

**Funktionsanalyse der Ankyrin-repeat Proteine
AKR2A und AKR2B in *Arabidopsis thaliana***

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

vorgelegt von
Caroline Sophia Carsjens, geb. Mayer
aus Essen

Göttingen 2010

D7

Referent:

Prof. Dr. Wolfgang Dröge-Laser

Korreferent:

Prof. Dr. Christiane Gatz

Tag der mündlichen Prüfung:

28.04.2010

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung	2
2.1	Der bZIP-Transkriptionsfaktor NtBZI-1 aus Tabak	2
2.2	Das Protein NtANK1 aus Tabak, ein Interaktionspartner von NtBZI-1	3
2.3	Die homologen Proteine zu NtBZI-1 aus Tabak sind die bZIP- Transkriptionsfaktoren der Gruppe C in <i>Arabidopsis thaliana</i>	6
2.4	Die Arabidopsis Proteine AKR2A und AKR2B sind homolog zu NtANK1 aus Tabak	9
2.5	Zielsetzung der Arbeit	14
3	Material	15
3.1	Pflanzen	15
3.2	Hefestämme (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	15
3.3	Bakterien.....	15
3.4	<i>Botrytis cinerea</i>	16
3.5	Nukleinsäuren	16
3.5.1	Plasmide	16
3.5.2	Primer	20
3.5.3	Hybridisierungssonden.....	22
3.6	Antikörper.....	22
3.7	Nährmedien und Zusätze	23
3.7.1	Hefemedien.....	23
3.7.2	Pflanzenmedien	23
3.7.3	Bakterienmedien	23
3.7.4	Pilzmedium.....	24
3.7.5	Agar	24
3.7.6	Aminosäuren.....	24
3.7.7	Antibiotika.....	25
3.7.8	Medienzusätze	25
3.8	Lösungen und Puffer	25
3.9	Geräte	30
3.10	Verbrauchsmittel	31
3.11	Chemikalien	31

3.12	Enzyme	33
3.13	Kits	33
3.14	Größenstandards	34
3.14.1	DNA-Größenstandard	34
3.14.2	Protein- Größenstandard	34
4	Methoden	35
4.1	Pflanzenanzucht und Transformation.....	35
4.1.1	Pflanzenanzucht.....	35
4.1.2	Floral Dip Transformation.....	35
4.1.3	Selektion auf Basta®-Resistenz.....	36
4.2	Anzucht und Lagerung von Bakterien und Hefen.....	36
4.2.1	Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	36
4.2.2	Anzucht von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	36
4.2.3	Anzucht von <i>Pseudomonas syringae</i>	36
4.2.4	Anzucht von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
4.2.5	Lagerung der Bakterien.....	36
4.2.6	Lagerung der Hefen	37
4.3	Methoden zur Präparation von Nukleinsäuren	37
4.3.1	Isolierung von RNA	37
4.3.2	Isolierung von genomischer DNA.....	37
4.3.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	38
4.3.4	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration.....	38
4.4	DNA-Amplifikation durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	38
4.4.1	Synthese von cDNA	38
4.4.2	Ableitung von Oligonukleotid-Primern	39
4.4.3	PCR	39
4.4.4	Quantitative realtime PCR.....	40
4.5	Klonierungsmethoden	40
4.5.1	TAE-Agarose-Gelelektrophorese	40
4.5.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	40
4.5.3	Ligation	41
4.5.3.1	PCR-Produkte in pSK-T.....	41
4.5.3.2	Gateway-Rekombination.....	41
4.5.4	Transformation von <i>E. coli</i>	43
4.5.4.1	Präparation kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	43

4.5.4.2	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	43
4.5.5	Einfügen von Punktmutationen	43
4.5.6	Kolonie-PCR	43
4.5.7	Restriktionsverdau	44
4.5.8	DNA-Sequenzierung	44
4.6	Transformation von Agrobakterien und Hefe.....	45
4.6.1	Herstellung kompetenter Agrobakterien.....	45
4.6.2	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	45
4.6.3	Herstellung kompetenter Hefezellen	45
4.6.4	Transformation der kompetenten Hefezellen	45
4.7	Transiente Expression.....	46
4.7.1	Transiente Expression in <i>Arabidopsis</i> Mesophyll-Protoplasten.....	46
4.7.1.1	Protoplastengewinnung	46
4.7.1.2	Protoplasten- PEG- Transformation.....	46
4.7.1.3	Messung der β -Glucuronidase (GUS)-Aktivität.....	46
4.7.1.4	Messung der Neuraminidase (NAN)-Aktivität	47
4.7.2	Transiente Expression in <i>Nicotiana benthamiana</i>	47
4.8	Detektion fluoreszenzmarkierter Proteine	48
4.9	Infektion mit <i>Pseudomonas syringae</i>	48
4.9.1	Dipping.....	49
4.9.2	Infiltration.....	49
4.9.3	Lumineszenz-Imaging	49
4.10	Infektion mit <i>Botrytis cinerea</i>	49
4.10.1	Anzucht	49
4.10.2	Sammeln der Sporen	50
4.10.3	Infektion	50
4.11	Northernblot / Kapillarblot.....	50
4.11.1	Denaturierende Agarosegelelektrophorese von RNA-Molekülen	50
4.11.2	Kapillarblot	50
4.11.3	Herstellen einer radioaktiv markierten DNA-Sonde.....	51
4.11.4	Hybridisierung der Northern Blot Membran.....	51
4.11.5	Rehybridisierung	51
4.12	Transkriptomanalyse mit „ARIZONA whole genome arrays“.....	52
4.12.1	Amplifikation der eingesetzten RNA.....	52
4.12.2	Indirekte Markierung der aRNA.....	52
4.12.3	Hybridisierung der „ARIZONA whole genome arrays“.....	53

4.13	Proteinbestimmung und Proteinfällung	53
4.13.1	Proteinbestimmung nach Bradford	53
4.13.2	Proteinfällung nach Wessel und Flügge	54
4.13.3	Proteinfällung mit Aceton	54
4.14	Western-Blot Analyse	54
4.14.1	Herstellung denaturierender Gesamtzellextrakte aus Pflanzen	54
4.14.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	55
4.14.3	Coomassie-Färbung	55
4.14.4	Proteintransfer auf PVDF-Membranen	55
4.14.5	Immunodetektion mit dem ECL+ System	56
4.15	Einbettung von Proben für Elektronenmikroskopie	56
4.16	Bestimmung des Chlorophyllgehalts	57
4.17	Stressbedingungen für <i>A. thaliana</i>	57
4.18	Analyse von T-DNA-Insertionsmutanten von <i>A. thaliana</i>	57
4.19	Verwendete Computerprogramme	58
5	Ergebnisse	59
5.1	Eine Interaktion von AKR2A und AKR2B mit Gruppe C bZIP- Transkriptionsfaktoren sollte überprüft werden	59
5.1.1	In zwei verschiedenen Two-Hybrid-Systemen wurde die Interaktion zwischen AKR2A/B und Gruppe C-bZIP-Faktoren getestet	59
5.1.2	Test auf Interaktion mit „bimolecular fluorescence complementation“ (BiFC)	61
5.1.3	Die Zugabe von AKR2A oder AKR2B im Protoplasten-System steigert bZIP-Heterodimer-induzierte Reporterogenaktivierung	64
5.2	Lokalisation von YFP-AKR2A/AKR2B	65
5.2.1	AKR2A und AKR2B sind im Cytoplasma lokalisiert	65
5.2.2	Nach pharmakologischer Inhibierung des Kernexports sind AKR2A und AKR2B auch im Kern lokalisiert	66
5.2.3	Mutation der putativen NES von AKR2A und AKR2B führt ebenfalls zur Kernlokalisierung	68
5.3	Erzeugung von transgenen Pflanzen zur funktionalen Analyse von AKR2A und AKR2B	69
5.3.1	Erzeugung von Pro _{35S} :AKR2A und Pro _{35S} :AKR2B Pflanzen	69
5.3.2	Identifizierung von <i>akr2b</i> Mutanten	70
5.3.3	Erzeugung von AKR2-RNAi Pflanzen	72
5.3.4	AKR2-RNAi Pflanzen unterscheiden sich phänotypisch vom Wildtyp .	73
5.4	Funktionale Analyse der AKR2-RNAi und Pro _{35S} :AKR2A Pflanzen und der <i>akr2b</i> Mutante	75

5.4.1	Microarray zur Analyse der AKR2-RNAi und Pro _{35S} :AKR2A Pflanzen	75
5.4.1.1	Ergebnisse der Transkriptomanalyse der AKR2-RNAi Pflanzen....	75
5.4.1.2	AKR2-RNAi Pflanzen zeigen eine beeinträchtigte Chloroplasten-Biogenese	79
5.4.1.3	Ergebnisse der Transkriptomanalyse der Pro _{35S} :AKR2A Pflanzen	81
5.4.2	AKR2-RNAi Pflanzen sind stressanfälliger als der Wildtyp	85
5.4.2.1	AKR2-RNAi Pflanzen sind anfälliger gegenüber oxidativem Stress als der Wildtyp	85
5.4.2.2	AKR2-RNAi Pflanzen sind susceptibler gegenüber <i>Pseudomonas syringae</i> als der Wildtyp.....	86
5.4.2.3	AKR2-RNAi Pflanzen sind anfälliger gegenüber einer Infektion mit <i>Botrytis cinerea</i> als der Wildtyp.....	88
6	Diskussion.....	91
6.1	Interaktionen zwischen einem Ankyrin-repeat Protein und einem bZIP-Transkriptionsfaktor unterscheiden sich in Tabak und Arabidopsis.....	91
6.2	Mehrere zelluläre Lokalisationen von AKR2A und AKR2B (Cytoplasma, Kern und Chloroplastenmembran) deuten auf multiple Funktionen hin	93
6.3	Die Überexpression von AKR2A führt zu keiner deutlichen phänotypischen Veränderung	98
6.4	AKR2-RNAi Pflanzen zeigen reduziertes Wachstum und eine beeinträchtigte Chloroplasten-Biogenese	98
6.5	Die erhöhte Stressanfälligkeit der AKR2-RNAi Pflanzen könnte ein sekundärer Effekt sein	102
6.6	Modell der potentiellen Funktionen von AKR2A und AKR2B	103
7	Literatur.....	105
8	Anhang.....	116
8.1	Daten	116
8.2	Abkürzungsverzeichnis	125
8.2.1	Abkürzungen.....	125
8.2.2	Einbuchstabenkürzel für Aminosäuren.....	129
8.2.3	Einheiten	130
8.2.4	Vorsätze zur Bezeichnung von dezimalen Vielfachen und Teilen von Einheiten	130

1 Zusammenfassung

In Tabak interagieren das Ankyrin-repeat Protein NtANK1 und der basische Leucin Zipper (bZIP)-Transkriptionsfaktor NtBZI-1. Diese Proteine sind in Auxin-vermittelter Genaktivierung und in Pathogenabwehr involviert.

Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion der homologen Ankyrin-repeat Proteine AKR2A und AKR2B aus *Arabidopsis thaliana* zu untersuchen. Dazu wurde die Interaktion zwischen AKR2A/B, und den homologen bZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppe C getestet. Mit verschiedenen Methoden, wie Hefe- und Protoplasten-two-hybrid und BiFC („bimolecular fluorescence complementation“) konnte eine Interaktion der Arabidopsis Proteine nicht bestätigt werden. Lokalisationsstudien von YFP-AKR2A/B-Fusionsproteinen bestätigten, dass die Proteine im Cytoplasma lokalisiert sind. Sie besitzen eine funktionsfähige NES („nuclear export signal“) und akkumulieren nach Inhibierung des Kernexports im Kern. Eine Veröffentlichung beschreibt auch eine Lokalisation an der äußeren Chloroplastenmembran. Diese multiplen Lokalisationen (Cytoplasma, Chloroplastenmembran, Kern) deuten auf mehrere Funktionen von AKR2A und AKR2B hin.

Zur Funktionsaufklärung wurden AKR2-RNAi („RNA interference“) Pflanzen erzeugt, die sich phänotypisch vom Wildtyp unterscheiden: sie zeigen ein verringertes Wachstum und einen reduzierten Chlorophyllgehalt, abhängig von der Ausprägung des RNAi-Effektes. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen ist zu erkennen, dass sich die Blattchloroplasten der AKR2-RNAi Pflanzen von denen des Wildtyps morphologisch unterscheiden und in ihrer Entwicklung beeinträchtigt sind.

Eine Transkriptomanalyse der AKR2-RNAi Pflanzen zeigte, dass Gene des Endomembransystems herunterreguliert sind und viele Stress-induzierte Gene hochreguliert sind. Deshalb wurden die Pflanzen verschiedenen Stressbedingungen unterzogen und übereinstimmend stellte sich heraus, dass sie anfälliger gegenüber oxidativem Stress, Infektion mit dem biotrophen Bakterium *Pseudomonas syringae* und Infektion mit dem nekrotrophen Pilz *Botrytis cinerea* waren. Diese erhöhte Anfälligkeit kann als sekundärer Effekt aufgrund der beeinträchtigten Chloroplasten-Biogenese interpretiert werden, oder als spezifische Reaktion auf die reduzierte AKR2A/B-Proteinmenge.

Aufgrund dieser Daten werden multiple Funktionen für AKR2A und AKR2B diskutiert: Transport von Proteinen zu verschiedenen Endomembransystemen, eine Funktion im Signalaustausch zwischen Chloroplast und Kern, und eine Regulation der Transkriptionskontrolle im Kern.

2 Einleitung

Zelluläre Funktionen sind fast immer das Ergebnis der Zusammenarbeit von mehreren Proteinen, die in Proteinkomplexen, Signalwegen oder Netzwerken interagieren (Bader et al., 2008). Die Proteine haben Interaktionsdomänen, die solche Protein-Protein Interaktionen vermitteln (Pawson und Nash, 2003). Eine typische Interaktionsdomäne ist die Ankyrin-repeat Domäne, die in Prokaryoten, Eukaryoten und einigen Viren vorkommt (Sedgwick und Smerdon, 1999). Ein Beispiel für ein Ankyrin-repeat Protein ist NtANK1 aus Tabak, das mit dem Transkriptionsfaktor NtBZI-1 aus Tabak interagiert (Kuhlmann et al., 2003; Böttner et al., 2009). Diese Protein-Protein Interaktion spielt eine Rolle in der Auxin-vermittelten Transkriptionskontrolle in Tabak (Böttner et al., 2009).

2.1 Der *bZIP*-Transkriptionsfaktor *NtBZI-1* aus Tabak

Transkriptionsfaktoren regulieren den ersten Schritt der Genexpression. Sie haben eine DNA-Bindedomäne, die eine spezifische DNA-Sequenz im Promotor ihrer Zielgene erkennt, und können die Transkription dieser Zielgene aktivieren oder reprimieren (Mitsuda und Ohme-Takagi, 2009).

Transkriptionsfaktoren der basische Region/Leucin-Zipper- (*bZIP*) Familie besitzen eine basische Region, die an die DNA bindet und ein Leucin-Zipper Motiv, mit dem sie Dimere bilden (Jakoby et al., 2002; Abb. 1). Der Leucin-Zipper besteht aus Wiederholungen von Leucin, oder anderen hydrophoben Aminosäuren, im Abstand von 7 Aminosäuren (L-X₆-L „heptad repeat“). *bZIP*-Transkriptionsfaktoren kommen in allen bisher analysierten Eukaryonten vor (Jakoby et al., 2002).

In Tabak (*Nicotiana tabacum*) wurde der *bZIP*-Transkriptionsfaktor NtBZI-1 identifiziert. Er bindet *in vitro* an G-Box und C-Box cis-Elemente, ist im Nukleus lokalisiert und seine N-terminale Region fungiert sowohl in Hefe als auch in Pflanzenzellen als Aktivierungsdomäne (Heinekamp et al., 2002). Außerdem wurden Interaktionspartner von NtBZI-1 durch „Yeast-two-hybrid“ (Y2H)-Experimente gefunden, nämlich die *bZIP*-Transkriptionsfaktoren NtBZI-2, NtBZI-3 und NtBZI-4 (Strathmann et al., 2001). Die Interaktion findet zwischen den Zipperdomänen statt, so dass sich ein Dimer bildet, das an die DNA binden kann (Abb. 1). Pflanzen, die eine dominant-negative Form von NtBZI-1 (NtBZI-1ΔN) überexprimieren, haben

verkürzte Internodien, mehr Seitentriebe und eine reduzierte Antwort auf Auxin. NtBZI-1 bindet *in vivo* und *in vitro* an den Promotor des Auxin-induzierten *GH3*-Gens, und es wird NtBZI-1 eine Rolle bei der Regulation der Auxin-induzierten Transkription zugeordnet (Heinekamp et al., 2004). Eine Funktion bei der Pathogenabwehr wird für NtBZI-1 ebenfalls beschrieben, denn die NtBZI-1 Transkription wird bei der Antwort auf Pathogenbefall hochreguliert und NtBZI-1 Δ N Pflanzen sind susceptibler gegenüber Infektion mit dem Tabak-Mosaik-Virus (Kuhlmann et al., 2003).



Abbildung 1: Drei-dimensionale Struktur der GCN4-bZIP-Domäne, als Dimer an die DNA gebunden (Jakoby et al., 2002). Die Zipper-Motive interagieren miteinander, die Leucine sind in rot eingezeichnet, in blau sind die basischen Regionen gekennzeichnet, die an die DNA binden.

2.2 Das Protein NtANK1 aus Tabak, ein Interaktionspartner von NtBZI-1

Das Ankyrin-repeat Protein NtANK1 wurde als Interaktionspartner von NtBZI-1 in einem Y2H-Experiment identifiziert (Kuhlmann et al., 2003, Böttner et al., 2009). Die Ankyrin-repeat Domäne ist eine typische Proteindomäne, die aus Wiederholungen („repeats“) einer konservierten Sequenz von 33 Aminosäuren besteht, die α -Helices und β -Faltblätter bilden (Abb. 2; Sedgwick und Smerdon, 1999). Es hat sich dabei gezeigt, dass nur ca. 11 Aminosäuren stark konserviert sein müssen, um die Tertiärstruktur zu formen (Mosavi et al., 2002). Ankyrin-repeats vermitteln Protein-

Protein-Interaktionen; Proteine, in denen Ankyrin-repeats vorkommen, haben jedoch ganz unterschiedliche Aufgaben, z.B. im Zellzyklus, als mitochondriale Enzyme, oder bei der Signaltransduktion (Sedgwick und Smerdon, 1999; Bennett und Chen, 2001).

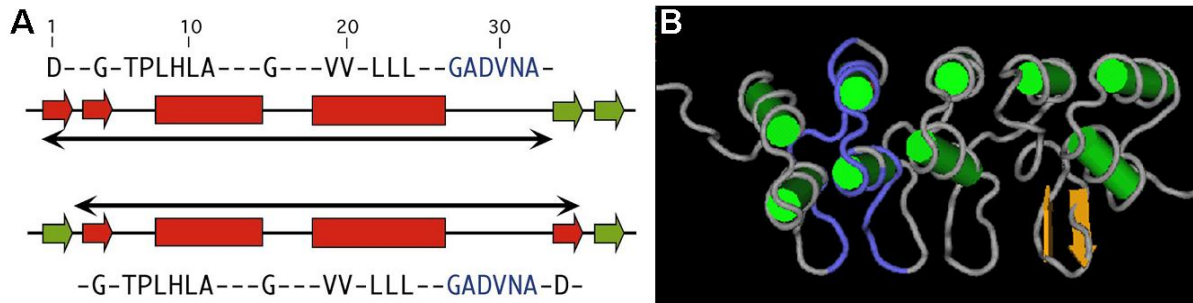


Abbildung 2: Aufbau und Struktur der Ankyrin-repeat Domäne A: Primärstruktur des Ankyrin-repeats, angegeben sind konservierte Aminosäuren, darunter in rot die entsprechende Sekundärstruktur: Pfeile für β -Faltblätter, Rechtecke für α -Helices; der schwarze Pfeil gibt die Länge eines einzelnen Ankyrin-repeats an (Tertiärstruktur: $\beta_2\alpha_2$). Darunter ist eine alternative Definition der N- und C-terminalen Begrenzung eines Ankyrin-repeats angegeben: $\beta_2\alpha_2\beta$. B: Tertiärstruktur einer Ankyrin-repeat Domäne bestehend aus 4 Ankyrin-repeats mit α -Helices in grün und β -Faltblättern als orangefarbener Pfeil, ein einzelnes Ankyrin-repeat ist markiert in blau ($\beta_2\alpha_2$) (Sedgwick und Smerdon, 1999).

Das Ankyrin-repeat Protein NtANK1 aus Tabak hat 4 Ankyrin-repeats am C-Terminus (Abb. 2). Im Protoplast-two-hybrid (P2H) System konnte bestätigt werden, dass Mutationen in diesen Ankyrin-repeats die Interaktion mit NtBZI-1 zerstören (Böttner et al., 2009). N-terminal kommen in NtANK1 die Aminosäuren Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S) und Threonin (T) gehäuft vor. Eine solche Peptidsequenz wird nach dem Ein-Buchstabencode dieser Aminosäuren als PEST-Domäne bezeichnet und es wird ihr eine Rolle im proteolytischen Abbau zugeordnet, die jedoch nicht weiter charakterisiert ist (Rechsteiner und Robers, 1996). Für NtANK1 konnte jedoch kein Abbau nachgewiesen werden, unter den getesteten Bedingungen waren blieb die NtANK1-Proteinmenge gleich (Böttner et al., 2009).

