517

- Kusano, T., Sugawara, K., Harada, M., Berberich, T. (1998): Molecular cloning and partial characterization of a tobacco cDNA encoding a small bZIP protein. *Biochem. Biophys. Acta* 1395: 171-175
- Kyhse-Anderson, J. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 10: 203-209
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 690-685
- Lamb, P., McKnight, S.L. (1991). Diversity and specificity in transcriptional regulation: the benefits of heterotypic dimerization. *Trends Biochem. Sci.* 16: 417-422
- Landschulz, W.H., Johnson, P.F., McKnight, S.L. (1988). The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240: 1759-1764
- Le Gouill, C., Parent, J.L., Rola-Pleszczynski, M., Stankowa, J. (1994): Analysis of recombinant plasmids by a modified alkaline lysis method. *Analytical Biochem.* 219: 164
- 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., Harn, C.H. (2002). PPI1: a novel pathogen-induced basic region-leucine zipper (bZIP) transcription factor from pepper. *Mol. Plant Microbe Interact.* 6: 540-548
- Li, B., Fields, S. (1993): Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 T antigen by using the yeast two-hybrid system. *FASEB J.* 7: 957-963
- Lincoln, C., Britton, J.H., Estelle, M. (1990). Growth and development of the axr1 mutants of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2: 1071-1080
- Liscum, E., Reed, J.W. (2002). Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Mol. Biol.* 46: 387-400
- Liu, Z.B., Hagen, G., Guilfoyle, T.J. (1997). A G-box-binding protein from soybean binds to the E1 auxin-response element in the soybean GH3 promoter and contains a proline-rich repression domain. *Plant Physiol.* 115: 397-407
- Liu, Z.B., Ulmasov, T., Shi, X., Hagen, G., Guilfoyle, T.J. (1994). Soybean GH3 promoter contains multiple auxin-inducible elements. *Plant Cell* 6: 645-657
- Lupas, A. (1996): Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem. Sci.* 21: 375-382
- Lupas, A., Van Dyke, M., Stock, J. (1991). Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* 252: 1162-1164
- Ma, J., Ptashne, M. (1987): A new class of yeast transcriptional activators. *Cell* 51: 113-119
- Madden, T.L., Tatusov, R.L., Zhang, J. (1996): Applications of network BLAST server. *Meth. Enzymol.* 266: 131-141

- Martinez-Garcia, J.F., Moyano, E., Alcocer, M.J.C., Martin, C. (1998): Two bZIP proteins from *Antirrhinum* flowers preferentially bind a hybrid C-box / G-box motif and help to define a new sub-family of bZIP transcription factors. *Plant J.* 13: 489-505
- McDonell, M.W., Simon, M.N., 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: 119-146
- McLachlan, A., Steward, M. (1975). Tropomyosin coiled-coil interactions: evidence for an unstaggered structure. *J. Mol. Biol.* 98: 293-304
- Menkens, A.E., Cashmore, A.R. (1994): Isolation and characterization of a G-box-binding factor, which has similarities to Fos oncoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2522-2526
- Miller, J.H. (1972): Experiments in molecular genetics, Kapitel: Assay for β -Galaktosidase. Cold Spring Harbor, New York: CSHL Press
- Morris, DR., Geballe, AP. (2000). Upstream open reading frames as regulators of mRNA translation. *Mol. Cell. Biol.* 20: 8635-8642
- Mullis, K.B., Faloona, F.A. (1987): Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497
- Naguapalli, S., Pongubala, JM., Atchison, ML. 1995: Multiple proteins physically interact with PU1. Transcriptional synergy with NF-IL6 beta (C/EBP delta, CRP3). *J. Immunol.* 9: 4330-4338
- Nakase, M., Aoki, N., Matsuda, T., Adachi, T. (1997): Characterization of a novel rice bZIP protein which binds to the α -globulin promoter. *Plant Mol. Biol.* 33: 513-522
- Nakazawa, M., Yabe, N., Ichikawa, T., Yamamoto, YY., Yoshizumi, T., Hasunuma, K., Matsui, M. (2001). DFL1, an auxin-responsive GH3 gene homologue, negatively regulates shoot cell elongation and lateral root formation, and positively regulates the light response of hypocotyl length. *Plant J.* 25: 213-221
- Napier, RM., David, KM., Perrot-Rechenmann, C. (2002). A short history of auxin-binding proteins. *Plant Mol. Biol.* 3-4: 339-48
- Nemhauser, J.L., Zambryski, P.C., Roe, J.L. (1998). Auxin signaling in Arabidopsis flower development? *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 531-535
- Nickolov, KI. (2003). Subzelluläre Lokalisation von TGA Transkriptionsfaktoren aus *Nicotiana tabacum*. Dissertation Universität Göttingen
- Niggeweg, R., Thurow, C., Kegler, C., Gatz, C. (2000). Tobacco transcription factor TGA2.2 is the main component of as-1-binding factor ASF-1 and is involved in salicylic acid- and auxin-inducible expression of as-1-containing target promoters. *J Biol. Chem.* 275: 19897-19905

- Niu, X., Renshaw Gegg, L., Miller, L., Guiltinan, M.J. (1999). Bipartite determinants of DNA-binding specificity of plant basic leucine zipper proteins. *Plant Mol. Biol.* 41: 1-13
- Ohta, M., Matsui, K., Hiratsu, K., Shinshi, H., Ohme-Takagi, M. (2001). Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression. *Plant Cell* 13: 1959-1968
- Onate, L., Vicente-Carbajosa, J., Lara, P., Diaz, I., Carbonero, P. (1999). Barley BLZ2, a seed-specific bZIP protein that interacts with BLZ1 in vivo and activates transcription from the GCN4-like motif of B-hordein promoters in barley endosperm. *J. Biol. Chem.* 274: 9175-9182
- O'Shea, E.K., Rutkowski, R., Kim, P.S. (1989). Evidence that the leucine zipper is a coiled coil. *Science* 243: 538-542
- Osterlund, MT., Ang, LH., Deng, XW. (1999). The role of COP1 in repression of Arabidopsis photomorphogenic development. *Trends Cell Biol.* 9: 113-118
- Osterlund, MT., Hardtke, CS., Wie, N., Deng, XW. (2000). Target destabilization of HY5 during light-regulated development of Arabidopsis. *Nature* 405: 462-466
- Oyama, T., Shimura, Y., Okada, K. (1997). The Arabidopsis HY5 gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. *Genes. Dev.* 11: 2983-2995
- Parry, DA. (1982). Coiled-coils in alpha-helix-containing proteins: analysis of the residue types within the heptad repeat and the use of these data in the prediction of coiled-coils in other proteins. *Biosci. Rep.* 2: 1017-1024
- Pego, JV., Kortstee, AJ., Huijser, C., Smeekens, SC. (2000). Photosynthesis, sugars and the regulation of gene expression. *J. Exp. Bot.* 51: 407-416
- Pelham, HR., Jackson, RJ. (1976). An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur. J. Biochem.* 67: 247-256
- Printen, J.A., Spargue, G.F. (1994): Protein interactions in the yeast pheromone response pathway: Ste5p interacts with all members of the MAP kinase cascade. *Genetics* 138: 609-619
- Ptashne, M., Gann, A. (1997): Transcriptional activation by recruitment. *Nature* 386: 569-577
- Pysh, L.D., Aukerman, M.J., Schmidt, R.J. (1993): OHP1: a maize basic domain/leucine zipper protein that interacts with Opaque2. *Plant Cell* 5: 227-236
- Qiagen (1998a): Qiaprep Miniprep Handbuch.
- Qiagen (1998b): Qiagen Plasmid Purification Handbook.
- Qiagen (1999): QIAquick Spin Handbook.
- Ray, PM., Dohrmann, U., Hertel, R. (1977). Specificity of auxin-binding sites on maize coleoptile membranes as possible receptor sites for auxin action. *Plant Physiol.* 60: 585-591

- Riechers, DE., Timko, MP. (1999). Structure and expression of the gene family encoding putrescine N-methyltransferase in *Nicotiana tabacum* : new clues to the evolutionary origin of cultivated tobacco. *Plant Mol. Biol.* 41: 387-401
- Riechmann, JI., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C., Keddie, J., Adam, L., Pineda, o., Ratcliffe, OJ., Samaha, RR., Creelmann, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, JZ., Ghandehari, D., Sherman, BK., Yu, G, (2000). *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 290: 2105-2110
- Riechmann, JI., Ratcliffe, OJ. (2000). A genomic perspective on plant transcription factors. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 423-434
- Rieping, M., Fritz, M., Prat, S., Gatz, C. (1994). A dominant negative mutant of PG13 suppresses transcription from a cauliflower mosaic virus 35S truncated promoter in transgenic tobacco plants. *Plant Cell* 6 : 1087-1098
- Riou-Khamlichi, C., Menges, M., Healy, JMS., Murray, JAH. (2000). Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of *Arabidopsis* D-Type cyclin gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 20: 4513-4521
- Robinson, DG., Hinz, G. (2001). *Plant Cell Biology*, herausgegeben von Hawes, C. und Satiat-Jennemaitre, B. Oxford University Press
- Roitsch, T. (1999). Source-sink regulation by sugar and stress. *Curr. Opin Plant Biol.* 2: 198-206
- Rolland, F., Moore, B., Sheen, J. (2002). Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell* 14: S185-205
- Rook, F., Gerrits, N., Kortstee, A., van Kampen, M., Borrias, M., Weisbeek, P., Smeekens, S. (1998b): Sucrose-specific signalling represses translation of the *Arabidopsis* *ATB2* bZIP transcription factor gene. *Plant J.* 15: 253-263
- Rook, F., Weisbeek, P., Smeekens, S. (1998a): The light-regulated *Arabidopsis* bZIP transcription factor gene *ATB2* encodes a protein with an unusually long leucine zipper domain. *Plant Mol. Biol.* 37: 171-178
- Roux, C., Perrot-Rechenmann, C. (1997). Isolation by differential display and characterization of a tobacco auxin-responsive cDNA Nt-gh3, related to GH3. *FEBS* 419: 131-136
- Rügner, A., Frohnmeyer, H., Nake, C., Wellmer, F., Kircher, S., Schafer, E., Harter, K. (2001). Isolation and characterization of four novel parsley proteins that interact with the transcriptional regulators CPRF1 and CPRF2. *Mol. Genet. Genomics* 265: 964-976
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989): *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467