Proteine aus *N. tabacum* (TIP1-3, „TGB12K-interacting proteins“) und *N. plumbaginifolia* (GBP1+2, „Glucanohydrolase Binding Proteins“), die homolog zu NtANK1 sind, konnten als Interaktionspartner von β -Glucanasen identifiziert werden (Fridborg et al., 2003; Wirdnam et al., 2004). Für β -Glucanasen wird eine Funktion in der Pathogenabwehr beschrieben (Bucher et al., 2001).

NtANK1 aus Tabak bindet nicht an DNA und ist im Cytoplasma lokalisiert (Kuhlmann et al., 2003). Allerdings kann NtANK1 im Kern akkumulieren, wenn es als NLS-Fusionsprotein („nuclear localisation sequence“) exprimiert wird, wenn durch Zugabe von Leptomycin B (LMB; Haasen et al., 1999) der Kernexport inhibiert wird, bei

Koexpression von NtBZI-1 oder bei Zugabe von Auxin (Böttner et al., 2009). Die Interaktion zwischen NtBZI-1 und NtANK1 konnte neben den Hefestudien auch indirekt *in vitro* und *in planta* nachgewiesen werden (mit „electrophoretic mobility shift assay“ (EMSA), P2H und „bimolecular fluorescence complementation“ (BiFC); Kuhlmann et al., 2003, Böttner et al., 2009). NtANK1 interagiert nur spezifisch mit NtBZI-1 und nicht mit NtBZI-2 oder anderen getesteten bZIP-Transkriptionsfaktoren. Im Protoplasten-System konnte gezeigt werden, dass NtANK1 in Anwesenheit von Auxin eine vom NtBZI-1/NtBZI-2-Heterodimer induzierte Genaktivierung erhöhen kann. Durch eine Kernlokalisierung von NtANK1 als NLS-Fusionsprotein, wird die Genaktivierung nochmals verstärkt (Böttner et al., 2009). Außerdem führt eine Reduktion von funktionalem NtANK1-Protein in Pflanzen durch RNAi-Effekt zu einer reduzierten Auxin-Antwort. Dies gilt in vergleichbarer Weise auch für NtBZI-1-RNAi Pflanzen und NtBZI-2-RNAi Pflanzen, so dass für diese drei Proteine eine ähnliche Funktion postuliert wird. Ein Modell für das Zusammenspiel der drei Proteine wird in Böttner et al. (2009) beschrieben (Abb. 3). NtANK1 akkumuliert in Anwesenheit von Auxin im Kern, dabei könnte Auxin (a) den Kerntransport von NtANK1 oder (b) den Kerntransport des NtANK1/NtBZI-1-Heterodimers ermöglichen, oder (c) den Kernexport von NtANK1 inhibieren. Im Kern bilden sich NtANK1/NtBZI-1-Heterodimere (d) und NtBZI-1/NtBZI-2-Heterodimere steigern Auxin-vermittelte Transkription, die durch NtANK1 als Interaktionspartner von NtBZI-1 noch verstärkt werden kann (e) (Abb. 3).

Die bisher bekannte Auxin-Antwort benötigt zwei Arten von Transkriptionsfaktoren: ARF-Transkriptionsfaktoren („auxin response factor“) binden an AuxREs („auxin response elements“) in Promotoren von Auxin-responsiven Genen, und rekrutieren eine zweite Familie von Transkriptionsfaktoren, die Aux/IAA Repressoren, die nur in Anwesenheit von Auxin abgebaut werden, wodurch dann die Expression der Auxin-responsiven Gene stattfinden kann (Guilfoyle und Hagen, 2007). Es ist anzunehmen, dass der NtANK1/NtBZI-1/NtBZI-2 Komplex eine Feinregulierung dieser ARF-vermittelten Transkription übernimmt. Daraus lässt sich folgern, dass NtANK1 eine regulatorische Komponente der Auxin-vermittelten Transkriptionskontrolle ist (Böttner et al., 2009).

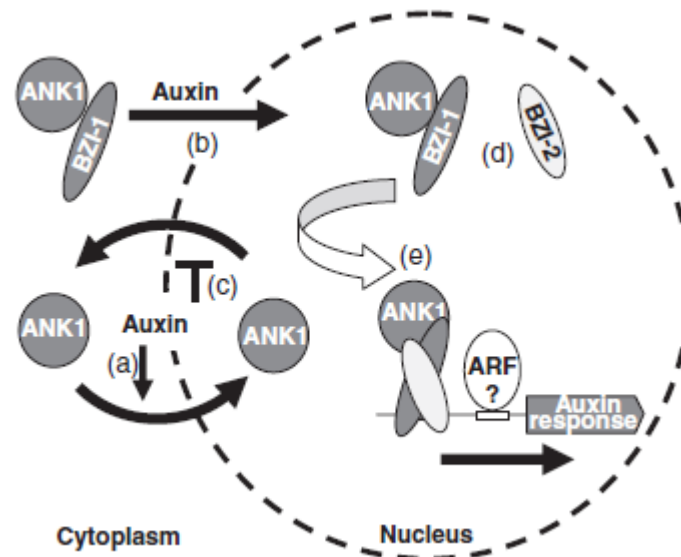


Abbildung 3: Modell für die Auswirkung von NtANK1 auf die Auxin-vermittelte Transkription. Nach Zugabe von Auxin wird NtANK1 in den Kern transportiert. Dafür kommen verschiedene Mechanismen infrage: Auxin kann z.B. den direkten Transport von NtANK1 in den Kern stimulieren (a), oder den indirekten Transport nach Interaktion mit NtBZI-1 (b). Auxin könnte auch den Kernexport reprimieren, ähnlich wie Leptomycin B (c). Im Kern interagiert NtANK1 mit NtBZI-1, jedoch nicht mit NtBZI-2 (d). NtBZI-1/NtBZI-2-Heterodimere stimulieren Auxin-vermittelte Transkription, die durch NtANK1 noch verstärkt werden kann, vermutlich durch Interaktion mit NtBZI-1 (e). Ob ein stabiler Proteinkomplex aus den drei Proteinen gebildet wird, oder ob es sich um eine transiente Proteininteraktion handelt, ist noch nicht klar. Da NtBZI-1/NtBZI-2-Heterodimere Auxin-vermittelte Transkription beeinflussen, sind sie wahrscheinlich abhängig von den „auxin response factors“ (ARFs) (Böttner et al., 2009).

2.3 Die homologen Proteine zu NtBZI-1 aus Tabak sind die bZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppe C in *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana ist wie Tabak eine Modellpflanze, die bei der Arbeit im Labor einige Vorteile bietet. Sie ist einfach zu transformieren, und zwar indem die fast geöffneten Blüten in eine Suspension mit transformierten *Agrobacterium tumefaciens* getaucht werden (Clough und Bent, 1998). Durch die kurze Generationszeit von 6-8 Wochen können die homozygoten, transformierten Nachkommen bald verwendet werden. Da das gesamte Genom von *A. thaliana* im Jahre 2000 sequenziert wurde, stehen einige molekulare Werkzeuge zur Verfügung, wie z.B. einfache Amplifikation und Sequenzierung von Genen; T-DNA-Insertionsmutanten, die durch Transformation mit einem Derivat des zu untersuchenden Gens (z.B. die nicht-interagierende Version von NtANK1) komplementiert werden können, so dass das Fehlen einer bestimmten Eigenschaft (z.B. die fehlende Interaktion von NtANK1 und NtBZI-1) in der Pflanze funktionell charakterisiert werden kann (Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

Mittlerweile sind 27.029 Gene, die für Proteine kodieren, vorhergesagt (Swarbreck et al., 2008). Davon werden 2.451 Gene als für Transkriptionsfaktoren kodierend postuliert (Pérez-Rodríguez et al., 2010). Sie werden aufgrund ihrer Struktur in verschiedene Familien eingeteilt.

In Arabidopsis sind 75 bZIP-Transkriptionsfaktoren bekannt, die in 10 Gruppen eingeteilt werden können (Jakoby et al., 2002). Die bZIP-Faktoren, die die höchste Homologie zu NtBZI-1 aus Tabak zeigen, gehören zur Gruppe C: bZIP9, bZIP10, bZIP25 und bZIP63 (Abb. 4). Die Proteine haben Homologie zu dem bZIP-Transkriptionsfaktor OPAQUE2 (O2) aus Mais und sind dadurch charakterisiert, dass der Leucin-Zipper verlängert ist und bis zu neun Leucine (L-X₆) enthält (Jakoby et al., 2002). O2 ist der erste beschriebene bZIP-Faktor in Pflanzen, dessen Expression nur im Endosperm zwischen Tag 10 und Tag 45 nach der Befruchtung stattfindet (Hartings et al., 1989). Das O2-Protein bindet als Homodimer an die DNA der Promotoren seiner Zielgene, um so deren Transkription zu aktivieren (Muth et al., 1996). Zu den Zielgenen gehört die Zein-Proteinfamilie, die im Mais-Endosperm die Haupt-Speicherproteine darstellen (Pirrona et al., 2005; Locatelli et al., 2009).

Auch bZIP10 und bZIP25 aus Arabidopsis wurde eine Funktion in der Regulation der Samenspeicherproteine zugeordnet (Lara et al., 2003). In Ehlert et al. (2006) wurde gezeigt, dass bZIP-Faktoren der Gruppe C spezifisch mit bZIP-Faktoren der Gruppe S1 Heterodimere bilden („C/S1 Netzwerk“). Zur Gruppe S1 gehören bZIP1, bZIP2, bZIP11, bZIP44 und bZIP53 (Jakoby et al., 2002). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Heterodimere aus bZIP53 und bZIP10 oder bZIP53 und bZIP25 die Expression von Samenspeicherprotein-Genen verstärken (Alonso et al., 2009); und die Prolin-Dehydrogenase (ProDH) wurde als direktes Zielgen von bZIP53 identifiziert (Weltmeier et al., 2006).

Der Transkriptionsfaktor bZIP10 spielt eine Rolle bei der Antwort auf oxidativen Stress, insbesondere bei der Abwehr gegen das biotrophe Pathogen *Hyaloperonospora parasitica* (Kaminaka et al., 2006). Aus einer Verwandtschaftsanalyse der bZIP-Familie aus grünen Pflanzen ging hervor, dass sich die Gruppen C und S in Arabidopsis aus einem gemeinsamen Vorfahren („Proto-C“) entwickelt haben, der in oxidativem Stress und Energiemetabolismus involviert war (Correa et al., 2008). Alle Mitglieder der Gruppen C und S1 werden in „sink“-Gewebe exprimiert, wie z.B. junge Blätter, Antheren und Samen, was die Hypothese stützt, dass das C/S1 Netzwerk dabei mitwirkt, Nährstoffe und somit auch Energie zu den

„sink“-Gewebe zu verteilen (Rook et al., 1998a, 1998b). Die Translation der bZIP-Faktoren der Gruppe S1 wird durch Zucker reprimiert, dafür ist ein konserviertes Peptid verantwortlich, das von einem uORF („upstream open reading frame“) am 5'-Ende der mRNA kodiert wird (Wiese et al., 2004). Für bZIP11 konnten zwei Enzyme aus dem Aminosäurestoffwechsel, Asparaginsynthetase1 (ASN1) und ProDH, als Zielgene identifiziert werden, so dass ein Modell vorgeschlagen wurde, indem Zucker durch bZIP11 den Aminosäurestoffwechsel regulieren (Hanson et al., 2008). Stress und Stoffwechselsignale verändern also die Expression von bZIP-Faktoren der Gruppe S1, jedoch nicht die der Gruppe C (Weltmeier et al., 2009).

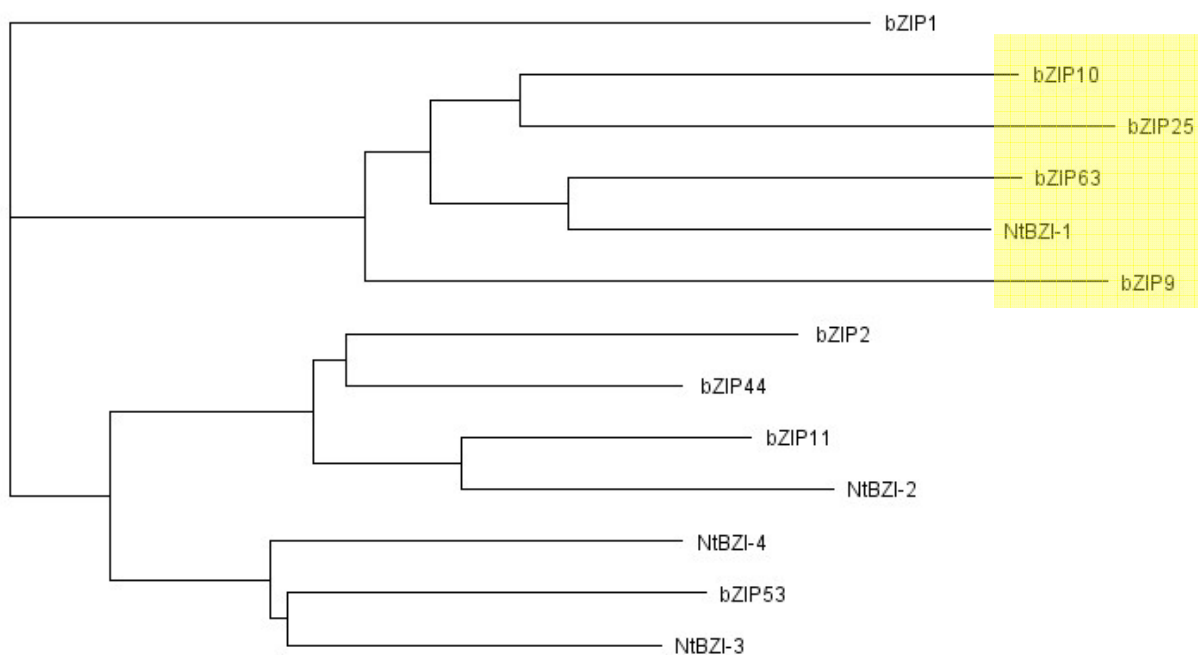


Abbildung 4: Verwandtschaft der Arabidopsis bZIP-Faktoren der Gruppen C und S1 mit NtBZI-1, -2, -3, -4 aus Tabak aufgetragen als phylogenetischer Baum, basierend auf der Gesamtsequenz der Proteine. NtBZI-1 zeigt die größte Homologie zu den Faktoren der Gruppe C aus Arabidopsis (gelb hinterlegt), während seine Interaktionspartner NtBZI-2, -3, -4 mehr Homologie zur Gruppe S1 aus Arabidopsis zeigen.

2.4 Die Arabidopsis Proteine AKR2A und AKR2B sind homolog zu NtANK1 aus Tabak

In Arabidopsis gibt es 105 Ankyrin-repeat Proteine, die aufgrund von konservierten Domänen in verschiedene Cluster eingeteilt wurden (Becerra et al., 2004). Einige dieser Proteine sind schon charakterisiert worden, darunter sind NPR1 (At1g64280) als Regulator von Salizylsäure (SA)-abhängiger Pathogenabwehr (Mou et al., 2003; Dong, 2004) und Atakp1 (At2g43850) ist eine Kinase (Chinchilla et al., 2003). Im Cluster B sind die Ankyrin-repeat Proteine aus Arabidopsis zusammengefasst, in denen außer den Ankyrin-repeats keine weitere konservierte Domäne vorhanden ist (Becerra et al., 2004). Darunter befinden sich 4 bekannte Proteine: EMB506 (At5g40160) und AKRP (At5g66055) sind Chloroplastenproteine, die miteinander interagieren und essentiell für die Embryonalentwicklung und Plastidendifferenzierung sind (Zhang et al., 1992; Albert et al., 1999; Garcion et al., 2006). AKR2A (At4g35450, AKR2, Yan et al., 2002; Bae et al., 2008) und AKR2B (At2g17390, AtPhos43, Peck et al., 2001) sind Proteine mit 80% Aminosäureidentität und es sind die beiden Proteine aus Arabidopsis, die die höchste Sequenzhomologie zu NtANK1 aus Tabak zeigen. Im phylogenetischen Baum mit Cluster B der Ankyrin-repeat Proteine (Becerra et al., 2004) und im „Alignment“ in Abb. 5 ist dies zu sehen. Bisher gibt es einige Hinweise auf die Funktion von AKR2A und AKR2B. AKR2A wurde zuerst isoliert aufgrund einer Interaktion mit einem 14-3-3-Protein (At5g10450, Yan et al., 2002). 14-3-3 Proteine spielen eine Rolle in der Regulation von verschiedenen zellulären Prozessen durch phosphorylierungsabhängige Protein-Protein-Interaktionen (Van Heusden, 2009; Oecking und Jaspert, 2009). Antisensepflanzen von AKR2A zeigen kleine nekrotische Flecken auf den Blättern und in diesen Blättern wurde ein erhöhter Gehalt an H₂O₂ nachgewiesen, wie es auch bei der HR („hypersensitive response“) nach Pathogeninfektion der Fall ist. Die Pflanzen zeigen eine erhöhte Resistenz gegen das Bakterium *Pseudomonas syringae*. Weil AKR2A außerdem mit der Ascorbat Peroxidase 3 (APX3), die H₂O₂ zersetzt, interagiert, wird eine Rolle im Antioxidationsmetabolismus vorgeschlagen, der sowohl bei Pathogenbefall als auch bei Stressantwort von Bedeutung ist (Yan et al., 2002).

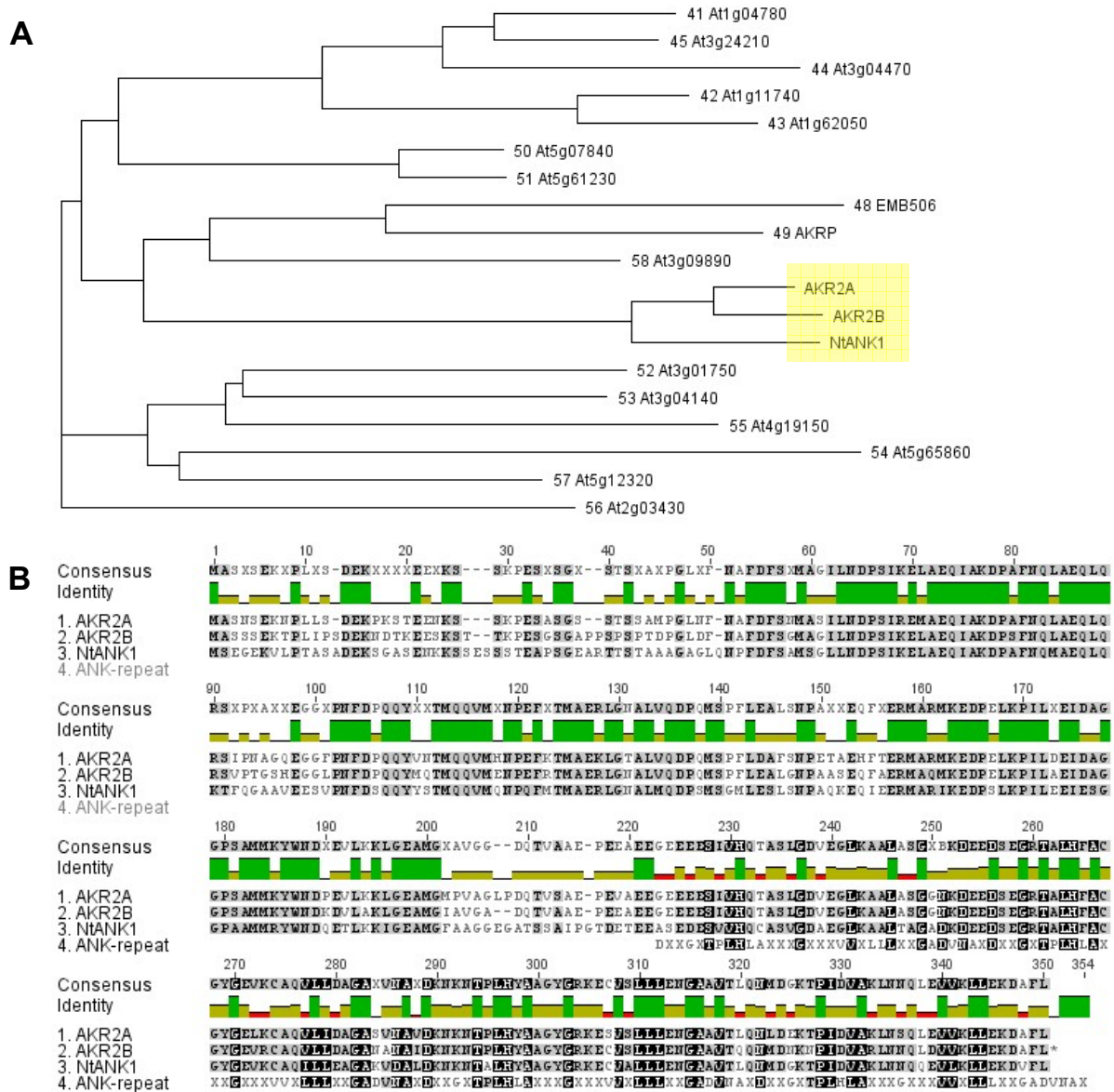


Abbildung 5: Homologievergleich von AKR2A, AKR2B und NtANK1. **A:** Phylogenetischer Baum mit Cluster B der Ankyrin-repeat Proteine aus Arabidopsis (Becerra et al., 2004) und NtANK1 aus Tabak, basierend auf der Gesamtsequenz der Proteine. Gelb hinterlegt sind die homologen Proteine AKR2A, AKR2B und NtANK1. **B:** Alignment von AKR2A und AKR2B aus Arabidopsis, NtANK1 aus Tabak und der konservierten Ankyrin-repeat Sequenz (ANK-repeat) nach Sedgwick und Smerdon (1999). Die drei Proteine haben 4 C-terminale Ankyrin-repeats, die jeweils 33 Aminosäuren umfassen (DXX...NAX), X steht für eine beliebige, nicht konservierte Aminosäure (s. auch Kuhlmann et al., 2003). Consensus: Konsensus-Sequenz, Identity: Die Höhe der Balken gibt den Grad der Aminosäuren-Identität an.