Schindler, U., Terzaghi, W., Beckmann, H., Ecker, J.R., Cashmore, A.R. (1992): DNA binding site preferences and transcriptional activation properties of the *Arabidopsis* transcription factor GBF1. *EMBO J.* 11: 1275-289

Schmid, J., Doerner, P.W., Clouse, S.D., Dixon, R.A., Lamb, C.J. (1990). Developmental and environmental regulation of a bean chalcon synthase promoter in transgenic tobacco. *Plant Cell* 2: 619-631

Schwechheimer, C., Bevan, M. (1998). The regulation of transcription factor activity in plants. *Trends in Plant Sci.* 3: 378-383

Sheen, J. (1990). Metabolic repression of transcription in higher plants. *Plant Cell* 2: 1027-1038

Siberil, Y., Doireau, P., Gantet, P. (2001). Plant bZIP G-box binding factors. Modular structure and activation mechanisms. *European Journal of biochemistry FEBS* 268: 5655-5666

Siebert, P.D., Chenchik, A., Kellog, D.E., Lukyanov, K.A., Lukyanov, S.A. (1995). An improved method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 23: 1087-1088

Singh, K., Dennis, E.S., Ellis, J.G., Llewellyn, D.J., Tokuhisa, J.G., Wahleithner, J.A., Peacock, W.J. (1990): OCSBF-1, a maize ocs enhancer binding factor: isolation and expression during development. *Plant Cell* 2: 891-903

SMART RACE cDNA amplification kit user Manual, Clontech 1999

Smeeckens, S., Rook, F. (1997). Sugar sensing and sugar-mediated signal transduction in plants. *Plant Physiol.* 115: 7-13

Solomon, M.J., Larsen, P.J., Varshavsky, A. (1988). Mapping protein-DNA intersections in vivo with formaldehyde: Evidence that histone H4 is retained on highly transcribed gene. *Cell* 53: 937-947

Solomon, M.J., Varshavsky, A. (1985). Formaldehyde mediated DNA-protein crosslinking: A probe for in vivo chromatin structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 82: 6470-6474

Sonnewald, U., Brauer, M., von Schaewen, A., Stitt, M., Willmitzer, L. (1991). Transgenic tobacco plants expressing yeast-derived invertase in either the cytosol, vacuole or apoplast: A powerful tool for studying sucrose metabolism and sink/source interactions. *Plant J.* 1: 95-106

Southern, E. (1979): Gel electrophoresis of restriction fragments. *Meth. Enzymol.* 68: 152-176

Sprenger-Haussels, M., Weisshaar, B. (2000). Transactivation properties of parsley proline-rich bZIP transcription factors. *Plant J.* 22: 1-8

Stargell, L.A., Struhl, K. (1996): Mechanisms of transcriptional activation in vivo: Two steps forward. *Trends Genet.* 12: 311-315

- Strathmann, A. (1999). Identifizierung von Protein-Interaktionspartnern des bZIP-Transkriptionsfaktors G/HBF-1 mit Hilfe des Hefe-Two-Hybrid“-Systems. Diplomarbeit Universität Göttingen
- Strathmann, A., Kuhlmann, M., Heinekamp, T., Droge-Laser, W. (2001). BZI-1 specifically heterodimerises with the tobacco bZIP transcription factors BZI-2, BZI-3/TBZF and BZI-4, and is functionally involved in flower development. *Plant J.* 28: 397-408
- Suckow, M., Kisters-Woike, B., Hollenberg, CP. (1999). A novel feature of DNA recognition: a mutant Gcn4p bZip peptide with dual DNA binding specificities dependent of half-site spacing. *J. Mol. Biol.* 286: 983-987
- Theill, L.E., Castrillo, J.-L., Wu, D., Karin, M. (1989): Dissection of functional domains of the pituitary-specific transcription factor GHF-1. *Nature* 342: 945-948
- Thurow, C. (2001). Biochemische Aufreinigung, funktionelle Analyse und Identifikation eines Interaktionspartners des an der Salicylsäure-induzierbaren Genexpression beteiligten SARP-Komplexes aus Tabak. Dissertation Universität Göttingen
- Tiwari, SB., Hagen, G., Guilfoyle, T. (2003). The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. *Plant Cell* 15: 533-543
- Tiwari, SB., Wang, XJ., Hagen, G., Guilfoyle, TJ. (2001). AUX/IAA proteins are active repressors, and their stability and activity are modulated by auxin. *Plant Cell*, 13: 2809-2822
- Triezenberg, SJ. (1995). Structure and function of transcriptional activation domains. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5: 190-196
- Ulmasov, T., Hagen, G., Guilfoyle, T.J. (1997). ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science* 276: 1865-1868
- Ulmasov, T., Hagen, G., Guilfoyle, T.J. (1999). Activation and repression of transcription by auxin-response factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 5844-5849
- Ulmasov, T., Liu, Z.B., Hagen, G., Guilfoyle, T.J. (1995). Composite structure of auxin response elements. *Plant Cell* 7: 1611-1623
- Universal GenomeWalker Kit user manual, Clontech 2000
- Van der Krol, AR., Chua, NH. (1991). The basic domain of plant B-ZIP proteins facilitates import of a reporter protein into plant nuclei. *Plant Cell* 3: 667-675
- Varagona, M.J., Raikhel, N.V. (1994). The basic domain in the bZIP regulatory protein Opaque2 serves two independent functions: DNA binding and nuclear localization. *Plant J.* 5: 207-214
- Vinson, C., Mayakishev, M., Acharya, A., Mir, AA., Moll, JR., Bonovich, M. (2002). Classification of human B-ZIP proteins based on dimerization properties. *Mol. Cell. Biol.* 22: 6321-6335

- Vinson, C.R., Sigler, P.B., McKnight, S.L. (1989): Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science* 246: 911-916
- Vinson, CR., Hai, T., Boyd, SM. (1993). Dimerization specificity of the leucine zipper-containing bZIP motif on DNA-binding : prediction and rational design. *Genes Dev.* 7: 1047-1058
- Vogler, H., Kuhlemeier, C. (2003): Simple Hormones but complex signalling. *Cur. Opin. Plant Biol.* 6: 51-56
- Von Arnim, AG., Deng, XW. (1994). Light inactivation of Arabidopsis photomorphogenic repressor COP1 involves a cell-specific regulation of its nucleocytoplasmic partitioning. *Cell* 79: 1035-1045
- Von Schaewen, A., Stitt, M., Schmidt, R., Sonnewald, U., Willmitzer, L. (1990). Expression of yeast-derived invertase in the cell wall of tobacco and Arabidopsis plants leads to accumulation of carbohydrate and inhibition of photosynthesis and strongly influences growth phenotype of transgenic tobacco plants. *EMBO J.* 9: 3033-3044
- Weber, H., Borisjuk, L., Heim, U., Sauer, N., Wobus, U. (1997). A role for sugar transporters during seed development: molecular characterization of a hexose and a sucrose carrier in fava bean seeds. *Plant Cell* 9: 895-908
- Weber, H., Buchner, P., Borisjuk, L., Wobus, U. (1996): Sucrose metabolism during cotyledon development of *Vicia faba* L. is controlled by the concerted action of both sucrose-phosphate synthase and sucrose synthase: expression patterns, metabolic regulation and implications for seed development. *Plant J.* 9: 841-850
- Weisshaar, B., Armstrong, G.A., Block, A., da Costa e Silva, O., Hahlbrock, K. (1991): Light-inducible and constitutively expressed DNA-binding proteins recognizing a plant promoter element with functional relevance in light responsiveness. *EMBO J.* 10: 1777-1786
- Werner, M., Feller, A., Messenguy, F., Pierard, A. (1987): The leader peptide of yeast gene CPA1 is essential for the translational repression of its expression. *Cell* 49: 805-813
- Worley, CK., Zenser, N., Ramos, J., Rouse, D., Leyser, O., Theologis, A., Callis, J. (2000). Degradation of Aux/IAA proteins is essential for normal auxin binding. *Plant J.* 21: 553-562
- Yang, S.H., Berberich, T., Sano, H., Kusano, T. (2001). Specific association of transcripts of *tbzF* and *tbz17*, tobacco genes encoding basic region leucine zipper-type transcriptional activators, with guard cells of senescing leaves and/or flowers. *Plant Physiol.* 127: 23-32