Mithilfe von Enzymen und nicht-enzymatischen Antioxidantien kann die Zelle reaktive Sauerstoffspezies (ROS) abbauen und sich gegen Schädigungen schützen. Superoxiddismutasen katalysieren die Reduktion von O_2^- zu H_2O_2 unter Bildung von O_2 (Bowler et al., 1994). H_2O_2 wird von der Ascorbat Peroxidase eliminiert, wobei das Antioxidans Ascorbat oxidiert wird, welches durch die Oxidation von Glutathion wieder regeneriert werden kann (Greene, 2002; Heldt, 1999). ROS können bei oxidativem Stress in der Pflanze entstehen, der durch verschiedene abiotische

Faktoren, wie Kälte und hohe Lichtintensitäten, ausgelöst wird (Mullineaux et al., 2000). Unter normalen Bedingungen, d.h. ohne Stress, sind Bildung und Beseitigung von Sauerstoff im Gleichgewicht, unter Stressbedingungen kann es vorkommen, dass die vermehrt gebildeten ROS nicht schnell genug abgebaut werden und die Zelle schädigen (Greene, 2002). Es können alle biologisch relevanten Makromoleküle geschädigt werden, insbesondere Nukleinsäuren (Hagar et al., 1996). Besonders anfällig für oxidativen Stress sind Chloroplasten und Peroxisomen, da in ihnen ROS gebildet werden.

AKR2B wurde in einem Proteomansatz identifiziert, weil es innerhalb weniger Minuten nach Zugabe von Flagellin oder Chitin (bakterieller bzw. pilzlicher Elicitor) zur Arabidopsis-Zellkultur phosphoryliert wird. Das Protein ist also Teil einer schnellen Antwort auf mikrobielle Pathogene, die allerdings noch nicht näher charakterisiert ist (Peck et al., 2001). Obwohl die funktionelle Bedeutung der Phosphorylierung von AKR2B noch nicht klar ist, implizieren diese Daten, dass sowohl AKR2A als auch AKR2B eine Rolle bei der Pathogenabwehr der Pflanze spielen.

Pathogene können eingeteilt werden in biotrophe, die sich von den Assimilaten einer lebenden Pflanzenzelle ernähren und auf das Überleben der Wirtspflanze angewiesen sind (z.B. das Bakterium *Pseudomonas syringae*) und nekrotrophe, die Pflanzenzellen töten, um sich in ihnen zu vermehren (z.B. dem Pilz *Botrytis cinerea*). *P. syringae* kann durch Wunden oder Stomata in die Blätter eintreten und vermehrt sich in suszeptiblen Pflanzen im Interzellularraum. Die infizierten Blätter zeigen nekrotische Läsionen und Chlorose (Katagiri et al., 2002). In resistenten Pflanzen löst *P. syringae* die HR („hypersensitive response“) aus, bei der u.a. reaktive Sauerstoffspezies akkumulieren, und die dazu führt, dass im Zuge der pflanzlichen Abwehrreaktion ein lokaler Zelltod an der Infektionsstelle eintritt (Dangl et al., 1996; Lam et al., 2001).

Bei Kontakt mit einem Pathogen wird die pflanzliche Abwehrreaktion eingeschaltet, um das Wachstum des Mikroorganismus zu begrenzen. Biotrophe Pathogene führen zur Akkumulation des Phytohormons SA (Salizylsäure) und lösen so den SA-abhängigen Signalweg aus (Katagiri et al., 2002).

Die Phytohormone JA (Jasmonsäure) und ET (Ethylen) werden bei Befall mit nekrotrophen Pathogenen benötigt. *B. cinerea* ist der Verursacher von Grauschimmel in vielen Pflanzenspezies. Nach dem Aufbrechen der Pflanzenzellen sterben diese

durch pilzliche Toxine ab, so dass der Pilz sich ausbreiten kann (Govrin und Levine, 2000; van Kan, 2006). Das eigentliche „Ziel“ eines nekrotrophen Pathogens ist jedoch nicht der Tod der Wirtspflanze *per se*, sondern die Zersetzung von pflanzlichem Biomaterial und dessen Umwandlung in eigene Biomasse (van Kan, 2006). In *Arabidopsis* wird nach Befall mit *B. cinerea* u.a. das Defensin *PDF1.2* exprimiert (Thomma et al., 2001). Defensine sind kleine Peptide, die direkte antimikrobielle Eigenschaften besitzen. Sie induzieren in Pilzzellen erhöhten K^+ -Efflux, Ca^{2+} -Aufnahme, Alkalinisierung des Mediums und Veränderungen im Membranpotential und verhindern so die weitere Ausbreitung in der Pflanze (Aerts et al., 2008). Unter anderem gehört auch die Akkumulation von Sekundärmetaboliten, wie das Phytoalexin Camalexin, zur pflanzlichen Abwehr gegen *B. cinerea* (Kliebenstein et al., 2005).

In einer Arbeit, die am Ende der experimentellen Phase dieser Arbeit veröffentlicht wurde, wird eine weitere Funktion für AKR2A und AKR2B beschrieben (Bae et al., 2008). Es wurde gezeigt, dass AKR2A/B an chloroplastidäre Membranproteine (OEP7 und OEP64, „outer envelope protein“) binden und auch selbst an die äußere Chloroplastenmembran binden können. In Anwesenheit von AKR2A kann eine Aggregation der OEPs im Cytosol verhindert werden und sie binden stattdessen an die Chloroplasten. Dies konnte sowohl in GFP-Studien als auch biochemisch gezeigt werden. Aus diesen Ergebnissen wurde ein Modell entwickelt, in dem AKR2A das Transporterprotein ist, das an ein neu synthetisiertes OEP im Cytoplasma bindet und es zur äußeren Chloroplastenmembran transportiert (Abb. 6; Bae et al., 2008; Bedard und Jarvis, 2008). An der Membran bindet AKR2A an einen unbekanntem Rezeptor, so dass das OEP in die Membran inseriert werden kann. Für diese Insertion wird das Kanalprotein Toc75 („translocon of the outer chloroplast membrane“) benötigt. Toc75 ist der Haupt-Membrankanale der äußeren Chloroplastenmembran, der in Assoziation mit Toc34 und Toc159 Stromaproteine ins Chloroplasteninnere transportiert. Dazu erkennt Toc159, an GTP gebunden, das Signalpeptid des Stromaproteins. GTP-Hydrolyse von Toc34 kann diese Signalerkennung und/oder den Transport von Signalpeptiden in Toc75 modulieren (Li und Chiu, 2010). Es wurde gezeigt, dass einige Membranproteine auch ohne Toc34 und Toc159, nur durch Toc75 in die äußere Chloroplastenmembran inseriert werden können (Li und Chiu, 2010). So wird es für den AKR2A-vermittelten Import in Abb. 6 vorgeschlagen.

Aus dem Modell geht hervor, dass AKR2A essentiell für eine intakte äußere Chloroplastenmembran ist. Diese These konnte durch Untersuchung von transgenen Pflanzen gestützt werden: Dexamethason induzierbare AKR2-RNAi Pflanzen im *akr2b*-Hintergrund zeigen bei Wachstum auf Dexamethason einen ausgeprägten Phänotyp: sie haben gelbe oder weiße Blätter und stark reduziertes Wachstum. Elektronenmikroskopische Bilder zeigen, dass die Chloroplasten-Biogenese stark beeinträchtigt ist: in den Chloroplasten befinden sich keine Thylakoidmembranen, stattdessen enthalten sie mehrere runde Vesikel-ähnliche Strukturen verschiedener Größe (Bae et al., 2008). Es wird nicht beschrieben, ob diese von einer Membran umgeben sind.

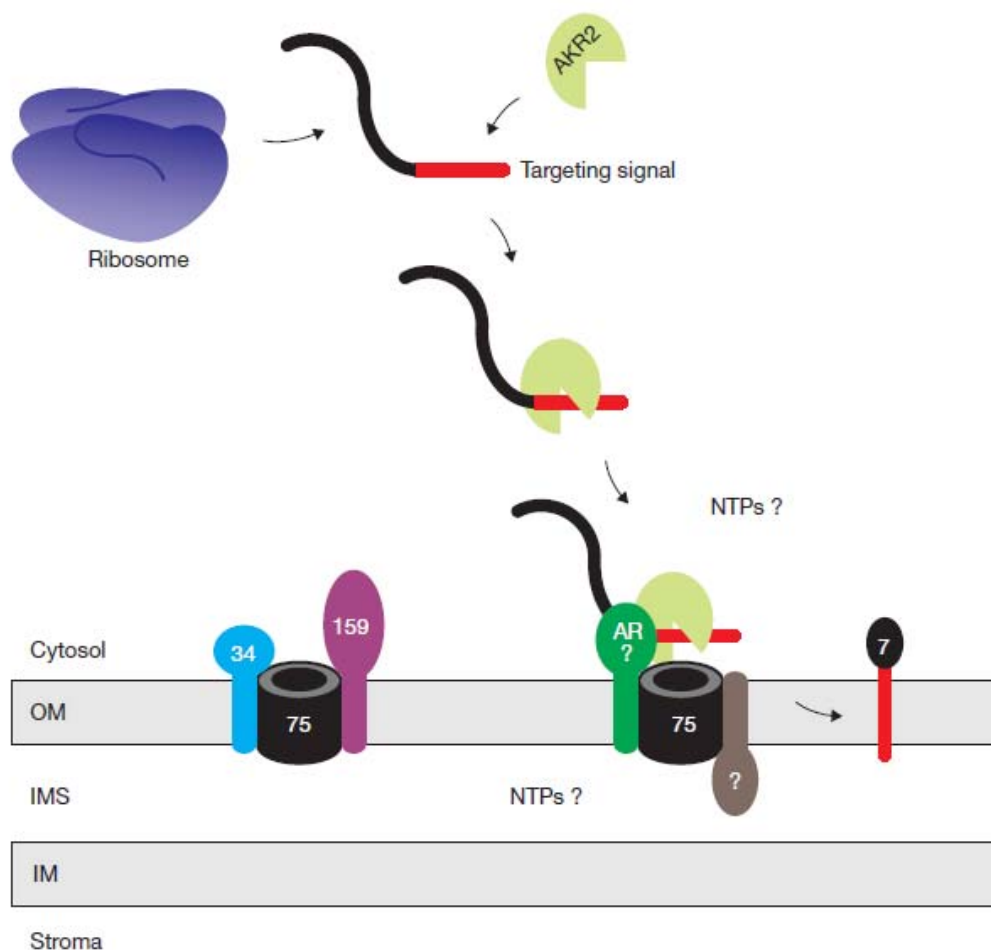


Abbildung 6: Der Transport von AtOEP7 zur äußeren Chloroplastenmembran mithilfe von AKR2. AKR2 bindet an das Sortierungssignal (rot) eines neu translatierten AtOEP7-Proteins im Cytosol und transportiert es zur Oberfläche des Chloroplasten. An der äußeren Chloroplastenmembran bindet AKR2 an einen unbekanntes AKR2-Rezeptor (AR?) oder direkt an Toc75 (schwarz) und erleichtert die Insertion von AtOEP7 in die Membran (Bae et al., 2008). Die Insertion von chloroplastidären Membranproteinen wird von dem Proteinimportkanal, Toc75, vermittelt, der in diesem Fall ohne die TOC-Rezeptoren Toc34 und Toc159 zu fungieren scheint (Tu et al., 2004; Hofmann et al., 2005). Energie in Form von Nucleotiden (NTPs) wird für eine effiziente Insertion benötigt, wann und wo sie umgesetzt wird, ist allerdings unklar (Hofmann et al., 2005). OM: äußere Chloroplastenmembran, IMS: Intermembranraum, IM: innere Chloroplastenmembran (Bedard und Jarvis, 2008).

2.5 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollen die Ankyrin-repeat Proteine AKR2A und AKR2B aus *Arabidopsis* funktionell charakterisiert werden. Vorarbeiten hierzu wurden an dem homologen Protein NtANK1 aus Tabak durchgeführt, weshalb zuerst eine Interaktion mit einem bZIP-Transkriptionsfaktor überprüft werden soll, wie sie in Tabak gefunden wurde. Dazu stehen zwei Two-Hybrid-Systeme zur Verfügung (Hefe und Protoplasten) und eine weitere *in planta* Methode soll etabliert werden (BiFC). Die zelluläre Lokalisation von AKR2A und AKR2B soll untersucht werden und ob sich diese, wie bei NtANK1 in Tabak, durch Verhinderung des Kernexports verändern lässt. Zur funktionellen Analyse sollen transgene Pflanzen hergestellt werden, sowohl mit einem erhöhten Gehalt an AKR2A und AKR2B, als auch mit reduziertem Gehalt der beiden Proteine. Dafür können T-DNA-Insertionsmutanten verwendet werden, und Pflanzen, die aufgrund von RNA-Interferenz (RNAi) einen reduzierten Proteingehalt haben. Neben der phänotypischen Analyse sollen die Pflanzen für ein Microarray-Experiment eingesetzt werden, bei dem das Transkriptom analysiert wird, was wiederum Hinweise auf eine Funktion von AKR2A und AKR2B geben kann. Da es in der Literatur Hinweise auf eine Rolle in der Pathogenabwehr gibt (Peck et al., 2001; Yan et al., 2002), sollen die transgenen Pflanzen verschiedenen Stressbedingungen unterzogen werden, um festzustellen, ob AKR2A und AKR2B eine Rolle bei der Reaktion auf diese Stressbedingungen spielen.

3 Material

Für alle Untersuchungen wurden sterilisierte Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße verwendet. Alle Lösungen wurden mit dd H₂O angesetzt und, wenn nicht anders beschrieben, entweder autoklaviert oder sterilfiltriert.

3.1 Pflanzen

Es wurden *Arabidopsis thaliana* L. Pflanzen (Ackerschmalwand) vom Ökotyp Columbia-O verwendet, der Wildtyp und verschiedene transgene Linien:

Tabelle 1: *A. thaliana* transgene Pflanzen, die in dieser Arbeit analysiert wurden

Transgene Pflanze	Eigenschaften	Referenz
SALK_039330	<i>akr2b</i> knock out	Alonso et al., 2003
AKR2-RNAi	AKR2A u. AKR2B runterreguliert	diese Arbeit
Prom _{35S} :AKR2A	AKR2A Überexpression mit HA-tag	diese Arbeit
Prom _{35S} :AKR2B	AKR2B Überexpression mit HA-tag	diese Arbeit
Prom _{35S} :bZIP10	bZIP10 Überexpression mit HA-tag	diese Arbeit

Für Agrobakterien-Infiltration wurden *Nicotiana benthamiana* L. Pflanzen verwendet.

3.2 Hefestämme (*Saccharomyces cerevisiae*)

Tabelle 2: Verwendeter Hefestamm

Stamm	Genotyp	Referenz	Verwendung
MaV203	MAT α , leu2-3,112, trp1-901, his3 Δ 200, ade2-101, gal4 Δ , gal80 Δ , SPAL10:: URA3, GAL1:: lacZ, HIS3UAS GAL1 ::HIS3@ LYS2, can1 ^r , cyh2 ^r	Vidal, 1997	Yeast-two-hybrid

3.3 Bakterien

Tabelle 3: Verwendete Bakterien-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz	Verwendung
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ⁻ (Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15) <i>recA1 end A1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> (r _k ⁻ m _k ⁺) <i>supE44 rel A1 deoR</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169	Woodcock et al., 1989	Klonierung von PCR-Produkten
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA 4404	pAL4404, Sm ^R	Hokema et al., 1983	Pflanzen-transformation
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101	pMP90RK Rif ^r , Gm ^r	Koncz und Schell, 1986	Pflanzen-transformation

<i>Escherichia coli</i> DB3.1	F- <i>gyrA462 endA1 D(sr1- recA) mcrB mrr hsdS20(rB-, mB-) supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Smr) xyl-5 λ- leu mtl-1.</i>	Bernard <i>et al.</i> , 1993	Vermehrung von Gateway [®] -Vektoren
<i>Pseudomonas syringae pv. tomato</i>	Pst DC3000 pLAFR3, Rif ^r , Tet ^r		Pflanzen-Infektion
<i>Pseudomonas syringae pv. tomato</i>	Pst DC3000 avr Rpt2 pABL18, Rif ^r , Tet ^r		Pflanzen-Infektion
<i>Pseudomonas syringae pv. tomato</i>	Pst DC 3000 JI-Lux pJFLux1, Rif ^r , Kan ^r	Fan <i>et al.</i> , 2008	Pflanzen-Infektion

3.4 Botrytis cinerea

Tabelle 4: Verwendete *B. cinerea* Stämme

Stamm	Eigenschaften	Referenz
<i>B. cinerea</i> BH/1	Infiziert <i>A. thaliana</i> Col-0	Bereitgestellt von Brigitte Mauch-Mani, Universität Neuchatel
<i>B. cinerea</i> B1.26	Infiziert <i>A. thaliana</i> Col-0	Bereitgestellt von Andreas von Tiedemann, Universität Göttingen

3.5 Nukleinsäuren

3.5.1 Plasmide

Tabelle 5: Verwendete Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pDON223	pUC ori; Sm ^R ; attL1, CmR, ccdB, attL2	Invitrogen, 2001
pDON223-AKR2A	pUC ori, Sm ^r , attL1, AKR2A, attL2	diese Arbeit
pDON223-AKR2B	pUC ori, Sm ^r , attL1, AKR2B, attL2	diese Arbeit
pDON207-AtbZIP9	pUC ori, Kan ^r , attL1, AtbZIP9, attL2	Weltmeier, 2005
pDON207-AtbZIP9ΔN	pUC ori, Kan ^r , attL1, AtbZIP9ΔN, attL2	Weltmeier, 2005
pDON201-AtbZIP10	pUC ori, Kan ^r , attL1, AtbZIP10, attL2	Weltmeier, 2005
pDON201-AtbZIP10ΔN	pUC ori, Kan ^r , attL1, AtbZIP10ΔN, attL2; 80 AS am N-Terminus deletiert	diese Arbeit
pDON201-AtbZIP25	pUC ori, Kan ^r , attL1, AtbZIP25, attL2	Weltmeier, 2005
pDON201-	pUC ori, Kan ^r , attL1, AtbZIP63, attL2	Weltmeier, 2005

AtbZIP63		
pDEST22	GAL4(768-881)AD, TRP1, ARS4/CEN6, pUC ori, Amp ^r , attR1, Cmr, ccdB, attR2	Invitrogen, 2001
pDEST32	GAL4(1-147)DB, LEU1, ARS4/CEN6, pUC ori, CYH2S, Gm ^r , attR1, Cmr, ccdB, attR2	Invitrogen, 2001
pDEST22-AKR2A	GAL4(768-881)AD, TRP1, ARS4/CEN6, pUC ori, Amp ^r , attR1, AKR2A, attR2	diese Arbeit
pDEST22-AKR2B	GAL4(768-881)AD, TRP1, ARS4/CEN6, pUC ori, Amp ^r , attR1, AKR2B, attR2	diese Arbeit
pDEST32-AKR2A	GAL4(1-147)DB, LEU1, ARS4/CEN6, pUC ori, CYH2S, Gm ^r , attR1, AKR2A, attR2	Invitrogen, 2001
pDEST32-AKR2B	GAL4(1-147)DB, LEU1, ARS4/CEN6, pUC ori, CYH2S, Gm ^r , attR1, AKR2B, attR2	Invitrogen, 2001
pDEST22-bZIP9	GAL4(768-881)AD, TRP1, ARS4/CEN6, pUC ori, Amp ^r , attR1, bZIP9, attR2	
pDEST22-bZIP10	GAL4(768-881)AD, TRP1, ARS4/CEN6, pUC ori, Amp ^r , attR1, bZIP10, attR2	
pDEST22-bZIP25	GAL4(768-881)AD, TRP1, ARS4/CEN6, pUC ori, Amp ^r , attR1, bZIP25, attR2	
pDEST22-bZIP63	GAL4(768-881)AD, TRP1, ARS4/CEN6, pUC ori, Amp ^r , attR1, bZIP63, attR2	
pDEST32-bZIP9ΔN	GAL4(1-147)DB, LEU1, ARS4/CEN6, pUC ori, CYH2S, Gm ^r , attR1, bZIP9, attR2	Weltmeier, unveröffentlicht
pDEST32-bZIP10ΔN	GAL4(1-147)DB, LEU1, ARS4/CEN6, pUC ori, CYH2S, Gm ^r , attR1, bZIP9, attR2	diese Arbeit
pDEST32-bZIP25	GAL4(1-147)DB, LEU1, ARS4/CEN6, pUC ori, CYH2S, Gm ^r , attR1, bZIP9, attR2	Vicente-Carbajosa, 2002
pDEST32-bZIP63	GAL4(1-147)DB, LEU1, ARS4/CEN6, pUC ori, CYH2S, Gm ^r , attR1, bZIP9, attR2	Vicente-Carbajosa, unveröffentlicht
pDEST-GAD	GAL4(768-881)AD, LEU2, 2 μ ori, pUC ori, Amp ^r , attR1, Cmr, ccdB, attR2	Barry Causier, Leeds
pDEST-GBK-T7	GAL4(1-147)DB, TRP1, 2 μ ori, pUC ori, CYH2S, Kan ^r , attR1, Cmr, ccdB, attR2	Barry Causier, Leeds
pDEST-GAD-AKR2A	GAL4(768-881)AD, LEU2, 2 μ ori, pUC ori, Amp ^r , attR1, AKR2A, attR2	diese Arbeit
pDEST-GBK-AKR2A	GAL4(1-147)DB, TRP1, 2 μ ori, pUC ori, CYH2S, Kan ^r , attR1, AKR2A, attR2	diese Arbeit
pDEST-GAD-AKR2B	GAL4(768-881)AD, LEU2, 2 μ ori, pUC ori, Amp ^r , attR1, AKR2B, attR2	diese Arbeit
pDEST-GBK-AKR2B	GAL4(1-147)DB, TRP1, 2 μ ori, pUC ori, CYH2S, Kan ^r , attR1, AKR2B, attR2	diese Arbeit
pDEST-GAD-bZIP9	GAL4(768-881)AD, LEU2, 2 μ ori, pUC ori, Amp ^r , attR1, bZIP9, attR2	diese Arbeit
pDEST-GBK-bZIP9	GAL4(1-147)DB, TRP1, 2 μ ori, pUC ori, CYH2S, Kan ^r , attR1, bZIP9, attR2	diese Arbeit
pDEST-GAD-bZIP10	GAL4(768-881)AD, LEU2, 2 μ ori, pUC ori, Amp ^r , attR1, bZIP10, attR2	diese Arbeit
pDEST-GBK-bZIP10	GAL4(1-147)DB, TRP1, 2 μ ori, pUC ori, CYH2S, Kan ^r , attR1, bZIP10, attR2	diese Arbeit

pDEST-GAD-bZIP25	GAL4(768-881)AD, LEU2, 2 μ ori, pUC ori, Amp ^r , attR1, bZIP25, attR2	diese Arbeit
pDEST-GBK-bZIP25	GAL4(1-147)DB, TRP1, 2 μ ori, pUC ori, CYH2S, Kan ^r , attR1, bZIP25, attR2	diese Arbeit
pDEST-GAD-bZIP63	GAL4(768-881)AD, LEU2, 2 μ ori, pUC ori, Amp ^r , attR1, bZIP63, attR2	diese Arbeit
pDEST-GBK-bZIP63	GAL4(1-147)DB, TRP1, 2 μ ori, pUC ori, CYH2S, Kan ^r , attR1, bZIP63, attR2	diese Arbeit
pAlligator2	2S1:GFP, T-DNA Border Sequenzen, 2x35S-Promotor, 3x HA-tag (N-terminal), attR1, Cm ^r , ccdB, attR2	Bensmihen et al., 2004
pAlligator2-AKR2A	2S1:GFP, T-DNA Border Sequenzen, 2x35S-Promotor, 3x HA-tag (N-terminal), attR1, AKR2A, attR2	diese Arbeit
pAlligator2-AKR2B	2S1:GFP, T-DNA Border Sequenzen, 2x35S-Promotor, 3x HA-tag (N-terminal), attR1, AKR2B, attR2	diese Arbeit
pAlligator2-bZIP10	2S1:GFP, T-DNA Border Sequenzen, 2x35S-Promotor, 3x HA-tag (N-terminal), attR1, bZIP10, attR2	diese Arbeit
pSK-T	Klonier- und Sequenziervektor, lacZ, amp ^R	Kriete, unveröffentlicht
pFGC5941	pMas2' Promotor; BAR; p35S Promoter; ChsA intron; attR1, Cm ^R , ccdB, attR2; Km ^R ; pBR322 ori, GW-Eingangsvektor	http://ag.arizona.edu/chromatin/fgc5941.html
pFGC5941-AKR2A	pMas2' Promotor; BAR; p35S Promoter; ChsA intron; attR1, AKR2A, attR2; Km ^R ; pBR322 ori	diese Arbeit
pE-SPYCE	pE-Vektor mit GW-Kassette des pSPYCE-35S; 35S Promotor, HA-tag, CE-tag, attR1, Cm ^R , ccdB, attR2, RK2 ori, Amp ^R , GW-Expressionsvektor	Weltmeier et al., 2006
pE-SPYCE(-)	pE-SPYCE mit deletierter GW-Kassette, 35S Promotor, HA-tag, CE-tag, RK2 ori, Amp ^R	Böttner et al., 2009
pE-SPYNE	pE-Vektor mit GW-Kassette des pSPYNE-35S; 35S Promotor, HA-tag, NE-tag, attR1, Cm ^R , ccdB, attR2, RK2 ori, Amp ^R , GW-Expressionsvektor	Weltmeier et al., 2006
pE-SPYNE(-)	pE-SPYNE mit deletierter GW-Kassette, 35S Promotor, HA-tag, NE-tag, RK2 ori, Amp ^R	Böttner et al., 2009
pE-SPYCE-AKR2A	35S Promotor, HA-tag, CE-tag, attR1, AKR2A, attR2, RK2 ori, Amp ^R	diese Arbeit
pE-SPYNE-AKR2A	35S Promotor, HA-tag, NE-tag, attR1, AKR2A, attR2, RK2 ori, Amp ^R	diese Arbeit
pE-SPYCE-AKR2B	35S Promotor, HA-tag, CE-tag, attR1, AKR2B, attR2, RK2 ori, Amp ^R	diese Arbeit
pE-SPYNE-AKR2B	35S Promotor, HA-tag, NE-tag, attR1, AKR2B, attR2, RK2 ori, Amp ^R	diese Arbeit
pE-SPYCE-	35S Promotor, HA-tag, CE-tag, attR1,	Weltmeier et al.,

bZIP10	bZIP10, attR2, RK2 ori, Amp ^R	2006
pE-SPYNE-bZIP10	35S Promotor, HA-tag, NE-tag, attR1, bZIP10, attR2, RK2 ori, Amp ^R	Weltmeier et al., 2006
pE-SPYCE-bZIP53	35S Promotor, HA-tag, CE-tag, attR1, bZIP53, attR2, RK2 ori, Amp ^R	Weltmeier et al., 2006
pE-SPYNE-bZIP53	35S Promotor, HA-tag, NE-tag, attR1, bZIP53, attR2, RK2 ori, Amp ^R	Weltmeier et al., 2006
pENSG-YFP	p35SS Promotor, attR1, Cm ^R , ccdB, attR2, RK2 ori, Amp ^R , GW-Expressionsvektor	Consonni, C 2001
pENSG-YFP-AKR2A	p35SS Promotor, attR1, AKR2A, attR2, RK2 ori, Amp ^R	diese Arbeit
pENSG-YFP-AKR2B	p35SS Promotor, attR1, AKR2B, attR2, RK2 ori, Amp ^R	diese Arbeit
pENSG-YFP-bZIP10	p35SS Promotor, attR1, bZIP10, attR2, RK2 ori, Amp ^R	diese Arbeit
Gal4-UAS-GUS	alter Name: pBT10-GAL4; 4x GAL4-DNA-Bindestelle, pUC ori, 35S-Minimalpromotor, GUS-Reportergen, Amp ^R	Weisshaar B, 1999
pROK219-NAN	CaMV 35S-Promotor, pUC19-Derivat, Amp ^R	Kirby und Kavanagh, 2002
pHBT-ΔGFP	pHBTL-sGFP Derivat (Sheen, unveröffentlicht), Entfernung des <i>sGFP</i> Gens durch NcoI/NotI-Verdau, Klenow-‘fill-in’ und Religation, pUC ori, Amp ^R	Heinekamp, 2002
HBT-GUS-NCO	pUC18 Derivat, -389 bis -46 Region des CaMV 35S Promotors, -188bp aus dem 5'-Bereich des C4ppdkZn1-Gens (<i>Zea mays</i>) mit der TATA-Box und Teilen des 5'-UTRs, sGFP-s65T, Amp ^R	Thurow C, unveröffentlicht
pHBTL-BDGW	p35S-Promotor, GAL4(1-147)BD, attR1, Cm ^R , ccdB, attR2, pUC ori, Amp ^R , GW-Expressionsvektor	Ehlert et al., 2006
pHBTL-ADGW	p35S-Promotor, GAL4(768-881)AD, attR1, Cm ^R , ccdB, attR2, pUC ori, Amp ^R , GW-Expressionsvektor	Ehlert et al., 2006
pHBTL-HAGW	p35S-Promotor, 3xHA-tag, attR1, Cm ^R , ccdB, attR2, pUC ori; Amp ^R , GW-Expressionsvektor	Ehlert et al., 2006
pHBTL-BD-AKR2A	p35S-Promotor, GAL4(1-147)BD, attR1, AKR2A, attR2, pUC ori, Amp ^R	diese Arbeit
pHBTL-AD-AKR2A	p35S-Promotor, GAL4(768-881)AD, attR1, AKR2A, attR2, pUC ori, Amp ^R	diese Arbeit
pHBTL-HA-AKR2A	p35S-Promotor, 3xHA-tag, attR1, AKR2A, attR2, pUC ori; Amp ^R	diese Arbeit
pHBTL-BD-AKR2B	p35S-Promotor, GAL4(1-147)BD, attR1, AKR2B, attR2, pUC ori, Amp ^R	diese Arbeit
pHBTL-AD-AKR2B	p35S-Promotor, GAL4(768-881)AD, attR1, AKR2B, attR2, pUC ori, Amp ^R	diese Arbeit

pHBTL-HA-AKR2B	p35S-Promotor, 3xHA-tag, attR1, AKR2B, attR2, pUC ori; Amp ^R	diese Arbeit
pHBTL-BD-bZIP9	p35S-Promotor, GAL4(1-147)BD, attR1, bZIP9, attR2, pUC ori, Amp ^R	Ehlert et al., 2006
pHBTL-AD-bZIP9	p35S-Promotor, GAL4(768-881)AD, attR1, bZIP9, attR2, pUC ori, Amp ^R	Ehlert et al., 2006
pHBTL-HA-bZIP9	p35S-Promotor, 3xHA-tag, attR1, bZIP9, attR2, pUC ori; Amp ^R	Ehlert et al., 2006
pHBTL-BD-bZIP10	p35S-Promotor, GAL4(1-147)BD, attR1, bZIP10, attR2, pUC ori, Amp ^R	Ehlert et al., 2006
pHBTL-AD-bZIP10	p35S-Promotor, GAL4(768-881)AD, attR1, bZIP10, attR2, pUC ori, Amp ^R	Ehlert et al., 2006
pHBTL-HA-bZIP10	p35S-Promotor, 3xHA-tag, attR1, bZIP10, attR2, pUC ori; Amp ^R	Ehlert et al., 2006
pHBTL-BD-bZIP25	p35S-Promotor, GAL4(1-147)BD, attR1, bZIP25, attR2, pUC ori, Amp ^R	Ehlert et al., 2006
pHBTL-AD-bZIP25	p35S-Promotor, GAL4(768-881)AD, attR1, bZIP25, attR2, pUC ori, Amp ^R	Ehlert et al., 2006
pHBTL-HA-bZIP25	p35S-Promotor, 3xHA-tag, attR1, bZIP25, attR2, pUC ori; Amp ^R	Ehlert et al., 2006
pHBTL-BD-bZIP63	p35S-Promotor, GAL4(1-147)BD, attR1, bZIP63, attR2, pUC ori, Amp ^R	Ehlert et al., 2006
pHBTL-AD-bZIP63	p35S-Promotor, GAL4(768-881)AD, attR1, bZIP63, attR2, pUC ori, Amp ^R	Ehlert et al., 2006
pHBTL-HA-bZIP63	p35S-Promotor, 3xHA-tag, attR1, bZIP63, attR2, pUC ori; Amp ^R	Ehlert et al., 2006
pHBTL-BD-NtANK1	p35S-Promotor, GAL4(1-147)BD, attR1, bZIP63, attR2, pUC ori, Amp ^R	Böttner et al., 2009
pHBTL-AD-NtANK1	p35S-Promotor, GAL4(768-881)AD, attR1, bZIP63, attR2, pUC ori, Amp ^R	Böttner et al., 2009
pHBTL-BD-NtBZI-1	p35S-Promotor, GAL4(1-147)BD, attR1, bZIP63, attR2, pUC ori, Amp ^R	Böttner et al., 2009
pHBTL-AD-NtBZI-1	p35S-Promotor, GAL4(768-881)AD, attR1, bZIP63, attR2, pUC ori, Amp ^R	Böttner et al., 2009
pBc-Act3	pBluescript mit 1,4 kb-Stück des Bc-Actin3-Gens; Amp ^r	Benito et al., 1998
pGEM-PDF1.2	pGEM mit PDF1.2a inseriert; Amp ^r	
pSK-AtPR1	pSK mit PR1 inseriert; Amp ^r	Brenner, 2002

3.5.2 Primer

Tabelle 6: Verwendete Primer

Name	Sequenz (5'→3')
AKR2start	ATGGCTTCCAATTCGGAGA
AKR_NESmutfor	CCAACAGCCAGGCGGAGGTGGCGAAGGCGCTTGAGAAGG
AKR_NESmutrev	CCTTCTCAAGCGCCTTCGCCACCTCCGCCTGGCTGTTGG
atphos43	TGCCTAATTTTGTAAATTCGGGC
AtPhos43start	ATGGCTTCAAGCTCAGAGA
AtP_NESmutfor	GGCAAACAATCAGGCAGATGTGGCGAAAGCACTTGAGAAG

	GACG
AtP_NESmutrev	CGTCCTTCTCAAGTGCTTTCGCCACATCTGCCTGATTGTTGCC
bZIP10checkinsfor	CAACCAGTTCAATCCAGTC
bZIP10checkinsrev	GACGATCCACTAGTAACC
bZIP10deltaN	AATCCGGACATGAATTCGGTACCGGATCCAG
bZIP10iminsert	GGTTCTTTGATGACCCCA
bZIP10LP	TTGAGATGAGTTCTGGTGGTTA
bZIP10RP	GTCCACTTGATCTTCCGAGAA
bZIP10ppsense	CAGGTTAATGATCCAAAAGGTGAGCATTATCACCTCTTAAACA CAACTG
bZIP10ppantisense	CAGTTGTTTAAGAGGTGATGAATGCTCACCTTTTGGATCATT AACCTG
bZIP10Spelfor	GACTAGTTCTCCAGAACTCAACTTCAACCAGTTCAATCCAG TCCTCTTACTCAAGGTTCTTTGATGACCCCAGGAGAACTTG
bZIP10Spelrev	GACGATCCACTAGTAACCTGCTTCA
bZIP63.3rev	GTTTGTTTTTGGCAGGTGAAAATGGCT
bZIP63.3revGW	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAGCCATTTT CACCTGCCAAAAACAACA
bZIP63forGW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGAAAAAG TTTTCTCCGACGAAGAAATC
bZIP63revGW	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTACTGATCCC CAACGCTTCGAA
GUS rev	TCGCGATCCAGACTGAATGCCAC
GW_F_AKR2	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCTTCCA ATTCGGAGAAAAATC
GW_R_AKR2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAAAGGAAAG CATCCTTCTCAAGC
GW_F_AtPhos43	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCTTCAA GCTCAGAGAAAACACC
GW_R_AtPhos43	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAGAGGAAA GCGTCCTTCTCAAGTAG
HAtagfor	GCGGCCGCATCTTTTACCCA
LBa1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG
Oligo dT	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
p35S1	ATTGATGTGATATCTCCACTGAC
pAR1	GAGATCTATTCTAACGCTGGC
pAR2	AGCTGCCTTGGCATCTGGTGG
pAR3	TGCAATGCTGTCTTCCTTCAG
pAR4	GGCCATTGTCTTAAACTCAGGG
pAR5r	TGGTAAGCCAGCAACAGGCA
pBD2	TCATCGGAAGAGAGTAGTAAC
PDF1.2Prom_for_PstI	GTCTGCAGCTGATCTCTTATAATGTTCCG
PDF1.2Prom_rev	GTCCATGGTGAAGAAATAAGCCAAAGATC
pGADL1	CCACTACAATGGATGATGTATA
pGADL2	GTGCACGATGCACAGTTGAAGT
pHOS1	CTCATGAAGGAGGTCTACCTAAC
pHOS2	CACCAGACCGCTAGTCTTGGTG
pHOS3	GCAAAGCAGTCCTTCCTTCAG
pHOS4	AGCGTTACCAAGACGCTCAGCC

pHOS5	AGCTCCACCTTCACCTTCAC
pHOS6r	ATCTAGCTGATTGTTTAGCCTG
random nonamer	Mix aus Oligonukleotiden, aus dem alle möglichen Nonamer-Kombinationen hervorgehen.
rev	TTCACACAGGAAACAGCTATGACC
SeqL1pDONR	TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC
SeqL2pDONR	GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC
SPYCE-for	TAGCTCGAGGATGTACCCATACGATGTTCC
SPYCE-rev	TAGAAGCTTACCTTGTACAGCTCGTCCATGC
SPYNE-for	AGTCTCGAGGATGGAGCAAAGTTGATTTCTG
SPYNE-rev	TAGAAGCTTCCGGCCATGATATAGACGTTGTG
uni	ACGACGTTGTAACGACGGCCAG

Die Schmelztemperatur wird nach Bolton und McCarthy (1962) berechnet:

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

T_m = Schmelztemperatur, n = Anzahl der Basen.

3.5.3 Hybridisierungssonden

Tabelle 7: Verwendete Hybridisierungssonden

Name	Eigenschaften	Referenz
<i>AKR2A</i>	PCR-Produkt mit den Primern AKR2start und pAR4 auf pDONR223-AKR2	diese Arbeit
<i>AKR2B</i>	PCR-Produkt mit den Primern AtPhos43start und pHOS4 auf pDONR223-AKR2B	diese Arbeit
<i>Botrytis Actin3</i>	615 bp EcoRI+HindIII-Fragment aus pBc-Act3	Benito et al., 1998
<i>PDF1.2</i>	PCR-Produkt mit den Primern uni und rev auf pGEM-PDF1.2	
<i>PR-1</i>	~500 bp EcoRI-Fragment aus pSK-AtPR1	Brenner, 2002

3.6 Antikörper

Tabelle 8: Verwendete Antikörper

Bezeichnung	Spezifität	Eigenschaft	Verdünnung	Referenz
α -AKR2	<i>Arabidopsis</i> Protein AKR2A	polyklonal, aus Kaninchen (Blut 3 und 4)	1 : 20.000	Hong Zhang
α HA	HA-Epitoptag (AS:YPYDVPDYA)	polyklonal, aus Kaninchen	1 : 800	SANTA CRUZ
α -MYC	Myc-Epitoptag	monoklonal, aus Maus	1 : 1000	CellSignalling Techn.
anti rabbit Ig	Kaninchen-Immunoglobulin	polyklonal, aus Esel,	1 : 10.000	AMERSHAM

		Peroxidase gekoppelt		
anti-mouse IgG	Maus-Immunoglobulin	Aus Schaf, Peroxidase gekoppelt	1 : 5000	AMERSHAM

3.7 Nährmedien und Zusätze

3.7.1 Hefemedien

<u>SD- Medium</u> (Clontech, 1996)	6,7 g/l	Nitrogen base
	0,61 g/l	Complement Supplement
<u>YPD- Medium</u> (Clontech, 1996)	20 g/l	Difco Pepton
	10 g/l	Hefeextrakt
	20 g/l	Glucose
		mit Wasser auf 1l auffüllen

3.7.2 Pflanzenmedien

<u>MS- Medium</u> (Murashige und Skoog, 1962)	4,33 g/l	Murashige und Skoog Medium
	10 g/l	Saccharose
		pH 5,8 mit KOH einstellen
	7 g/l	Select Agar

3.7.3 Bakterienmedien

<u>dYT Medium</u>	16 g/l	Trypton
	10 g/l	Hefeextrakt
	5 g/l	NaCl
<u>KingsB-Medium</u>	12,3 g/l	Glycerin (87%)
	1,5 g/l	K ₂ HPO ₄ * 3 H ₂ O
	20 g/l	Protease Pepton 3
		pH 7,2 mit HCl
	5 ml/l	1M MgSO ₄ zum Flüssigmedium zufügen
<u>LB- Medium</u> (LURIA- BERTANI Broth; Sambrook et al., 1989)	10 g/l	Trypton
	5 g/l	Hefeextrakt
	5 g/l	NaCl
		pH 7,4
<u>SOC- Medium</u> (Sambrook et al., 1989)	20 g/l	Trypton
	5 g/l	Hefeextrakt
	10 ml	1M NaCl
	2,5 ml	1M KCl
		pH 7,0

			nach dem Autoklavieren steril hinzufügen:
	10	ml	1M MgCl ₂
	10	ml	1M MgSO ₄
	10	ml	2M Glucose
<u>YEB-Medium</u>	10	g/l	Fleischextrakt (Lab lemco powder)
	2	g/l	Hefeextrakt
	5	g/l	Pepton
	5	g/l	Saccharose
	0,5	g/l	MgSo ₄ pH 7 einstellen

Agrobakterium-Minimal-Medium (AMM) (Sambrook et al., 1989)

20 x T-Puffer	210	g/l	K ₂ HPO ₄
	90	g/l	KH ₂ PO ₄
20 x T-Salze	4	g/l	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
	0,2	g/l	CaCl ₂
	0,1	g/l	FeSO ₄
	0,04	g/l	MnCl ₂
	20	g/l	NH ₄ Cl
AMM	50	ml	20 x T-Puffer
	50	ml	20 x T-Salze
	5	g/l	Glucose

3.7.4 Pilzmedium

<u>PDB-Medium</u> (Sigma)	12	g/l	Potato dextrose broth
---------------------------	----	-----	-----------------------

3.7.5 Agar

Die Festmedien für Bakterien enthalten zusätzlich 14 g/l Kobe-Agar. Dieser wird nach dem Einstellen des pH- Wertes und vor dem Autoklavieren zugegeben.