8 Anhang

8.1 Vektorkarten der im Rahmen dieser Arbeit erstellten Plasmide

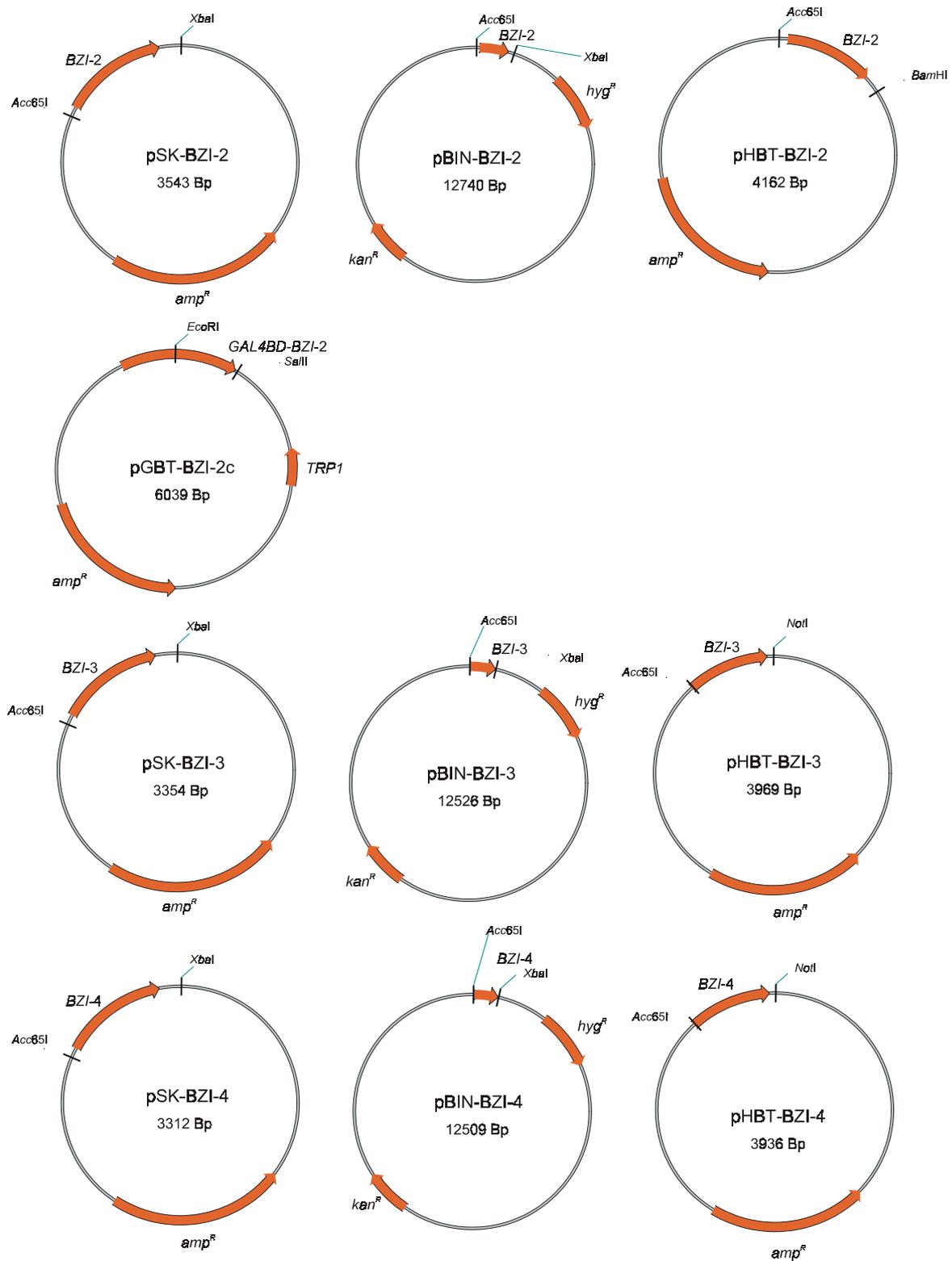


Abb. 8.1: Vektorkarten der im Rahmen dieser Arbeit erstellten Plasmide. *amp^R*: vermittelt Ampicillinresistenz; *hyg^R*: vermittelt Hygromycinresistenz; *kan^R*: vermittelt Kanamycinresistenz, *TRP1*: vermittelt Tryptophanautotrophie. Eingezeichnet sind nur die jeweils zur Konstruktion verwendeten Schnittstellen.