3.7.6 Aminosäuren

Tabelle 9: Aminosäuren für Hefe-Medien

Aminosäuren	Stammlösung (40x)	Endkonzentration
Adenin	400 mg/l	10 mg/l
Histidin	800 mg/l	20 mg/l
Leucin	4000 mg/l	100 mg/l
Uracil	800 mg/l	20 mg/l
Tryptophan	2000 mg/l	50 mg/l

3.7.7 Antibiotika

Tabelle 10: Eingesetzte Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml H ₂ O	100 mg/l
Chloramphenicol	100 mg/ml H ₂ O	50 mg/l
Gentamycin	25 mg/ml H ₂ O	6,25 mg/l
Kanamycin	50 mg/ml H ₂ O	50 mg/l
Rifampicin	10 mg/ml Methanol	50 mg/l
Spectinomycin	100 mg/ml H ₂ O	100 mg/l

3.7.8 Medienzusätze

Tabelle 11: Medienzusätze

Zusatz	Stammlösung	Endkonzentration
IPTG (Isopropylthiogalactosid)	26 mg/ml DMF	50 µl pro Platte
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid)	20 mg/ml DMF	50 µl pro Platte
Paraquat (Dimethylbipyridiniumchlorid)	10 mM H ₂ O	0,75-2,5 µM

3.8 Lösungen und Puffer

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

<u>Ammoniumacetat-Lösung</u>	8	M	Ammoniumacetat
<u>AS-Medium</u> (100ml)	1	ml	1 M MgCl ₂
	1	ml	1 M MES-KOH pH5,6
	0,1	ml	150 mM Acetosyringone
<u>Church</u>	7	%	SDS
	250	mM	NaPhosphat-Puffer (pH 7,0)
	1	mM	EDTA
<u>CTAB-Lösung</u>	2	%	CTAB
	100	mM	Tris-HCl, pH 8,0
	20	mM	EDTA, pH 8,0
	1.4	M	NaCl
<u>Entfärbepad</u> (Coomassie)	10%	(v/v)	Essigsäure
<u>Enzymlösung</u>	1,25	%	Cellulase R-10
	0,3	%	Macerozyme R-10
	0,4	M	Mannitol
	20	mM	KCl
	20	mM	MES

	10	mM	CaCl ₂ steril filtrieren und bei 4°C lagern
<u>Ethidiumbromidbad</u>	0,5	µg/ml	Ethidiumbromid in H ₂ O
<u>Farbmix</u> (Proteinbestimmung)	750	ml	H ₂ O
	100	ml	85% (v/v) H ₃ PO ₄
	70	mg	Coomassie Brilliantblue G-250 in 50 ml absol. EtOH gelöst
<u>GUS-Extraktionspuffer mit β-Mercaptoethanol</u>	50	mM	Na-Phosphatpuffer
	10	mM	EDTA
	0,1%	(v/v)	Triton X100
	0,1%	(v/v)	Sarkosyl
	0,05%	(v/v)	β-Mercaptoethanol
<u>GUS-Stop-Puffer</u>	200	mM	Na ₂ CO ₃
<u>Fällungspuffer</u>	1,2	M	NaCl
	0,8	M	tri-Natrium-Citrat
<u>Färbelösung für Proteine auf Nitrocellulosemembranen</u>	0,02%	(w/v)	Ponceau S
	3%		Trichloressigsäure
<u>Färbelösung (Coomassie)</u>	0,006%	(w/v)	Coomassie Brilliant Blue G-250
	10%	(v/v)	Essigsäure
<u>Fixierlösung (Coomassie)</u>	25%	(v/v)	Isopropanol
	10%	(v/v)	Essigsäure
<u>Harnstoffextraktionspuffer</u>	4	M	Harnstoff
	16,6%	(v/v)	Glycerin
	5%	(v/v)	β-Mercaptoethanol
	5%	(w/v)	SDS
	0,5%	(w/v)	Bromphenolblau
<u>Heringssperma-DNA</u>	10	mg/ml	in TE durch Rühren (1h) lösen falls nötig: mit Ultraschall behandeln bei -20 °C lagern vor Verwendung 20 min bei 95°C
<u>Kontrastmittel</u>	0,2%		Uranylacetat in H ₂ O
<u>1x Laufpuffer (SDS-PAGE)</u>	25	mM	Tris
	190	mM	Glycin
	0,1%	(w/v)	SDS
<u>Ladepuffer für Agarosegele</u>	40	mM	Tris/Acetate, pH 8,3
	2	mM	EDTA

	50%	(v/v)	Glycerin (87%)
	0,4%	(w/v)	Orange G
<u>Lösung I für alkalische Lyse</u>	50	mM	Glucose
	10	mM	EDTA
	25	mM	Tris-HCl (pH 8,0)
	100	mg/l	Rnase
<u>Lösung II für alkalische Lyse</u>	0,2	M	NaOH
	2 %		SDS
<u>Lösung III für alkalische Lyse</u>	294	g	KAc
	50	ml	HCOOH
			mit H ₂ O auf 1 l auffüllen
	2,5	mg/ml	Lyticase
			pH 7,4, bei -20°C lagern
<u>Lösung A</u>	10	mM	Bicine
	1	M	Sorbitol
	3%	(v/v)	Ethylenglycol
			pH 8,35 mit KOH einstellen
<u>Lösung B</u>	200	mM	Bicine
	40%	(w/v)	Peg 1000
			pH 8,35 mit KOH einstellen
<u>Lösung C</u>	10	mM	Bicine
	150	mM	NaCl
			pH 8,35 mit KOH einstellen
<u>MEN-Puffer 10x</u>	200	mM	MOPS
	50	mM	Natriumacetat
	10	mM	EDTA
			pH 7,0 mit NaOH
<u>MMg</u>	0,4	M	Mannitol
	15	mM	MgCl ₂
	4	mM	MES
			steril filtrieren
<u>MUG-Gebrauchslösung</u>	4	mM	4-MUG (4-Methylumbeliferyl- β -D-Glucoronid) in GUS-Extraktionspuffer mit β -Mercaptoethanol
<u>oNPG-Lösung</u>	4	mg/ml	oNPG, gelöst in Z-Puffer
<u>P1-Puffer (Qiagen)</u>	50	mM	Tris-HCl (pH 8,0)
	10	mM	EDTA
	0,1	g/l	RNase A
<u>P2-Puffer (Qiagen)</u>	200	mM	NaOH
	1 %		SDS

<u>P3-Puffer (Qiagen)</u>	294 g		KAc
	50 ml		HCOOH
<u>PEG-Lösung (40%)</u>	4 g		PEG 4000
	3 ml		H ₂ O
	2,5 ml		0,8M Mannitol
	1 ml		1M CaCl ₂
			≤ 10ml PEG-Lösung steril filtrieren
<u>Primärfixativ</u>	1,5%		Paraformaldehyd
	0,25 %		Glutaraldehyd in Waschpuffer
<u>RNA-Probenpuffer (2,5 x)</u>	20 %		MEN
	8 %		Glycerin
	56,7 %		Formamid
	5 %		Formaldehyd
	0,001 %		Bromphenolblau
	0,1 %		Ethidiumbromid
	4 mM		EDTA pH 7,5
<u>Sammelgel (SDS-PAGE)</u>	5% (w/v)		Acrylamid/ BIS (19:1)
	125 mM		Tris/ HCL pH 6,8
	0,1% (w/v)		SDS
	0,1% (w/v)		APS
	0,2% (v/v)		TEMED
<u>Sekundärfixativ</u>	0,5%		Osmium in Waschpuffer
<u>Spurr</u>	ergibt ca. 160 ml Kunstharz, in 100ml Tropfflasche, später eingefroren.		
	45 g		ERL (4221) (3,4- Epoxycyclohexyl-methyl-3,4- epoxycyclohexylcarboxylate)
	27 g		DER 736
	117 g		NSA (Nonenylsuccinic anhydride)
	1,8 g		Dimethylaminoethanol
<u>SSC 20 x</u>	2 M		NaCl
	0,3 M		Natriumcitrat pH 7,0 mit HCl
<u>Stripp-Lösung</u>	0,1 %		SDS
<u>20 x TAE</u>	0,8 M		Tris-HCl
	0,2 M		NaAc
	20 mM		EDTA pH 7,8 mit Essigsäure einstellen
<u>TB-Puffer</u>	10 mM		PIPES-KOH, pH 6,7

	15	mM	CaCl ₂
	250	mM	KCl
	55	mM	MnCl ₂ (Filter sterilisiert)
<u>TBS</u>	50	mM	Tris
	150	mM	NaCl
	pH 7,6	mit	HCl
<u>TBS-T</u>			TBS
	0,1%	(v/v)	Tween20
<u>10 x TE-Puffer</u>	100	mM	Tris-HCl
	10	mM	EDTA
			pH 7,5
<u>15%iges Trenngel (SDS-PAGE)</u>	20%	(w/v)	Acrylamid/ BIS (19:1)
	0,4	M	Tris/ HCL pH 8,8
	0,1%	(w/v)	SDS
	0,1%	(w/v)	APS
	0,1%	(v/v)	TEMED
<u>Transferpuffer</u>	192	mM	Glycin
	25	mM	Tris
	20%	(v/v)	Methanol
	0,01%	(w/v)	SDS
<u>Trizolpuffer</u>	380	ml/l	Phenol mit 0,1 M Citrat-Puffer gesättigt
	0,8	M	Guanidiniumthiocyanat
	0,4	M	Ammoniumthiocyanat
	33,4	ml/l	Na-Acetat (3 M pH 5,2 mit Essigsäure)
	5	%	Glycerin
<u>Waschpuffer</u>	0,1 M		PIPES
	2mM		CaCl ₂ in bidest mit NaOH auf pH7
<u>W5</u>	154	mM	NaCl
	125	mM	CaCl ₂
	5	mM	KCl
	2	mM	MES
			steril filtrieren
<u>W1</u>	0,5	M	Mannitol
	4	mM	MES
	20	mM	KCl
			steril filtrieren
<u>Z-Puffer</u>	16.1	g/l	Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O
	5.50	g/l	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O
	0.75	g/l	KCl
	0.246	g/l	MgSO ₄ x 7H ₂ O

pH 7,0 mit NaOH einstellen

<u>Z-Puffer/β-Mercaptoethanol</u>	0,27 ml	β-Mercaptoethanol
	100 ml	Z-Puffer
<u>Z-Puffer + oNPG</u>	40 mg	oNPG
	10 ml	Z-Puffer

3.9 Geräte

Tabelle 12: Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	3870 ELV	Tuttnauer
Bioimager (Phosphoimager)	BAS-1000	Fuji
Elektroporationsgerät	Gene Pulser	Bio Rad
Eismaschine	AF-20	Scotman
Fluoreszenzmikroskop	BX60	Olympus
Fluorometer	Cytofluor™II	Perseptive
Gefriertruhe-80 °C	C54285	New Brunswick Scientific
Geldokumentationsanlage	RS1	Kaiser, Deutschland
Gelelektrophoresekammer		Werkstatt der Universität Göttingen
Heizblock	Boekel	Scientific
Heizrührer	RCT basic	IKA Labortechnik
Hybridisierungsschrank	Hy-St-1	Bachofer
Hybridisierungswasserbad	Belly Dancer	Sorvall
Inkubationsschrank		WTC Binder
Klimaschrank		Percival Scientific
Konfokales Mikroskop	TCS SP2 AOBS	Leica
Kühlschränke		Liebherr
Kühlzentrifuge	Sorvall RC 5B Plus	DuPont
Lumineszenz-Imaging System	C4742-98 gekühlte CCD-Kamera	Hamamatsu Photonics
Luminometer		BMG Labtech
Netzgeräte	E 323	Benedikt Heinemann
Netzgeräte	EC 105 EC	Apparatus Corporation
PCR-Gerät, MiniCycler™	PTC-150	MJ Research, USA
pH-Meter	HI 9321	Hanna Instruments
Photometer	Unikon 720 LC	Kontron
Polyacrylamid-Gelkammer		AGS
Real-time-PCR-Gerät	iCycler MyIQ	BioRad
RNA-/ DNA-Calculator	Nanovue	GE
Scanner		Epson
Schüttler	3005	GFL
Semi-Dry-Blot-Apparatur		Werkstatt der Universität Bielefeld
Sequenziergerät	ABI PRISM 310	Perkin-Elmer Corporation
Spektralphotometer für Mikrotiterplatten	MRX Dynex Plate Reader	Dynex

Sterilbank	Microflow	Nunc
Tischzentrifuge	5414	Eppendorf
Tischzentrifuge, gekühlt	5403	Eppendorf
Ultrazentrifuge	Centrikon T-1065	Kontron
UV-Transilluminator	FLX-20 M	Vilber Lourmat
Vortex	L46	Labinco BV, Niederlande
Waagen Feinwaage	SPO51, SAC62, 1207 MP2	Scaltec Sartorius
Wasseraufbereitungsanlage	Option 4, Maxima	ELGA
Wasserbäder	1086	GFL
Zentrifuge, Ausschwingrotor		Universal 16 A Hettich

3.10 Verbrauchsmittel

Tabelle 13: Verbrauchsmittel

Produkt	Hersteller
Alufolie	Roth
Elektroporationsküvetten	BioRad
Fließpapier	Whatman
Glasmaterialien: Flaschen, Pasteurpipetten, Erlenmeyerkolben usw.	Brand, Schott
Haushaltsfolie	Tip
Hybond™-N / -N+	Amersham
Immobilon-P, PVDF-Transfer Membranen	Millipore
Kunststoff-Einwegmaterial: Spitzen, Pipetten, Reaktionsgefäße, Röhrchen, Petrischalen usw.	Eppendorf, Brand, Greiner, Sarstedt
Microtiterplatten	Nunc, Roth
Objektträger, Deckgläschen	Roth
Parafilm N	American National Can™
Röntgenfilme	Kodak
Sephadex G50	Pharmacia

3.11 Chemikalien

Tabelle 14: Chemikalien

Produkt	Hersteller
Agar Bacteriological	GIBCO BRL Life technologies
Agarose	SeaKem LE Biozym
Aminosäuren	Sigma
Ampicillin	Sigma
BASTA	Hoechst
Bradfordreagenz	Roth
Bromphenolblau-Natriumsalz	Roth
BSA	Roth
Calciumcarbonat (CaCl ₂)	Roth
Chloroform	Merck
Complete Supplement Mixture (CSM)	Bio 101

Difco Pepton	Difco
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
[α - ³² P] dATP, 800 Ci/mmol	Hartmann Analytic
dNTPs	Fermentas
EDTA	AppliChem
Essigsäure	Roth
Ethanol absolut	Merck
Ethidiumbromidlösung 1 %	Roth
Formaldehyd	Roth
Formamid	Roth
Glucose	Roth
Glycerin (87 %)	Roth
Harnstoff	Roth
Heringssperma-DNA (HSP)	Boehringer
Hydroxyethyl-Cellulose medium vis. (HEC)	Fluka
IPTG	BioTech Trade
Kaliumacetat (KAc)	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Roth
Kanamycin	Duchefa
Leptomycin B (LMB)	LC Laboratories
Leupeptin	Sigma
Lithiumacetat	Sigma
Lyticase	Sigma
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	AppliChem
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO ₄ x H ₂ O)	AppliChem
Magermilchpulver	Glücksklee
Mannitol	Roth
4-Methylumbelliferyl (4-MU)	Sigma
NaOH	Merck
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumhypochlorit	Roth
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth
o-Nitrophenyl β -D-Galactosidase (oNPG)	Sigma
Orange G	Sigma
Polyacrylamid (PAA)-Mix: 30 % PAA + Bisacrylamid (37,5 : 1)	Roth
Polyethylenglycol (PEG) 4000	Fluka
Pepton	Roth
Phenol	AppliChem
Ponceau rot	Sigma
Rifampicin	Duchefa
Röntgenfilmentwickler LX24	Kodak
Röntgenfilm Fixierer AL4	Kodak
Saccharose	Roth
Salzsäure	Merck
Select Agar	Life Technologies

Select Yeast Extract	Life Technologies
Silwet L77	Lehle Seeds
TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamidin)	Roth
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Roth
Triton X-100	Roth
Trypton	Oxoid
Tween	Sigma
Yeast nitrogen base without amino acids	Difco
β -Mercaptoethanol	Roth

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

3.12 Enzyme

Tabelle 15: Enzyme

Enzym	Hersteller
Advantage cDNA Polymerase Mix (50x)	Clontech
Alkalische Phosphatase (CIAP)	Fermentas
Cellulase „Onozuka R-10“	Serva
DNaseI	Fermentas
Klenow Exo ⁻ Polymerase	Fermentas
Mazercym R-10	Sigma
PfuTurbo DNA Polymerase	Fermentas
Proteinase K	Fermentas
Restriktionsenzyme	Fermentas
Reverse Transkriptase H ⁻ M-MuIV	Fermentas
RiboLock RNase Inhibitor	Fermentas
T4 DNA-Ligase	Fermentas
Taq DNA Polymerase	Molzym

3.13 Kits

Tabelle 16: Kits

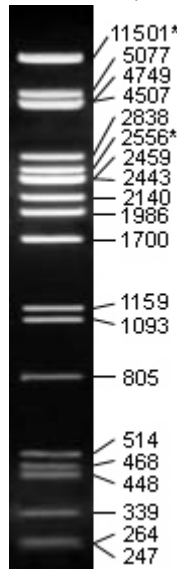
Kit	Hersteller
Amino Allyl MessageAmplII aRNA-Kit	Ambion
BigDye Terminator Ready Reaction Kit	Perkin-Elmer Corporation
Gateway Cloning Kit	Invitrogen
Invisorb Spin Plant RNA Mini Kit	Invitek
NucleoBond Maxiprep Kit	Macherey-Nagel
NucleoSpin Plasmid Miniprep Kit	Macherey-Nagel
NucleoSpin Extraction II Kit	Macherey-Nagel
QuikChange Site-directed mutagenesis kit	Stratagene

3.14 Größenstandards

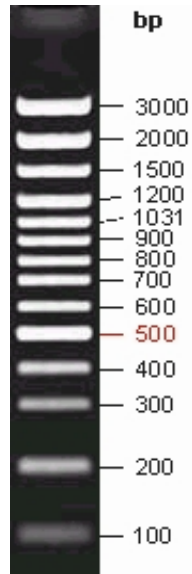
3.14.1 DNA-Größenstandard

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

λ /*Pst*I
(λ -DNA mit
*Pst*I gespalten)
bp



GeneRuler
DNA Ladder Mix
(Fermentas)
bp



3.14.2 Protein- Größenstandard

Zur Ermittlung des Molekulargewichtes von Proteinen wurde die „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ (Fermentas) verwendet.

4 Methoden

4.1 Pflanzenanzucht und Transformation

4.1.1 Pflanzenanzucht

Die *A. thaliana* Pflanzen wurden angezogen in T25-Erde (Fa. Fruhstorfer Erde, Lauterbach), oder nach der Sterilisation auf MS-Medium (Murashige & Skoog) ausgelegt. Nach zwei Tagen bei 4°C im Kühlraum zur Stratifizierung wurden die ausgelegten Samen in die Langtag-Klimakammer bei 22°C gestellt mit 16 Stunden Licht und 8 Stunden Dunkel.

N. benthamiana L. Pflanzen wuchsen in der Klimakammer bei 16 Stunden Licht und 8 Stunden Dunkel.

4.1.2 Floral Dip Transformation

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

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

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

- 1) Mit einer 25 ml Vorkultur 400 ml YEB + entsprechende Antibiotika animpfen und bis zu einer OD₆₀₀ von ~ 2.0 wachsen lassen
- 2) Die Agrobakterien 10 min. bei 1000xg abzentrifugieren und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von etwa 0,8 in Transformationsmedium resuspendieren
- 3) Pflanzen für einige Sekunden bis zur Rosette in die Agrobakterien-Lösung dippen, anschließend zurück in die Klimakammer stellen und 1-2 Tage mit einer Haube abdecken.

Die Pflanzen werden bis zur Samenreife (2-3 Wochen) weiterkultiviert. Die Blütenstände lässt man dann in Papiertüten trocknen. Die trockenen Pflanzen werden vorsichtig mit den Fingern zerrieben um die Schötchen aufzubrechen, und

die Samen durch sieben grob von den übrigen Pflanzenteilen getrennt. Sie können bei 4°C trocken gelagert werden.

4.1.3 Selektion auf Basta®-Resistenz

Die Samen werden zunächst wie gewohnt auf Erde ausgesät und kultiviert. Wenn die Pflanzen 2-4 vegetative Blätter gebildet haben werden sie mit 1 mM Basta besprüht (etwa 1 ml/Topf). Basta bzw. Phosphinothricin (auch Glufosinat = L-Homoalanin-4-yl-(methyl)-phosphinsäure) wirkt als Strukturanalogon des L-Glutamat und inhibiert dadurch die Glutaminsynthetase. Die Pflanzen können bei Behandlung mit Basta Glutamat nicht mehr in Glutamin umwandeln. Dadurch häuft sich Ammonium zu einer letalen Konzentration in der Pflanze an und führt zusammen mit dem Glutaminmangel zum raschen Absterben der behandelten Pflanzen. Pflanzen, die als Resistenzmarker das bar-Gen tragen, sind unempfindlich gegenüber Phosphinothricin (White et al., 1990).

Nach 3-4 Tagen sind die nicht resistenten Pflanzen abgestorben. Um auszuschließen, dass nicht resistente Pflanzen überleben, werden die Pflanzen noch einmal nach 3-4 Tagen mit Basta besprüht.

4.2 Anzucht und Lagerung von Bakterien und Hefen

4.2.1 Anzucht von *Escherichia coli*

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

4.2.2 Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens*

Die Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens* erfolgt entweder auf YEB-Festmedium oder in YEB-Flüssigmedium im Schüttler bei 30 °C mit geeigneten Antibiotika zur Selektion.