8.2 Darstellung der berechneten coiled-coiled Wahrscheinlichkeiten für die Leucinzipper-Bereiche

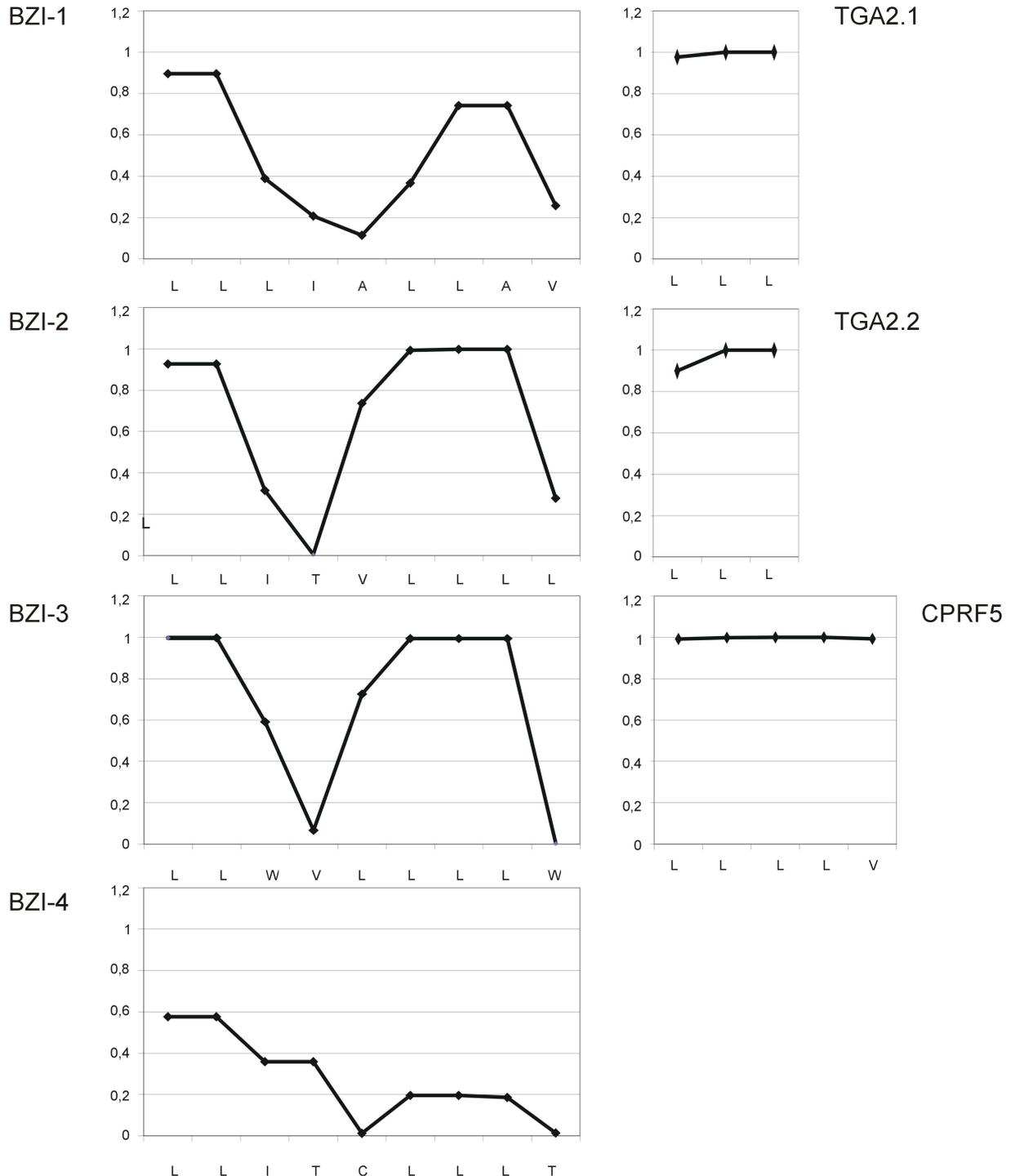


Abb. 8.2: Graphische Darstellung der mit dem „Coils“-Programm (Lupas et al., 1991; Lupas, 1996) berechneten Wahrscheinlichkeiten zur Ausbildung von coiled-coil Strukturen (benutzte Einstellungen: MTIDK-Matrix, Window=14). Aufgetragen ist jeweils der Wert für die Aminosäure an Position d (Nomenklatur nach McLachlan und Steward 1975). Die Aminosäure ist unter der Abszisse vermerkt. Auf der Ordinate ist der Wert für die Wahrscheinlichkeit von coiled-coil Konformationen aufgetragen. Ein Wert von 1 bedeutet eine hohe Wahrscheinlichkeit, ein Wert von 0 eine geringe Wahrscheinlichkeit.

8.3 Sequenz des *NIN88* Promotors

ttacgccaaagcttgcattgcctgcaggtcgagccattcatgttcagccattctggaaagt
 tgctacaaccattccttctgatacattcggttaaggtcatccttactctgttgatcgagc
 gaggaagtccctcaatccctctccgagtgattgtttgatggcaaatatcgttcactct
 tgcctccgcttttttagcccaacatgggccattatgaacttgcggccatctcttcgaa
 tatttcaatggagcgcggcagctgtgaataccaagtcaatgctcctccgtaaggt
 ctgcgcaacattttcaacaagatggaggagacttgttctttggagagatcattgcctt
 taccgagtgacataatgattacatgatcttcggggtcggctgaccatcataaatttcc
 agataaggtggcatcttgaacgtcttgggtatggcataatggggcggcttcatcactgtag C/T-Box
 gggttgcactaaccgaccgctctcttttggaaatatttttggggcaccggatt (-2876)
 ttatcgactcttcttgggtgtctctcatttgatcccgaagcattttatcttcttcc
 atttcttccattttctcagaatggcgtgaggggtgattactctgatttataatattg
 tgagtatacctgttactgaagggggaggggtcgtgctgtttgggtcattgctggtgcaatg
 caagcttctgactttcttaaacctcctgagtggtttgttgaggatgcccggctcagc
 atatttgcagccaagcttcgagtagcttcttcaccgctgggtggcgcctctccggtgtg
 gacgtggaagctcctttaccgcggtggttgcgatactgctgtgaggggaggggtgatcca G/C-Box
 ctctcgtcggggagaggtgttagggcttatgccttcgcttctatttccggagacctcattg (-2474)
 atgggttttaagatttggtagtgagattggccactgccttcaatccttcttctccctta
 cctgccatgtcagatctgggtgtacaaggaagtaggagcttctcttcttcttcttcttga
 attgtgcccagttatagatctaaaagaaactaaagtttaactagactatcctcacagacg
 gcgcaaatgtttgacaaaaaatatagacttttgattaaatataatattgtatga
 caaaggattaaacttcttaagataataaactcagatctataatcaatcaacccaatc
 acgtaatagcagcgttgagagaagattaaatgtgatgtacattcaatatttcaagatcat A/G-Box
 taatgataggggaatatcaagcaataaataacgataaatggcattaaagtaataaggag (2055)
 aatgattcaccacaatattgaatgaggtggatgattcttcttcttcttcttcttcttcttga
 agcaaatagcagcgttgaggaccctctcggatcctaatgaaaaagtagtaataagta
 gataatcgaatctctttagaaaagtagtgattgtctttatctagagagaaagctgctt
 tcaaaagaatattttatcagagaatattacatccccctctctccctatctcttcttctta
 ttatattgggacattctcaatcaatcctaaaagtagacatacacaagaatattcaataaaa
 atattttttgaaatattctattataaaaactagctgttagcactgcacctcggctgcttat
 tgactactcggttacgagccctgtcatttactaatcgacctcgattacatcactttctac
 gatactgcttcatgtcaaatcttaatgaaagcagattttgaccatacaataatagaca
 aaattgcttccaaagaaaacatggctcttatagtgaaatcctgtagactgttatagaaa
 gatctgaattttatataagaataggttttttcttcttcttcttcttcttcttcttcttctt
 agcaacctgaatagaaaagccttagtaactatatacaaggaatgggtgttttcttctt
 aaatattgataaaaaatttggtaatatagaagattagatcaatcaaaaaggttatgggtgg
 agtggttaagcagagggcggacctatgtgttatagtaaggggtcaccactactagaaatcc
 ggtaaagatcgatcaaaaaccgaccaacattggctcggtaatggcaaaaactgacaaa
 acgctgacttaccgtgtgaaacgggtatttttgggtcggaaaggaataccgacaaaagt G/A-Box
 ggtcggaaattaccgaccaactttgggtcgggtcaattaaattcaaaaaaatattgtaaaa (-1083)
 aaaaaccgacaaaagttgatcgggtattttaaattatgtaataaaaagattcactatctggg
 aatcgaaccgggtctgactatggcaagatactattctaccactagaccattgggtcatt
 tttgttttaagactgtcttttttattgatttactctttaaattatatttttgcacgaaaa
 taaccgacaaaagttggctcgatttttataaaaagtaaaattacttaccaaaagttggctga
 tttttttaaattgatccgccaatataaccgaccaattttggtaggtttttttaaattaat
 ttttattttttaaattgaaaaactaaccaaaagtttagtcgggttcttgaacataaattt
 cgcggaactcaaaaatagtttcccgatttttgcgcaagaaaaccgacaaaagttgggt
 cggtttcgtaaaaaaaaaaaaaatttaaaaaatataattttaaaaaccgaccaacttttag
 tcgggttttttggctgattttttgaccgacaaaagttgggtcggctgacctgggtcgggtt
 tgccgaatttctagtagtgaccgaacctgtaagcttcgggagaaattttgtatagtat

G-Box-Fragment

atgtctatctccttaaaatgattaatttaagcaccgtggcaccctgaataactagaagcct G-Box
 (-342)

G/T-Box-Fragment

ttaggggcactagatgagcagaataaacgtgttctcgtcgcgtaaaaaatcttggatccgcc G/T-Box
 (-290)

tatgatggtaagtacttctctgccttaatacagaggtttcgacttcgagctccagatata
 aactatagactcgtctttatagcacttttaataagactatgacttcatctgatttctct
 ataaaactcctcaagcttctcgggttctctcctcattgttcagtttcttctccacatcaca
 gaagtgaacaaaacaagaagaagaagaagaagaagaagaagaagaagaagaagaagaaga
 agtccaatagggaaaatg

Abb. 4.35: Der Promotorbereich des Gens *NIN88* (Goetz *et al.*, 2001). ACGT-Elemente wurden durch graue Unterlegung hervorgehoben. Die in GRA eingesetzten Fragmente wurden durch Balken gekennzeichnet. Das Start-ATG der Translation ist durch Fettdruck hervorgehoben. Die Positionen der ACGT Elemente stromaufwärts von diesem Start-ATG der Translation sind auf der rechten Seite eingetragen.

8.4 Abkürzungen

'	Minuten
4-MU	4-Methylumbelliferyl
4-MUG	4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid
6-BAP	6-Benzylaminopurin
<i>A.m.</i>	<i>Antirrhinum majus</i>
<i>A.t.</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>Acc. #</i>	Genbank-Nummer
AD	Aktivierungsdomäne
amp ^(R)	Ampicillin (resistent)
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BD	Bindedomäne
bidest.	bidestilliert
BIS	N,N'-Methylenbisacrylamid
Bp	Basenpaar(e)
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
BY-2	Bright Yellow 2 <i>Nicotiana tabacum</i> Suspensionskultur
bZIP	basische Region und Leucin-Zipper-Domäne
bzw.	beziehungsweise
<i>C.c.</i>	<i>Capsicum chinense</i>
ca.	circa
CaMV	Blumenkohlmosaikvirus (Cauliflower Mosaic Virus)
cDNA	komplementäre DNA
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
CIAP	Calf Intestine Alkaline Phosphatase
cv.	Kultivar
d.h.	das heißt
ddNTP	Didesoxyribonucleotide
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotide
dsDNA	Doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	Elektrophoretic Mobility Shift Assay
<i>et al.</i>	und andere
Et.Br.	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
<i>G.m.</i>	<i>Glycine max</i>
GFP	Green fluorescent protein
GRA	Gel Retardations Analysen
GUS	β -Glucuronidase
<i>H.v.</i>	<i>Hordeum vulgare</i>
HA	Influenza Hämagglutinin-Protein
HEC	Hydroxyethyl-Cellulose