4.2.3 Anzucht von *Pseudomonas syringae*

Die Anzucht von *Pseudomonas syringae* erfolgt entweder auf KingsB-Festmedium oder in KingsB-Flüssigmedium im Schüttler bei 29 °C mit geeigneten Antibiotika zur Selektion.

4.2.4 Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae* erfolgt bei 30 °C. Stämme ohne Plasmide werden auf YPD-Medium angezogen. Stämme, die Plasmide enthalten, werden auf den entsprechenden SD-Medien angezogen.

4.2.5 Lagerung der Bakterien

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

Anlage einer Gefrierkultur:

- 1) 750 µl einer frischen ü.N.-Kultur mit 250 µl 87 % Glycerin versetzen
- 2) kräftig vortexen

- 3) schockgefrieren in Flüssigstickstoff
- 4) Lagerung bei -80 °C

4.2.6 Lagerung der Hefen

Die Hefen können auf den entsprechenden Platten mit Parafilm bis zu einem Monat bei 4 °C gelagert werden. Für das Arbeiten mit Hefe sollten die Platten aber frisch sein. Um Hefen längerfristig zu lagern, müssen Gefrierkulturen angelegt werden.

Anlage einer Gefrierkultur:

- 1) 750 µl einer frischen Kultur im entsprechenden SD-Medium mit 250 µl 87 % Glycerin versetzen
- 2) kräftig vortexen
- 3) langsam bei -80 °C einfrieren
- 4) Lagerung bei -80 °C

4.3 Methoden zur Präparation von Nukleinsäuren

4.3.1 Isolierung von RNA

Die Isolierung von RNA aus *A. thaliana* erfolgte nach der Trizol-Methode.

Die Methode basiert auf einer Phenol/Chloroform Extraktion, die die Tatsache ausnutzt, dass RNA sich besser in der hydrophilen, wässrigen Phase löst, während Chlorophyll und andere Bestandteile besser in der hydrophoben Chloroform-Phase gelöst werden. Die beiden Thiocyanat-Salze im Extraktionspuffer inhibieren RNasen und verhindern damit eine Degradation der RNA (Chomczynski, 1993; Chomczynski und Sacchi, 1987).

0,2 g Blattmaterial wird in N₂ aufgemörsert und in ein 1,5 ml- Reagiergefäß überführt. 1,5 ml Trizolpuffer werden hinzugeben und das Gefäß wird auf dem Vortexer fixiert und 5 Minuten geschüttelt. Dann werden 300 µl Chloroform hinzugeben und erneut 5 Minuten geschüttelt. Anschließend wird 30 Minuten bei 4°C/10.000g abzentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Gefäß überführt, es werden 420 µl Fällungspuffer und 420 µl Isopropanol zugegeben. Nach mehrmaligem Invertieren wird 10 Minuten bei RT inkubiert und 15 Minuten bei 4°C/10.000g abzentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, das Pellet mit 70% EtOH gewaschen, 10 Minuten bei 4°C/10.000g abzentrifugiert, 30 sec bei 95°C luftgetrocknet und in 50 µl H₂O gelöst (10 min Schütteln bei 65°C).

Für Microarray-Analysen wurde so isolierte RNA noch über eine Säule des "Invisorb Spin Plant RNA Mini Kit" nach Angaben des Herstellerprotokolls aufgereinigt.

4.3.2 Isolierung von genomischer DNA

Zur Analyse der T-DNA-Insertionsmutanten von *A. thaliana* wurde genomische DNA aus Blättern isoliert. Es wurde eine modifizierte Cetyltrimethylammoniumbromid-(CTAB-) Methode nach Rogers und Bendich (1988) angewandt.

Ein kleines Blatt wurde in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit flüssigem Stickstoff gemörsert. 200 µl CTAB-Lösung wurden zugefügt und für 15 min bei 65°C inkubiert. Dann wurde das gleiche Volumen Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) zugegeben und in einer Eppendorfsentrifuge 3 min bei 7.500 g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Ein gleiches Volumen Isopropanol wurde zugegeben und durch Invertieren des Gefäßes gemischt. Nach einer Inkubation von 30 min bei -20°C, um die DNA zu fällen, wurde die Probe bei 20.000 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und

das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Der Ethanol wurde entfernt, das Pellet kurz getrocknet und in 50 µl Wasser resuspendiert. Hiervon wurden 2 µl für einen PCR-Ansatz eingesetzt.

4.3.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

5 ml LB-Medium mit dem geeigneten Antibiotikum wurden mit einer positiven Kolonie, die durch Kolonie-PCR identifiziert worden war, angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Zur Isolierung der DNA wurde das Nucleospin Plasmid Miniprep Kit verwendet. Die Plasmid-DNA wurde von der Säule mit 50 µl Wasser eluiert.

4.3.4 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

2 µl Nukleinsäurelösung wurden im NanoVue laut Herstellerangaben gemessen. Der Quotient der Extinktionswerte (260/280 nm) stellt ein Maß für die Verunreinigung der Lösung mit UV-absorbierenden Stoffen (Proteinen) dar. Idealerweise sollte der Wert zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Die Nukleinsäurekonzentrationen wurden vom Photometer berechnet. Die Formeln dazu lauten:

$$\text{RNA } [\mu\text{g/ml}] = E_{260} * 42 * V_{\text{Küvette}} * V_{\text{Aliquot}}^{-1}$$

$$\text{DNA } [\mu\text{g/ml}] = E_{260} * 50 * V_{\text{Küvette}} * V_{\text{Aliquot}}^{-1}$$

Alternativ wurden die Konzentrationen von DNA und RNA auch anhand bekannter Mengen Gesamt-DNA und -RNA als Standard bei der TAE-Agarosegelelektrophorese abgeschätzt.

4.4 DNA-Amplifikation durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

4.4.1 Synthese von cDNA

Die reverse Transkription (RT) von mRNA-Vorlagen in cDNA („copy DNA“) Kopien ermöglicht es, indirekt RNA als Ausgangspunkt einer PCR zu verwenden (= RT-PCR) und so bestimmte mRNA-Spezies spezifisch nachzuweisen oder die transkribierte Sequenz eines Gens frei von Introns zu erhalten. Ein Gemisch aus „random Nonamer“-Primer (neun zufällige Basen) und einem an das PolyA-Ende von eukaryotischen mRNA bindender dT₂₀-Primer diente dabei als unspezifische Primer für die Reverse Transkriptase.

Zuerst wurde ein DNase-Verdau durchgeführt, um evtl. mit isolierte genomische DNA zu entfernen: 1 µg RNA wurden mit 1 µl DNase-Puffer, 1 µl DnaseI und 0,25 µl RNase-Inhibitor gemischt, mit Wasser auf 10 µl aufgefüllt und 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde 1 µl 25 mM EDTA zugegeben und 10 min bei 65°C inkubiert, zur Enzyminaktivierung.

Für die cDNA-Synthese wurden noch 1 µl random Nonamer Primer und 0,2 µl oligo dT-Primer zugegeben und 10 min bei 70°C inkubiert, danach die Gefäße sofort auf Eis gestellt. Als Mastermix wurden zugegeben: 2 µl dNTP, 4 µl RT-Puffer, 1 µl RNase-Inhibitor und 10 min bei 37°C inkubiert. Als letztes erfolgte die Zugabe von 1 µl 1:4 verdünnter M-MuLV (Moloney Murine Leukemia Virus) H minus Reverse Transkriptase und Inkubation für 70 min bei 42°C. Bei 70°C wurde in 10 min das Enzym inaktiviert.

4.4.2 Ableitung von Oligonukleotid-Primern

Für die Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen durch PCR sind kurze, einzelsträngige DNA-Sequenzen (Primer) nötig, die sich mit einem komplementären Strang der DNA paaren und ein freies 3'OH-Ende zur Verfügung stellen, an dem die DNA-Polymerase mit der DNA-Synthese beginnen kann. Durch Knüpfung einer Phosphodiesterbindung zwischen OH-Gruppe des Primers und einem freien Nukleotid erfolgt die Kettenverlängerung in 3'-Richtung. Bei der Polymerase-Kettenreaktion sind zwei Primer, ein 5'- und ein 3'-Primer, erforderlich. Durch die Auswahl der Primer lassen sich Anfang und Ende des amplifizierten DNA-Stranges definieren. Die abgeleiteten Primer waren zwischen 18 und 30 Nukleotiden lang, hatten einen GC-Gehalt von 40-60% und enthielten in den letzten fünf Nukleotiden am 3'-Ende mindestens drei A oder T, endeten aber nicht auf T. Aus der abgeleiteten Sequenz ergab sich T_m , die Schmelztemperatur, bei der 50% der Primer an der komplementären DNA-Sequenz angelagert bzw. abgelöst sind. Der T_m -Wert der Primer ist ein wichtiges Kriterium für die Wahl der Annealing-Temperatur im PCR-Programm, um eine falsche Anlagerung der Primer und Amplifikation falscher Sequenzen zu begrenzen. T_m sollte für ein Primer-Paar dicht beieinanderliegen und wurde nach folgender Formel berechnet:

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = 69,3 + 0,41 * [\text{GC-Gehalt in \%}] - 650/\text{Nukleotidanzahl}$$

Die Primer sollten nicht miteinander oder mit sich selbst komplementär sein oder Sekundärstrukturen bilden. Das wurde mit dem Programm VectorNTI überprüft.

4.4.3 PCR

Gene wurden mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Mullis und Faloona, 1987) amplifiziert. Dabei handelt es sich um eine Methode, bei der gezielt spezifische DNA-Sequenzen mehr als 10^6 -fach vermehrt werden. Die DNA wird zyklisch immer wieder thermisch denaturiert und mit Primern hybridisiert, die von hitzestabiler DNA-Polymerase verlängert werden. Die *Taq* DNA Polymerase wurde zur. Sie ist die billigste DNA Polymerase und amplifiziert schneller als die „proofreading“ (Korrekturlese) DNA Polymerasen, die normalerweise zur Klonierung verwendet werden. Diese haben eine 3'→5' Exonuklease Korrekturlese-Funktion und dadurch eine zehnfach höhere Genauigkeit (Fehlerrate etwa 2×10^{-3}) als *Taq* Polymerase. Von den Korrekturlese-Polymerasen wurden im Laufe der Zeit drei verschiedene benutzt, die alle „blunt ended“ PCR-Produkte (mit stumpfen Enden) erstellen: *PfuUltra*TM High-Fidelity DNA Polymerase (Fa. Stratagene), SAWADY *Pwo*-DNA-Polymerase (Fa. Peqlab) und *Pfu* DNA Polymerase (Fa. Fermentas). *Taq* Polymerase stammt aus *Thermophilus aquaticus*, *Pfu* aus *Pyrococcus furiosus* und *Pwo* aus *Pyrococcus woesei*.

Standardansätze bestanden aus folgenden Komponenten:

	<i>Taq</i> Polymerase	Korrekturlese-Polymerase
10x Reaktionspuffer (zum Enzym passend)	2,5 µl	5 µl
50 mM MgCl ₂	1 µl	-
10 mM dNTP	0,5 µl	1 µl
10 µM 5'-Primer	0,5 µl	1 µl
10 µM 3'-Primer	0,5 µl	1 µl
DNA-Matrize	2 µl	2 µl
DNA Polymerase	0,25 µl (1,25 U)	1 µl (1 U)
dd H ₂ O	ad 25 µl	ad 50 µl

Ein Standardprogramm war folgendermaßen:

Zyklen	Temperatur	Dauer
1	95°C	2 min
35	95°C	30 sec
	Annealing-Temperatur	30 sec
	72°C	1:30 min
1	72°C	10 min

Die Annealing-Temperatur lag 5°C niedriger als die Schmelztemperatur, die spezifisch für jedes Primerpaar war. Von beiden Primern wurde immer die niedrigere Temperatur gewählt. Durch TAE-Agarose-Gelelektrophorese wurden die Amplifikationsprodukte analysiert.

4.4.4 Quantitative realtime PCR

Es wurde das iCycler System der Fa. BioRad zur Amplifizierung und Quantifizierung von cDNA verwendet. Ein PCR-Ansatz bestand aus 1x NH₄-Reaktionspuffer, 2 mM MgCl₂, 100 µM dNTPs, 0,4 µM Primer, 0,25 u BIOTaq DNA, 10 nM Fluoresceine, 100.000 fach verdünnte SYBR Green I Lösung, 1 µl von 1:10 verdünnter cDNA als Template und H₂O bis zu einem Volumen von 25 µl. Das PCR-Programm lief folgendermaßen ab: 6 min 95°C, 40 Zyklen: 20 sec bei 95°C, 20 sec bei 55°C und 40 sec bei 72°C.

4.5 Klonierungsmethoden

4.5.1 TAE-Agarose-Gelelektrophorese

Um den Erfolg einer PCR zu überprüfen, wurden die PCR-Produkte durch eine TAE-Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Es wurden 1%ige (w/v) TAE-Agarosegele gegossen mit der gewünschten Anzahl Taschen. Vor dem Probenauftrag wurde den Proben jeweils 1/6 Volumen Probenpuffer zugesetzt. Die Gele wurden bei 140 Volt in 1x TAE-Puffer für 40 min laufen gelassen und dann für 10 min in ein Ethidiumbromidbad gelegt (50 µl 1% Ethidiumbromid in Wasser verdünnt). Die DNA-Banden konnten dann durch UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert werden.

4.5.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Vor der Ligation eines bestimmten DNA-Fragments in ein Plasmid musste dieses DNA-Stück von den Primern und anderen im Versuchsansatz vorhandenen DNA-Fragmenten getrennt werden. Dies ist zum einen bei dem Produkt einer PCR erforderlich, da dort oft auch unerwünschte Amplifikationsprodukte entstehen, zum anderen bei einem Restriktionsverdau, bei dem i.d.R. mindestens zwei DNA-Fragmente entstehen. Die Trennung des gewünschten DNA-Fragments von den unerwünschten erfolgte durch eine präparative TAE-Agarose-Gelelektrophorese. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 140 Volt. Die gesuchte DNA-Bande wurde dann unter UV-Licht aus dem Gel herausgeschnitten, wobei sie dem UV-Licht möglichst kurz ausgesetzt werden sollte, um UV-induzierte Mutationen zu vermeiden. Die DNA wurde von der Agarose und dem gebundenen Ethidiumbromid durch den NucleoSpin Gel Extraction Kit der Firma Macherey-Nagel eluiert. Dieses Kit beruht auf der selektiven Bindung von Nukleinsäuren an Kieselgel-Partikel bei hohen Salzkonzentrationen. Im letzten Schritt der Elution wurde die DNA in 30 µl H₂O

aufgenommen. Um den Erfolg der Elution zu überprüfen, wurde wiederum eine TAE-Agarose-Gelelektrophorese mit 5 µl des Eluats durchgeführt.

4.5.3 Ligation

Bei der Ligation wird ein eluiertes DNA-Fragment in einen Vektor ligiert, wenn sie die gleichen überhängenden Enden haben. Das ist der Fall, wenn sie mit dem gleichen Restriktionsenzym geschnitten wurden, oder bei der T/A-Klonierung. Für die Ligation ist das molare Verhältnis von DNA-Fragment (Insert) zu Vektor wichtig, es muss immer mehr Insert als Vektor vorliegen, z.B. im Verhältnis 3:1. Berechnung der einzusetzenden Insert-Menge:

$$ng \text{ Insert} = \frac{ng \text{ Vektor} * kb \text{ Größe des Inserts}}{kb \text{ Größe des Vektors}} * \text{molares Verhältnis} \frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}}$$

Für einen Standardligationsansatz wurde die errechnete Menge Insert mit 0,5 µl Vektor (50 ng/µl), 1 µl 10x T4-DNA-Ligase-Puffer und 1 µl T4-DNA-Ligase mit Wasser auf 10 µl aufgefüllt, gemischt und über Nacht bei 16°C inkubiert.

4.5.3.1 PCR-Produkte in pSK-T

PCR-Produkte wurden zuerst in den Vektor pSK-T ligiert, bei dem die sogenannte T/A-Klonierung genutzt werden konnte. Mit *Taq*-DNA-Polymerase amplifizierte PCR-Produkte haben an ihren 3'-Enden ein überhängendes A. Der Vektor besitzt korrespondierend dazu ein überhängendes T an seinen 3'-Enden, so dass solche PCR-Produkte ohne weitere Modifizierung mit der Ligase-Reaktion eingefügt werden konnten. PCR-Produkte, die mit Korrekturlese-DNA-Polymerasen amplifiziert worden sind, haben keine solchen Überhänge und mussten diese erst durch „A-tailing“ erhalten.

„A-tailing“ Methode:

1-7µl PCR-Produkt

1 µl 10x Reaktionspuffer mit MgCl₂

dATP bis zu einer Endkonzentration von 0,2 mM

0,5 µl *Taq*-DNA-Polymerase

mit ddH₂O auf 10 µl auffüllen und alles mischen. Inkubation bei 70°C für 15-30 min.

Davon wurden 2-5 µl in einer Ligationsreaktion eingesetzt.

4.5.3.2 Gateway-Rekombination

Bei Gateway-Klonierungen werden DNA-Segmente über ortsspezifische Rekombination zwischen verschiedenen Plasmiden transferiert. Das System basiert auf der ortsspezifischen Integration des Phagen Lambda in das Genom von *E.coli*. Um für die Rekombination verfügbar zu sein, müssen Erkennungssequenzen an das gewünschte DNA-Segment angefügt werden. Dies geschieht, indem man das gewünschte DNA Stück mit Primern amplifiziert, die an den 5'-Enden die Erkennungssequenzen enthalten. Bei Gateway-Klonierungen werden zwei Reaktionen verwendet. Das DNA Segment kann aus dem PCR-Produkt in der BP-Reaktion in einen Eingangs-Vektor rekombiniert werden. Von dort aus kann es in der LR-Reaktion in verschiedene Ziel- Vektoren transferiert werden. Außerdem besteht die Möglichkeit, das DNA-Segment aus dem Ziel-Vektor in einer weiteren BP-Reaktion in einen anderen Eingangs-Vektor zu transferieren.

4.5.3.2.1 Aufreinigung von attB-PCR Produkten

Die Aufreinigung des PCR-Produktes ist notwendig, um Primer-Dimere zu entfernen, die in den Eingangs-Vektor rekombiniert werden könnten.

- 1) zu einem 50 µl PCR-Ansatz 150 µl TE zugeben
- 2) 100 µl 30 % PEG 8000/ 30 mM MgCl₂ zugeben
- 3) gründlich vortexen und sofort 15 Minuten bei 10.000xg und RT abzentrifugieren
- 4) Pellet in TE aufnehmen

4.5.3.2.2 BP-Reaktion

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

- 1) 50-200 ng attB-PCR-Produkt (oder linearisierter Ziel-Vektor) in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß geben
 - 2) 150 ng Eingangs-Vektor zugeben
 - 3) 2 µl 5x BP Reaktions-Puffer zugeben
 - 4) mit TE auf 9 µl auffüllen
 - 5) 1 µl BP CLONASE Enzym Mix zugeben
 - 6) kurz vortexen und ü.N. bei 25° C inkubieren
 - 7) 1 µl Proteinase K zugeben und 10 Minuten bei 37° C inkubieren
- 5 µl des Ansatzes werden in 100 µl chemisch kompetente DH5α-Zellen transformiert.

4.5.3.2.3 LR-Reaktion

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

- 1) 100-200 ng Eingangs-Vektor in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß geben
- 2) 200 ng Ziel-Vektor zugeben
- 3) 2 µl 5x LR Reaktions-Puffer zugeben
- 4) mit TE auf 9 µl auffüllen
- 5) 1 µl LR CLONASE Enzym Mix zugeben
- 6) kurz vortexen und ü.N. bei 25° C inkubieren
- 7) 1 µl Proteinase K zugeben und 10 Minuten bei 37° C inkubieren

Anschließend werden 5 µl des Ansatzes in 100 µl chemisch kompetente DH5α-Zellen transformiert.



Abbildung 7: Schema der LR Clonase™ Reaktion, bei der „Gen“ eine cDNA in einen Expressionsvektor transferiert wird, wobei durch die Kombination von Anitbiotikazusatz und ccdB-Gen nur das gewünschte Plasmid Kolonien bildet.

4.5.4 Transformation von *E. coli*

4.5.4.1 Präparation kompetenter *E. coli* Zellen

Für die Präparation kompetenter *E. coli* Zellen wurde die Methode von Inoue et al. (1990) modifiziert. Diese Methode erzeugt kompetente Zellen mit hoher Transformationseffizienz, die bei -70°C lange Zeit gelagert werden können.

100 ml LB-Medium wurden mit einigen Kolonien *E. coli* Zellen angeimpft und im Schüttler für 2 h bei 37°C , dann bei 16°C bis zu einer $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ von 0,4 wachsen gelassen. Dann wurden sie für 10 min auf Eis inkubiert und für 10 min bei 4.000 Upm und 4°C in einer Eppendorfzentrifuge sedimentiert. Nach der Resuspension in 30 ml eiskaltem TB-Puffer wurden sie wieder für 10 min auf Eis inkubiert und sedimentiert. Danach erfolgte eine Resuspension in 8 ml eiskaltem TB-Puffer. Es wurden 560 μl DMSO zugegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen zu 200 μl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

4.5.4.2 Transformation kompetenter *E. coli* Zellen

Nachdem 200 μl kompetente Zellen langsam auf Eis aufgetaut worden waren, wurde der Ligationsansatz zugegeben, vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 45 sec bei 42°C . Der Ansatz wurde für 5 min auf Eis gekühlt und 1 ml SOC-Medium zugegeben. Danach wurden die Bakterien für 1 h unter Schütteln bei 37°C inkubiert.

Die transformierten Zellen wurden auf LB-Agar-Platten mit geeignetem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Wenn pSK-T benutzt wurde, wurden vorher 40 μl 100 mM IPTG und 40 μl 2% x-Gal pro Platte ausgestrichen. Diese Zusätze sind für die Blau/Weiß-Selektion notwendig, bei der nur Bakterien mit einem Vektor mit Insert weiße Kolonien bilden, da die kodierende Region für das α -Peptid der β -Galaktosidase durch die Insertion unterbrochen ist. Bakterien mit einem Vektor ohne Insert bilden blaue Kolonien, da ihr *lacZ*-Gen (= β -Galaktosidase) nicht unterbrochen ist. Die β -Galaktosidase bewirkt die Umsetzung des farblosen Stoffes x-Gal zu einem blauen Derivat.

4.5.5 Einfügen von Punktmutationen

Zur spezifischen Mutagenese eines Gens wurden mutagenisierende Primer verwendet, die spezifische Punktmutationen in die Gensequenz einfügen. Verwendet wurde hierfür das Protokoll QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit des Herstellers Stratagene.

4.5.6 Kolonie-PCR

Um positive Kolonien zu identifizieren, d.h. solche mit dem gewünschten Insert, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dafür wurde ein Master-Mix mit allen Bestandteilen für eine PCR-Reaktion außer der DNA-Matrize auf Eis zusammenpipettiert und dann in PCR-Reaktionsgefäße verteilt. Als Primer wurden entweder die genspezifischen Primer verwendet, oder, wenn die Richtung des Inserts überprüft werden sollte, der „forward“ Primer des Vektors und der genspezifische „reverse“ Primer. Mit sterilen Zahnstochern wurden ca. 10 Kolonien gepickt, jeweils in ein Reaktionsgefäß getaucht und auf einer neuen LB-Agarplatte ausgestrichen, die über Nacht bei 37°C inkubiert wurde. Das verwendete PCR-Programm begann mit 5 min bei 95°C und bestand aus 35 Zyklen. Bei positiven Kolonien entstand eine

Bande in der Größe des Gens. Von bis zu drei positiven Kolonien wurde das Plasmid isoliert und weiter analysiert.

4.5.7 Restriktionsverdau

Für Klonierungen und zur Überprüfung von positiven Kolonien wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt. Es konnten z.B. Restriktionsenzyme gewählt werden, die im Vektor vor oder hinter der Insertionsstelle schneiden und solche, die im Gen schneiden. Die erhaltenen Banden konnten mit der erwarteten Größe verglichen werden.

Für einen Restriktionsansatz wurden 2 - 8,5 µl Plasmid-DNA (je nach Konzentration, ca. 1 µg DNA) mit 1 µl 10x Reaktionspuffer und 0,5 µl Restriktionsenzym (5 U) gemischt und gegebenenfalls mit Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Soweit nicht anders angegeben, wurde der Ansatz 1 h bei 37°C inkubiert und dann auf ein TAE-Agarose-Gel aufgetragen.

DNA konnte auch gleichzeitig mit zwei Restriktionsenzymen verdaut werden (Doppelverdau), sofern es einen Puffer gab, in dem beide Enzyme mehr als 50% Aktivität aufwiesen. Welcher Puffer der beste war, konnte in einer Tabelle von Fermentas überprüft werden. Der Ansatz, der beide Restriktionsenzyme, Puffer und DNA enthielt, sollte ein Gesamtvolumen von 20 µl haben, um die Glycerin Konzentration gering zu halten.

4.5.8 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach Sanger et al. (1977). Dazu wurde ein Kit benutzt, der mit dRhodamin markierte Didesoxynukleotide enthielt („ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“). Die verschiedenen markierten ddNTPs haben Absorptions- und Emissionsspektren von 450-650 nm. Folgender Ansatz wurde für die Kettenverlängerungsreaktion verwendet:

1 µl Terminator Ready Reaction Mix
 1,5 µl T-Puffer
 150-300 ng Plasmid-DNA
 5 pmol Sequenzierungs-Primer
 ad 10 µl H₂O

Als Sequenzierungs-Primer dienen Abschnitte, die auf dem Vektor in der Nähe der Insertionsstelle liegen.

Die Kettenverlängerung erfolgte unter folgenden Bedingungen:

Zyklen	Temperatur	Dauer
1	95°C	1 min
30	95°C	10 sec
	50°C	5 sec
	60°C	3 min

Nach dieser Reaktion mussten die nicht eingebauten ddNTPs durch eine DNA-Fällung entfernt werden. Dazu wurde der PCR-Ansatz mit 9,5 µl Wasser aufgefüllt und mit 30,5 µl abs. Ethanol versetzt und durch Invertieren gemischt. Die Probe wurde für 30-60 min bei Raumtemperatur inkubiert und nach einer 30-minütigen Zentrifugation bei 13.000 Upm der Überstand entfernt. Das Pellet wurde zum Waschen in 125 µl 70% Ethanol aufgenommen. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Pellet für 30 sec bei 65°C getrocknet.

Anschließend wurde das Pellet in 10 µl HiDi gelöst. Die Probe konnte nun im ABI Prism 3100 Genetic Analyzer sequenziert werden.

4.6 Transformation von Agrobakterien und Hefe

4.6.1 Herstellung kompetenter Agrobakterien

5 ml einer Agrobakterienflüssigkultur werden abzentrifugiert (5 min, 5000 rpm, RT) und dreimal durch Resuspendieren und erneutes Abzentrifugieren in sterilem Wasser gewaschen. Das Pellet wird in 500 µl sterilem Wasser aufgenommen und in 100 µl Aliquots in flüssigem N₂ eingefroren.

4.6.2 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 wird der Transformationsansatz in sterile Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand: 2 mm) überführt. Die Elektroporation erfolgt am GenePulser mit 2,5kV, 25µF, 400Ω. Der Transformationsansatz wird anschließend in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 1 ml LB-Medium aufgefüllt. Die Regeneration der Agrobakterien erfolgte für 2 Stunden bei 28°C, danach werden sie auf YEB-Selektionsmedium ausplattiert.

4.6.3 Herstellung kompetenter Hefezellen

Die Kompetenz von Hefezellen zur DNA-Aufnahme läßt sich durch das Alkalimetallion Li⁺ induzieren. Dabei ist desweiteren PEG (Polyethylenglykol) 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 lässt sich die Transformationseffizienz deutlich steigern (Hill et al., 1991).

- 1) animpfen von 20 ml YPD-Medium mit den Hefezellen einer einzelnen Kolonie
- 2) Wachstum ü.N. bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 1,5
- 3) ü.N.-Kultur in 100 ml YPD überimpfen, die OD₆₀₀ sollte etwa 0,2 betragen
- 4) Hefen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 anziehen
- 5) Zentrifugation: 5 Minuten / 1000 x g / RT
- 6) Überstand verwerfen
- 7) Pellet in 10 ml Lösung A resuspendieren
- 8) Zentrifugation: 5 Minuten / 1000 x g / RT
- 10) Überstand verwerfen
- 11) Pellet in 2 ml Lösung A resuspendieren
- 12) in 100 µl Aliquots abfüllen, langsam bei -70°C einfrieren

4.6.4 Transformation der kompetenten Hefezellen

- 1) 100 µl kompetente Hefezellen (gefroren) auf Eis
- 2) Heringssperma-DNA (HSP) für 20 Minuten abkochen, dann auf Eis

- 3) jeweils ca. 0,5 µg der jeweiligen Plasmid DNA, 50 µg HSP sowie 100 µl kompetenter Zellen mischen
- 4) 5 min bei 37°C in den Roller
- 5) 1 ml Lösung B dazu geben und vorsichtig mischen
- 6) Inkubation: 60 Minuten / 30 °C, unter Schütteln (200 rpm)
- 7) 20s bei 13000 rpm bei RT abzentrifugieren und Überstand verwerfen
- 8) Pellet in 800µl Lösung C vorsichtig waschen
- 9) 20s bei 13000 rpm bei RT abzentrifugieren und Überstand verwerfen
- 10) Pellet in 100 µl Lösung C vorsichtig resuspendieren
- 11) Transformationsansatz auf dem entsprechenden SD-Medium ausplattieren

4.7 Transiente Expression

4.7.1 Transiente Expression in *Arabidopsis* Mesophyll-Protoplasten

4.7.1.1 Protoplastengewinnung

Von 3-4 Wochen alten Pflanzen werden das 2te oder 3te Blattpaar entnommen und von der Blattunterseite fein eingeritzt. Mit der angeritzten Unterseite werden die Blätter auf die Enzymlösung in eine Petrischale gelegt (10-20 Blätter auf 5-10 ml Enzymlösung) und über Nacht verdaut. Durch leichtes schwenken der Petrischale fallen die Protoplasten in die Enzymlösung. Die Protoplastensuspension wird mit einem Metallnetz (35-75µm) filtriert und bei 100 g für 1 min (RT) zentrifugiert. Das Protoplastenpellet wird vorsichtig zweimal durch leichtes Schwenken in 10 ml kalte W5- Lösung resuspendiert und für ca. 5 h auf Eis inkubiert (max. 24h).

4.7.1.2 Protoplasten- PEG- Transformation

Vor der Transformation erfolgt ein erneutes Resuspendieren der abgesetzten Protoplasten und anschließendes Auszählen der Lebendzellzahl mit Hilfe einer Zählkammer. Nach Zentrifugation bei 100 g für 1 min (RT) wird das Pellet in 1-2 ml MMg-Lösung je 10^5 Zellen vorsichtig durch Schwenken resuspendieren. In 2 ml Eppendorfgefäße mit rundem Boden werden 20 µl DNA (20-40 µg) vorgelegt und 200µl Protoplasten vorsichtig mit einer abgeschnittenen blauen Spitze hinzugefügt. Nach vorsichtigem mischen werden 220 µl PEG-Lösung hinzugefügt und erneut vorsichtig gemischt. Dann folgte eine Inkubation für 30 Minuten bei RT. Es werden 800 µl W5-Lösung hinzugefügt und nach vorsichtigem mischen folgt eine Zentrifugation bei 100 g für 1 min (RT). Mit einer blauen Spitze wird vorsichtig 1 ml vom Überstand abgenommen. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 100 g für 1 min (RT) werden mit einer gelben Spitze vorsichtig ca. 200 µl vom Überstand abgenommen. Der restliche Überstand wird nach einer weiteren Zentrifugation bei 100 g für 1 min (RT) mit einer Insulin-Spritze abgenommen. 250 µl WI- Lösung werden vorsichtig hinzugefügt und dabei wird das Protoplastenpellet resuspendiert. Nach Inkubation für 8-16 h im Klimaschrank werden 200 µl des Überstandes mit einer gelben Spitze entfernt. Nach Zentrifugation bei 100 g für 1 min (RT) wird der restliche Überstand mit einer Insulinspritze vorsichtig entfernt.

4.7.1.3 Messung der β -Glucuronidase (GUS)-Aktivität

Die β -Glucuronidase (GUS) ist das Genprodukt des *GUS*-Reportergens. Das GUS-Enzym ist in der Lage β -Glucuronide in D-Glucuronsäuren und einem aglyconischen

Rest zu spalten. Setzt man das künstliche Substrat 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid (4-MUG) ein, so erhält man nach der Hydrolyse das fluoreszierende Molekül Methylumbelliferon (MU). Die Anregung des MU erfolgt bei 360 nm, die Emission bei 460 nm.

Die transformierten Protoplasten werden in 70 μ l GUS-Extraktionspuffer mit β -Mercaptoethanol aufgenommen und 2 Proben werden vereinigt. 100 μ l der Proteinsuspension werden in ein Well einer Mikrotiterplatte überführt. 100 μ l MUG-Gebrauchslösung werden zugeben. Nach mischen wird 10 min bei 37°C inkubiert. 100 μ l des Reaktionsansatzes in ein neues Well überführen und die Reaktion durch Zugabe von 100 μ l GUS-Stop-Puffer abgestoppt (t_0).

Weitere 100 μ l des Reaktionsansatzes werden für 60 min bei 37°C inkubiert, und dann ebenfalls gestoppt (t_{60}). Die Quantifizierung der Fluoreszenz erfolgt im CytoFluor II Plate Reader, die GUS-Aktivität wird nach folgender Formel berechnet.

$$\text{GUS-Aktivität [pmol/(min*mg)]} = \Delta F/10/(t*mg)$$

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

10 Fluoreszenzeinheiten entsprechen 1 pmol MUG-Umsatz.

$t = 60\text{min}$

mg = eingesetzte Gesamtproteinmenge in mg

4.7.1.4 Messung der Neuraminidase (NAN)-Aktivität

Zur Korrektur der Variation der einzelnen Ansätze in einem Experiment, wurde zusätzlich das Pro_{35S}:NAN (Neuraminidase) Plasmid eingeführt (Kirby und Kavanagh, 2002; Ehlert et al., 2006). Die Neuraminidase (NAN) ist das Genprodukt des NAN-Reportergens. NAN ist ein codon-optimiertes *nanH* aus *Clostridium perfringens*. Das NAN-Enzym setzt das künstliche Substrat ‚2`-(4-Methylumbelliferyl)-alpha-D-N-acetylneuraminic acid‘ (MUN) um und man erhält nach der Hydrolyse das fluoreszierende Molekül Methylumbelliferon (MU). Durch die Stärke der Fluoreszenz in den Ansätzen lässt sich die umgesetzte Menge MU quantifizieren und die Aktivität des NAN-Enzyms bestimmen. Die Anregung des MU erfolgt bei 360 nm, die Emission bei 460 nm (Kirby und Kavanagh, 2002; Ehlert et al., 2006). Die MUN-Messung erfolgt parallel zu der MUG-Messung:

10 μ l der Proteinsuspension in GUS-Extraktions-Puffer mit β -Mercaptoethanol werden in ein Well einer Mikrotiterplatte überführt. 10 μ l MUN-Gebrauchslösung werden zugeben. Nach mischen wird 10 min bei 37°C inkubiert. 3,3 μ l des Reaktionsansatzes in ein neues Well überführen und die Reaktion durch Zugabe von 200 μ l NAN-Stop-Puffer abgestoppt (t_0).

Die restlichen 16,7 μ l des Reaktionsansatzes werden für 60 min bei 37°C weiter inkubiert, und dann davon ebenfalls 3,3 μ l abgestoppt (t_{60}). Die Quantifizierung der Fluoreszenz erfolgt im CytoFluor II Plate Reader, die NAN-Aktivität wird entsprechend der GUS-Aktivität berechnet.

Das Verhältnis zwischen den GUS- und NAN-Aktivitäten wird als relative GUS/NAN-Aktivitäten in ‚units‘ angegeben. Die relativen GUS/NAN-Aktivitäten werden wie folgt berechnet:

$$\text{GUS/NAN-Aktivitäten [units]} = \text{GUS-Aktivität/NAN-Aktivität}$$

4.7.2 Transiente Expression in *Nicotiana benthamiana*

‚Bimolecular Fluorescence Complementation‘ (BiFC)

Eine Bestimmung der Proteininteraktion wurde mit der BiFC Methode durchgeführt (Walter et al., 2004; Hu et al., 2002). Das YFP-Protein (‚Yellow Fluorescence Protein‘) ist in diesem System in ein amino- und ein carboxyterminales Fragment

geteilt, die einzeln nicht fluoreszieren. Diese Fragmente werden an die zu untersuchenden Proteine fusioniert. Wenn die YFP-Fragmente durch eine Protein-Protein Interaktion der an sie fusionierten Proteine wieder in räumliche Nähe gebracht werden, so wird die Funktion des YFP rekonstituiert. Die Fusionsproteine werden durch *Agrobacterium* Infiltration in *Nicotiana benthamiana* Blättern transient exprimiert. Die Expressionsvektoren (pE-SPYNE-GW und pE-SPYCE-GW) wurden mit Hilfe des Gateway® Systems hergestellt. Für die Transformation wurde der *A. tumefaciens* Stamm GV3101 RK verwendet, der auf AMM-Platten (Rif50, Gent25, Kan50, Carb50) kultiviert wurde. Es wurde immer zusätzlich das p19k-Protein (*A. tumefaciens* p19k) transformiert. Das p19k-Protein des ‚bushy stunt virus‘ wird zur Unterdrückung des ‚gene silencing‘ verwendet. Die Tabakpflanzen sollten 2-3 Wochen alt sein. In älteren Pflanzen sinkt die Transformationsrate.

Die transformierten Agrobakterien-Stämme wurden in YEB (Rif50, Gent 25, Kan50, Carb50) und zusätzlich das *A. tumefaciens* p19k in YEB (Rif50, Gent 25, Kan50) angeimpft und ü.N. bei 29°C im Schüttler wachsen gelassen. Bei einer OD_{600nm} von 0,8 wurden die Kulturen bei 4000 rpm 15 min abzentrifugiert und in AS-Medium resuspendiert. Die Agrobakterien und *A. tumefaciens* p19k wurden im gleichen Verhältnis gemischt (1:1:1) und 4 h bei RT inkubiert. Die wurden Pflanzen in der Inkubationszeit gut gewässert, dann mit einer Spritze (Omnifix(R) 40 Solo, Ref 9161306V) in die Unterseite der Blätter mit den Lösungen infiltriert. Nach 48 h Inkubation in der Klimakammer wurde die Expression analysiert.

Bestimmung der Lokalisation von YFP-Fusionsproteinen

YFP-Fusionsproteine werden entsprechend der BiFC Methode transient in *N. benthamiana* exprimiert. Verwendet wurde der Gateway kompatible Expressionsvektor pENSG-YFP.

4.8 Detektion fluoreszenzmarkierter Proteine

Die Analysen der in *Arabidopsis* Mesophyllprotoplasten transient exprimierten YFP-Proteine wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop BX60 der Firma Olympus und mit dem konfokalen Mikroskop TCS SP2 AOBS der Firma Leica durchgeführt. Die Analysen der transienten Expression von BiFC-Konstrukten in *N. benthamiana* wurden ausschließlich mit dem konfokalen Mikroskop mit folgenden Einstellungen durchgeführt:

BX60: Anregungsfilter 460- 495 nm

Detektion YFP: Sperrfilter (U-WIBA) 510- 550 nm

Detektion YFP und Chlorophyllanregung: Sperrfilter (U-NWB) 510 nm

TCS SP2 AOBS:

YFP-Anregung mit einem Argon Laser: 488 nm

Detektion: 510- 580 nm

Chlorophyll-Anregung (Argon-Laser): 514 nm

Detektion: 650-700 nm

4.9 Infektion mit *Pseudomonas syringae*

Zur Infektion mit *Pseudomonas* werden Pflanzen entweder in die Bakteriensuspension gedippt, wofür mehrere Samen auf Torfquelltopfe ausgelegt wurden und ca. 3 Wochen alt waren, oder 4-5 Wochen alte Pflanzen werden auf der Blattunterseite durch die Stomata infiltriert. Die Infiltration wurde nur für *Pseudomonas* mit dem lux-Gen verwendet, wobei die Infektion über Lumineszenz sichtbar gemacht bzw. quantifiziert wurde.

4.9.1 Dipping

Dazu wird eine 10 ml ü.N.-Bakterienkultur mit 10 mM MgCl₂ gewaschen und mit Hilfe des Photometers mit 10 mM MgCl₂ auf eine OD_{600nm} von 0,2 verdünnt. Diese Suspension wird wiederum auf eine OD_{600nm} von 0,002 verdünnt und mit 0,02% Silvett versetzt. In 150 ml dieser Lösung werden die Pflanzen 30 sec-1 min gedippt, so dass die Blätter ganz untergetaucht sind, dann 1 h stehen gelassen zum Trocknen und Erholen. Pro Pflanzenlinie werden 3 x 3 kleine Blätter abgetrennt und in abgewogene 2 ml Eppendorfgefäße mit 1 ml 10 mM MgCl₂/0,2% Silvett gelegt. Nach nochmaligem Abwiegen zur Frischgewichtsbestimmung werden die Bakterien 10 min ausgeschüttelt (Eppendorf-Schüttler) und 100 µl der Suspension auf KingsB-Platten ausgestrichen. An Tag 0: unverdünnt, Tage 3 und 5: Verdünnungen von 10⁻³ und 10⁻⁴ werden ausplattiert und 3 Tage später die Kolonien ausgezählt.

4.9.2 Infiltration

Die Bakteriensuspension wird ebenfalls auf eine OD_{600nm} von 0,002 verdünnt und mit einer Spritze in die Blattunterseite von mehreren Blättern pro Pflanze infiltriert. Nach einer ca. einstündigen Erholungsphase und mind. 10 min im Dunkeln, wird die Lumineszenz aller Pflanzen mit der sensitiven CCD-Kamera fotografiert.

Zur Quantifizierung werden Blattscheiben der infiltrierten Gebiete ausgestanzt (Ø 5 mm) und auf 50 µl Wasser in eine weiße Mikrotiterplatte verteilt, so dass die Lumineszenz im Luminometer gemessen werden kann.

4.9.3 Lumineszenz-Imaging

Arabidopsis-Pflanzen wurden in die „dark box“ des Luciferase-Imaging-Systems platziert. Nach der Fokussierung des Bildes im live-Image-Modus des Kamerasystems wurde eine Schwarzweiß-Aufnahme erstellt und die „dark box“ anschließend verschlossen. Vor dem Aufnahmestart des Lumineszenz-Bildes mussten die Pflanzen acht Minuten zur Abstrahlung der Autophosphoreszenz der photosynthetisch aktiven Pflanzenteile in der Dunkelkammer verbleiben. Danach wurden mit der „high gain“-Einstellung der Kamera je nach Stärke der Luciferase-Expression Bilder mit einer Belichtungszeit von 5-60 Minuten erstellt. Da es bei langen Belichtungszeiten zu Bildstörungen durch Umgebungsstrahlung kommt, wurden die Bilder mit der „spot noise reduction“-Einstellung gemacht. Mit der Kamerasoftware Wasabi[®] konnten die Schwarzweiß- und Lumineszenz-Aufnahmen anschließend durch Bildüberlagerung vereint werden.