HR	Hypersensitive Response
hyg ^(R)	Hygromycin (resistent)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
KAc	Kaliumacetat
kb	kilo Basen(paare)
km ^(R)	Kanamycin (resistent)
LB	Luria-Bertani Broth
LiAc	Litiumacetat
liq.	flüssig
mcs	multiple cloning site
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
<i>n.d.</i>	nicht determiniert
<i>N.t.</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
NAA	α -Naphthalinessigsäure
NLB	Nuclear Lysis Buffer
NLS	Kernlokalisierungssignal (nuclear localization signal)
<i>nos</i>	Nopalinsynthase
<i>O.s.</i>	<i>Oryza sativa</i>
<i>ocs</i>	Octopinsynthase
OD	optische Dichte
Oex	Überexpressionspflanze
oNPG	o-Nitrophenyl β -D-Galactopyranosid
<i>P. syringae</i> pv. <i>lisi</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lisi</i>
<i>P.c.</i>	<i>Petroselinum crispum</i>
pA oder polyA	Polyadenylierungssignal
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PEG	Polyethylenglycol
polydIdC	Polydesoxyinosin-desoxycytidylsäure
pv.	Pathovar
PVDF	Polyvinylendifluorid
R.s.	<i>Raphanus sativus</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodiumdodecylsulfate)
SNN	<i>N.t.</i> cv Samsun NN
SSC	Standard Saline Citrat Puffer
<i>T.a.</i>	<i>Triticum aestivum</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris buffered saline
Tc	Chlor-Tetracyclin
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetraethylethylendiamin
TetR	Tetracyclin Repressor von <i>Tn 10</i>
T _m	Schmelztemperatur
TMV	Tabakmosaikvirus

Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trp	Tryptophan
U	Unit
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
VP16	<i>Herpes Simplex</i> Virion Protein 16 (Aktivierungsdomäne)
w/v	Gewichtsprozent (weight per volume)
w/v	Gewichtsprozent (weight per volume)
Wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel
<i>Z.m.</i>	<i>Zea mays</i>
λ	Bakteriophage Lambda

8.5 Präfixe

k	kilo (10^3)
m	milli (10^{-3})
μ	mikro (10^{-6})
n	nano (10^{-9})
p	pico (10^{-12})
f	femto (10^{-15})

8.6 Einheiten

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

8.7 Nukleotide

A	Adenosin
C	Cytosin
G	Guanosin
T	Thymin
U	Uracil

8.8 Aminosäuren

Symbol	Abkürzung	Aminosäure	Symbol	Abkürzung	Aminosäure
A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Thryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen Menschen bedanken, die mir bei der Anfertigung dieser Arbeit zur Seite gestanden haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Wolfgang Dröge-Laser für die Möglichkeit, dieses Thema zu bearbeiten und die Betreuung meiner Dissertation. Die Diskussionen über Ideen und Modelle haben es immer spannend gemacht.

Herrn PD Dr. Giselbert Hinz möchte ich für die Übernahme des Korreferats und die technischen Tipps danken.

Frau Professorin Christiane Gatz danke ich dafür, dass ich in Ihrer Abteilung arbeiten durfte. Bei den ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der Abteilung Gatz bedanke ich mich für die zuvorkommende Hilfe und guten Ratschläge. Besonderer Dank an Alex, Ronald und Anna für die technische Unterstützung. Danke an Corinna Thurow für die Plasmide pGAD-TGA2.1 und pGAD-TGA2.2. Vielen Dank auch den Gärtnern Frau Glasenapp und Herrn Wedemeyer für die Pflanzenaufzucht.

Bei Frau Froissard und Frau Perrot-Rechenmann möchte ich mich für die *N.t. GH3* Promotorsequenz bedanken. Herrn Goetz und Herrn Roitsch danke ich für den *NIN88* Promotor. Dank auch an Herrn Rügner und Herrn Harter für die Plasmide pGAD-CPRF6, pGAD-CPRF7 und pGAD-CPRF5.

Mein Dank gilt besonders den „Wolfgang Dröge-Laser Leuten“: Markus Kuhlmann, Thorsten Heinekamp, Ute Fischer, Katja Horvay, Fridtjof Weltmeier, Xuan Wang, Stefan Böttner, Kathrin Wehler und Ju-Jin Bae, ohne die das alles nicht soviel Spaß gemacht hätte und die mich so vielfältig unterstützt haben. Nicht zu vergessen Klopfer, der sich für die Antikörperproduktion hergegeben hat.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für die Unterstützung und Ihr Interesse an meiner Arbeit. Besonders lieber Dank an Daniel, der mir zur Seite stand und der mir mit Wissen, Essen, Witz und Kritik so sehr geholfen hat.

Lebenslauf

Name: Anne Strathmann
Geburtsdatum: 19.10.1974
Geburtsort: Salzkotten
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schulbildung:

1981-1985 Grundschule Paderborn
1985-1994 Pelizaeus-Gymnasium Paderborn
1994 Allgemeine Hochschulreife

Studium:

1994-1999 Diplomstudiengang Biologie, Universität Göttingen
Hauptfach: Botanik
Nebenfächer: Biochemie und Pflanzenzüchtung
1999 Diplom. Thema der Diplomarbeit: Identifizierung von Protein-
Interaktionspartnern des bZIP-Transkriptionsfaktors G/HBF-1
mit Hilfe des Hefe-„Two-Hybrid“-Systems
1999 Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden
Dissertation am Albrecht-von-Haller Institut für
Pflanzenwissenschaften, Abteilung Allgemeine und
Entwicklungsphysiologie der Pflanze

Göttingen, 26.5.2003

Anne Strathmann

Erklärung an Eides Statt

Die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Funktionelle Charakterisierung der Interaktion des Tabak bZIP-Transkriptionsfaktors BZI-1 mit BZI-2, BZI-3 und BZI-4“ wurde von mir, Anne Strathmann, selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

Göttingen, den 26. Mai 2002

Anne Strathmann