4.10 Infektion mit *Botrytis cinerea*

4.10.1 Anzucht

Stücke des Mycels auf einer PDA-Platte (Wachstumsplatte) oder Sporen aus einem Glycerin-Stock (-80°C) werden auf frische Malz-Extrakt-Platten (Sporulationsplatte) umgesetzt. Das Pilzwachstum findet im Dunkeln bei RT für 7-12 Tage statt. Die Sporulation wurde durch 24stündige UV-Bestrahlung initiiert. Danach wurden die Platten bis zur vollständigen Sporulation noch 4-7 Tage im Dunkeln bei RT inkubiert. Gesammelte Sporen wurden als Glycerin-Stocks (30%) in 50 µl-Aliquots bei -80°C eingefroren.

4.10.2 Sammeln der Sporen

Fünf ml PDB-Medium wurden auf eine vollständig sporulierte Platte gegeben. Die Pilzhyphen wurden mit einem Drigalskispatel abgeschabt und das Medium mit den Hyphen und Sporen wurde durch 3 Lagen Mull gefiltert. Die Sporen wurden in einer Thomma-Zählkammer gezählt und mit PDB auf eine Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Sporen/ml verdünnt.

4.10.3 Infektion

Die Sporenlösung wurde im Licht bei RT 2-3 h inkubiert. Pflanzen wurden infiziert, indem 5 µl der Sporenlösung auf mehrere voll entfaltete Blätter gegeben wurde. Für 24 h nach der Infektion wurde die Haube über den Pflanzen gelassen, damit der Pilz optimale Wachstumsbedingungen hatte (hohe Luftfeuchtigkeit).

4.11 Northernblot / Kapillarblot

Im Northernblot-Verfahren wird die zu analysierende RNA durch eine denaturierende Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Nach Kontrolle des Gellaufs auf dem Transilluminator erfolgt der Transfer der RNA auf eine Nylonmembran mittels Kapillarblot. Durch Hybridisierung des Filters mit radioaktiv markierten einzelsträngigen DNA-Sonden ist es möglich diejenigen RNA-Transkripte durch Autoradiographie sichtbar zu machen, die komplementär zu der eingesetzten Sonde sind.

4.11.1 Denaturierende Agarosegelelektrophorese von RNA-Molekülen

Um die elektrophoretische Grössenaufftrennung von RNA-Molekülen zu ermöglichen muss die Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen stattfinden, da sonst die Sekundärstrukturen das Laufverhalten beeinflussen. Die Elektrophorese findet in einem Formaldehyd-haltigen Agarosegel (1 % (w/v) Agarose, 5,5 % (v/v) Formaldehyd in 1 x MEN-Puffer, 200 mM MOPS, 50 mM NaAc, 10 mM EDTA, pH 7,0 mit NaOH) statt, wobei 1 x MEN als Laufpuffer dient. Die je 10-20 µg der RNA-Proben werden auf das gleiche Volumen abgeglichen und mit 2,5 x RNA-Probenpuffer versetzt. Die Denaturierung der Proben erfolgt bei 65 °C für 10 min. Bis zum Auftragen der Proben werden diese auf Eis gehalten. Die Elektrophorese erfolgt bei 120 V bis die BPB-Bande 2-3 cm vom unteren Gelrand entfernt ist. Die Kontrolle und Dokumentation der RNA erfolgt am UVTransilluminator mit Hilfe der Geldokumentationsanlage.

4.11.2 Kapillarblot

Mittels Kapillar-Blot wird die durch eine denaturierende Agarosegelelektrophorese aufgetrennte RNA auf eine Nylonmembran transferiert. Dazu werden 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 wird luftblasenfrei mit der Oberseite nach unten auf das Fließpapier gelegt. Die Kanten und Taschen des Gels werden mit Haushaltsfolie abgedeckt. Die Nylonmembran wird luftblasenfrei auf das Gel aufgelegt, mit zwei Lagen Fließpapier und Papiertüchern bedeckt und mit einem Gewicht (ca. 500 g) gleichmäßig beschwert. Der Kapillarblot erfolgt für mindestens 14 h. Die RNA wird durch kurze UV-

Bestrahlung auf dem Transilluminator und durch zweistündige Inkubation bei 80°C auf der Filteroberfläche fixiert.

4.11.3 Herstellen einer radioaktiv markierten DNA-Sonde

Für die Herstellung radioaktiv markierter Hybridisierungssonden wird ein DNA Fragment nach Restriktionsspaltung oder ein PCR-Produkt aus einem Agarosegel eluiert. Die Markierungsreaktion erfolgt nach der Random-Prime-Labeling-Methode nach (Feinberg und Vogelstein, 1983; Feinberg und Vogelstein, 1984), bei der Hexanukleotide zufälliger Sequenz an die Matrizen-DNA binden: Die gebundenen Hexanukleotide dienen dann als Primer für die Neusynthese eines komplementären Stranges durch die Klenow-Polymerase unter Einbau von radioaktiven Nukleotiden. Die verwendete Klenow-Polymerase ist modifiziert, so dass sie keine Exonucleaseaktivität (exo-) mehr besitzt. Die Markierungsreaktion wird mit Hilfe des Megaprime DNA labeling system Kits von Amersham Pharmacia vorgenommen. Die Durchführung erfolgt nach dem Protokoll des Herstellers.

4.11.4 Hybridisierung der Northern Blot Membran

Durch Hybridisierung der Membran mit radioaktiv markierten, einzelsträngigen DNA Sonden lassen sich komplementäre RNA-Transkripte auf der Membran lokalisieren. Die Spezifität, mit der die Sonde an die RNA bindet, ist abhängig von der Salzkonzentration und der Temperatur. Bei hoher Salzkonzentration und niedriger Temperatur ist die Stabilität unspezifischer DNA-RNA-Hybride größer als in Lösungen niedriger Salzkonzentration und höherer Temperatur. Durch die Absenkung der Salzkonzentration in den Waschlösungen erhöht man die Stringenz. 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 Minuten bei 65 °C in einer Hybridisierungslösung (0,5 M Na-Phosphatpuffer, 1 mM EDTA, 7 % SDS) inkubiert.

Die Sonden-DNA wird 10 Minuten bei 100 °C denaturiert und 5 Minuten 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 2x SSC / 0,1% SDS und einmal mit 1x SSC / 0,1% SDS und optional mit 0,5x SSC / 0,1% SDS für 15 – 30 Minuten 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.

4.11.5 Rehybridisierung

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

Zugabe kochendheier 0,1%iger SDS-Lösung für 1 Stunde bei 65 °C gewaschen. Danach war der Filter für eine erneute Hybridisierung einsetzbar.

4.12 Transkriptomanalyse mit „ARIZONA whole genome arrays“

Die für die Transkriptomanalysen verwendeten Microarrays stammen von der Abteilung Pflanzenwissenschaften der Universität Arizona, und werden durch das Spotten des für diesen Zweck von der Firma Operon käuflichen Oligonukleotid-Satzes 'Arabidopsis Genome Oligo Set Version 3.0' auf Glasträger erstellt. Die für die Hybridisierung dieser Microarrays verwendete RNA wird zunächst mit Ambions 'Amino Allyl MessageAmp™ II aRNA Amplification Kit' zu aRNA amplifiziert und dabei indirekt fluoreszenzmarkiert. Die gesamte Analyse wurde im Transkriptomanalyselabor der Humanmedizin Uni Göttingen durchgeführt.

4.12.1 Amplifikation der eingesetzten RNA

Die Amplifikation der RNA wird mit dem Kit der Firma Ambion im Wesentlichen nach Herstellerangaben, jedoch mit kleineren Ansätzen durchgeführt. 2,75 µl RNA (454 ng/µl) wird mit 0,25 µl T7 Oligo(dT) Primer im PCR-tube für 10 Minuten auf 70°C erhitzt, kurz abzentrifugiert, und auf Eis gestellt. Für die reverse Transkription wird ein Mastermix (0,5 µl 10x First strand buffer/1 µl dNTP Mix/0,25 µl RNase Inhibitor/0,25 µl Arrayscript Polymerase pro Ansatz) angesetzt, davon jeweils 2 µl zu den RNA Proben gegeben, durch Pipettieren gemischt und 2 h bei 42°C inkubiert.

Für die Zweitstrang Synthese wird ein Mastermix (15,75 µl RNase-freies Wasser/2,5µl 10x Second strand buffer/1 µl dNTP mix/0,5 µl DNA Polymerase/0,25 µl RNase H pro Ansatz) angesetzt, davon jeweils 20 µl zu den Proben geben, durch Pipettieren gemischt und 2 h bei 16°C inkubiert. Die Proben werden mit 75 µl RNase freiem Wasser aufgefüllt, die Aufreinigung der cDNA fand mit den dafür vorgesehenen Säulen nach Herstellerprotokoll statt. Die Elution der cDNA findet mit zwei mal 10 µl auf 55°C vorgewrtem Wasser statt, und die eluierte cDNA wird in der Vakuumzentrifuge auf ein Volumen von 3,75 µl eingengt.

Für die *in vitro* Transkription wird ein Mastermix (0,75 µl Aminoallyl-UTP/1 µl ATP Lösung/1 µl CTP Lösung/1 µl GTP Lösung/0,5 µl UTP Lösung/1 µl 10x reaction buffer/1 µl T7 Enzym Mix pro Ansatz) angesetzt, davon werden jeweils 6,25 µl zu den Proben geben, durch Pipettieren gemischt und 16 h bei 37°C inkubiert. Die Proben werden mit 90 µl RNase-freiem Wasser aufgefüllt und die aRNA wird mit den dafür vorgesehenen Säulen nach Herstellerprotokoll aufgereinigt. Die Elution der aRNA findet mit zwei mal 50 µl auf 60°C vorgewrtem Wasser statt.

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

4.12.2 Indirekte Markierung der aRNA

Während der folgenden Arbeitsschritte werden die Proben vor Licht geschtzt um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu verhindern. Für die indirekte Markierung werden je 7,5 µg der Aminoallyl-aRNA auf ein Volumen von 14 µl gebracht und mit 2 µl 1 M Na₂CO₃ (pH 9) und 4 µl Cy5 bzw. Cy3 für 1 Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Kopplungsreaktion wird dann durch Zugabe von 35 µl 100 mM Natriumacetat (pH 5,2) gestoppt. Die Proben werden mit 45 µl RNase-freiem Wasser aufgefüllt und die fluoreszenzmarkierte aRNA wird mit den dafür vorgesehenen Säulen nach Herstellerprotokoll aufgereinigt. Die Elution der fluoreszenzmarkierten aRNA findet mit 2 mal 50 µl auf 60°C vorgewrtem Wasser

statt. Anschließend werden am Nanodrop gemessen wie viel pmol Fluorophore pro μl eingebaut werden. Je nach Ausbeute werden für die Hybridisierung Proben mit 150-300 pmol Fluoreszenzfarbstoff eingesetzt, wobei darauf geachtet wird, dass von beiden auf einen Array hybridisierten Proben beide gleichviel picomol Fluoreszenzfarbstoffe enthielten. Die für einen Array verwendeten Volumen Cy3 und Cy5 markierter aRNA werden vereinigt, 1 μl polyA (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) und 1 μl tRNA (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) zugegeben, und das ganze wird in einer Vakuumzentrifuge zur Trockne eingengt.

4.12.3 Hybridisierung der „ARIZONA whole genome arrays“

Vor der Verwendung werden die ARIZONA „whole genome arrays“ „hydratisiert“, das heißt, sie werden dreimal kurz über ein 60°C Wasserbad gehalten, so dass ihre Oberfläche leicht beschlagen. Dabei laufen die aufgrund von Pufferresten hygroskopischen Spots etwas auseinander, werden dadurch größer und lassen sich später besser auswerten. Anschließend werden die Oligonukleotide durch Bestrahlung mit 120 Millijoule UV-Licht kovalent an die Oberfläche des Glasträgers gebunden. Danach werden die Arrays 4 Minuten mit 0,1% SDS, dreimal 2 Minuten mit H₂O (demin) und dann 30 Sekunden in 100% Ethanol gewaschen und anschließend durch Abzentrifugieren oder Abpusten getrocknet.

Die Vorhybridisierungslösung besteht aus 300 μl 20x SSC, 575 μl H₂O, 100 μl 10% BSA und 25 μl 20% SDS. Zur Vorhybridisierung werden 80 μl Vorhybridisierungslösung auf ein Deckglas gegeben, der Array umgedreht an das Deckglas gehalten und mit dem nun durch Adhäsion anhaftenden Deckglas angehoben. Anschließend wird der Array mit Deckglas in die Hybridisierungskassette geschlossen und 1 h bei 42°C inkubiert.

In der Zwischenzeit wird die getrocknete aRNA in 9 μl H₂O resuspendiert und 1 μl 10x fragmentation buffer wird zugegeben. Dann wird 15 min bei 70°C inkubiert und 1 μl fragmentation stop zugegeben. Zu jeder Probe werden 56,4 μl einer Hybridisierungslösung (350 μl Formamid, 210 μl 20x SSC, 70 μl 50X Denhardts, 17,5 μl 20% SDS und 52,5 μl H₂O) gegeben, das ganze gevortext, 5 Minuten auf 95°C erhitzt und 5 Minuten bei 10.000 g abzentrifugiert.

Die vorhybridisierten Glasträger werden mit H₂O gewaschen, und die in der Hybridisierungslösung aufgenommene aRNA wird zwischen den Glasträger und einen darauf platzierten Liftslip laufengelassen. Der Glasträger mit Probe wird in wasserdichte Hybridisierungsgefäße eingeschlossen und anschließend über Nacht bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wird der Glasträger 5 Minuten bei 37°C mit 0,5x SSC + 1% SDS, zweimal 5 Minuten bei RT mit 0,5x SSC + 1% SDS, viermal 5 Minuten bei RT mit 0,5x SSC und 5 Minuten bei RT mit 0,1x SSC gewaschen und anschließend durch Abzentrifugieren oder Abpusten getrocknet.

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

4.13 Proteinbestimmung und Proteinfällung

4.13.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung des Gehalts an löslichem Protein erfolgte nach Bradford (1976). Der bei dieser Methode verwendete Farbstoff Coomassie Brilliantblue G-250 liegt in saurer Lösung in zwei Formen vor, einer blauen und einer orangefarbenen Form.

Proteine binden bevorzugt die blaue Form, wobei ein Komplex entsteht, dessen Extinktionskoeffizient viel höher ist als der des freien Farbstoffs. Der Farbttest wird durch Detergenzien, alkalische Medien und Ampholine gestört. Hochvernetzte Proteine oder Proteine mit niedrigem isoelektrischen Punkt zeigen nur eine geringe Farbreaktion.

50 µl der Probe, die zwischen 5 und 10 µg Protein enthalten sollte, wurde mit 950 µl Farbmix versetzt. Nach 5 min wurde am Photometer (Ultrospec 1100 pro; Fa. Amersham Biosciences) die Extinktion bei 595 nm gemessen. Als Nullwert diente eine Probe mit 50 µl Wasser, die in gleicher Weise behandelt worden war. Zur Kalibrierung wurde eine Eichreihe aus entfettetem BSA hergestellt und anstelle der Probe eingesetzt. Diese Eichreihe war über längere Zeit stabil.

4.13.2 Proteinfällung nach Wessel und Flügge

Die Proteinfällung nach Wessel und Flügge (1984) kann sowohl für lösliche als auch für hydrophobe Proteine in wässrigen Lösungen verwendet werden.

Zu 0,1 ml Proteinprobe wurden 0,4 ml Methanol zugegeben und gemischt. Dazu wurden noch 0,1 ml Chloroform gegeben und ebenfalls gemischt. Zur Phasentrennung wurden 0,3 ml Wasser zugefügt und durch vortexen gut gemischt. Nach einer einminütigen Zentrifugation bei 12.000 Upm und 4°C in einer Eppendorffzentrifuge wurde die obere Phase vorsichtig mit einer Pasteurpipette mit ausgezogener Spitze abgenommen und verworfen (die Proteine befanden sich in der Interphase). Die untere Chloroform-Phase wurde mit 0,3 ml Methanol gemischt und 2 min bei 12.000 Upm und 4°C zentrifugiert. Nun wurde der Überstand abgenommen und das Pellet an der Luft getrocknet.

4.13.3 Proteinfällung mit Aceton

Zu einer wässrigen Proteinlösung wurde das zehnfache Volumen -20°C kaltes Aceton zugegeben, gut gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Probe für 5 min bei 4°C und 10.000 Upm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Nachdem das Pellet an der Luft getrocknet war, wurde es in Probenpuffer (für SDS-PAGE) oder Wasser resuspendiert.

4.14 Western-Blot Analyse

4.14.1 Herstellung denaturierender Gesamtzellextrakte aus Pflanzen

Das Blattgewebe wird unter flüssigem Stickstoff aufgemörsert, 50 - 200 mg des Pulvers im gefrorenen Zustand in ein Eppendorffgefäß eingewogen, in der doppelten Menge (w/v) Harnstoffextraktionspuffer aufgenommen, gevortext und bei 65°C für 10 Minuten inkubiert. Nach 5 Minuten Inkubation werden die Eppendorffgefäße mehrmals invertiert. Anschließend wird der Rohextrakt 10 Minuten bei 13000 rpm und RT zentrifugiert um Zelltrümmer und DNA abzutrennen. 2/3 Volumen des Überstandes werden in ein neues Eppendorffgefäß überführt. Die Proteinextrakte werden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Vor Auftragung in der SDS-PAGE werden sie 5 Minuten bei 65°C inkubiert. Die Proben können direkt auf das Gel appliziert werden.

4.14.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE, (Laemmli, 1970)) dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekularmasse. Die Polyacrylamidmatrix wird durch Polymerisation von Acrylamid mit dem Quervernetzer N,N'-Methylenbisacrylamid (BIS) hergestellt. Die Porengröße im Gel kann durch die Wahl der Acrylamidkonzentration sowie des Verhältnisses Acrylamid/BIS verändert werden. Die Polymerisation wird durch Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) durch Erzeugung freier Radikale gestartet. Als Katalysator wird N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) zugefügt. Es wurde zuerst das Trenngel in die vorbereitete Apparatur gegossen, während des Festwerdens mit Isobutanol überschichtet (ca. 2 ml), nach ca. 30 min, wenn das Trenngel fest geworden ist, konnte das Sammelgel darüber gegossen werden und der Kamm für die Taschen eingeschoben werden. Die Elektrophorese erfolgte in Laufpuffer ca. 30' bei 80 V zum Durchlaufen der Proteine durch das Sammelgel und anschließend bei 120 V bis die BPB-Bande das untere Ende des Gels erreicht hat.

4.14.3 Coomassie-Färbung

Um Proteinbanden in SDS-PAGE-Gelen sichtbar zu machen, werden diese mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 angefärbt. Hierfür wird das Gel 30 Minuten in der Fixierlösung geschwenkt. Nach Verfärbung des Bromphenolblau ins Gelbliche wird das Gel in der Färbelösung 30 bis 60 Minuten inkubiert. Die Entfärbung des Gels erfolgt in dem Entfärbebad unter wiederholtem Wechsel der Lösung für mehrere Stunden. Optional kann der Vorgang durch kurzes Erwärmen in der Mikrowelle beschleunigt werden.

4.14.4 Proteintransfer auf PVDF-Membranen

Der Transfer der im SDS-Gel aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgt mittels der „Semi-Dry-Blotting“-Methode (Kyhse-Anderson, 1984). Dazu werden drei Lagen Fließpapier in Transferpuffer angefeuchtet und auf die Blottingapparatur aufgelegt. Die PVDF Membran wird in Methanol aktiviert, mit Transferpuffer äquilibriert und luftblasenfrei auf die Schicht Fließpapier gelegt. Das PAA-Gel wird auf dem Filter positioniert und mit drei Lagen in Transferpuffer äquilibriertem Fließpapier bedeckt. Der Elektrotransfer läuft für 45 Minuten bei 5 mA/cm² Filterfläche. Nach dem Transfer wird der Filter kurz in TBS gewaschen und zwischen zwei Lagen Fließpapier getrocknet. Die Membran wird vor der Weiterbehandlung wieder mit Methanol aktiviert.

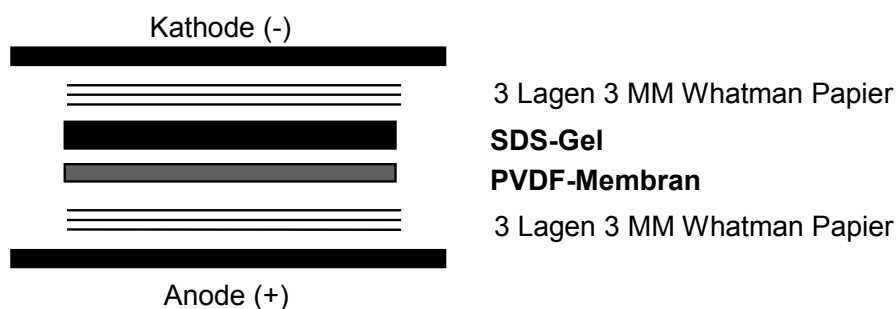


Abbildung 8: Aufbau eines Western-Blot.

4.14.5 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 Peroxidasegekoppelten 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) erfolgt durch 1 Stunde Inkubation mit 5 % Milchpulver in TBST. Danach erfolgt für 2 Stunden die Inkubation mit 5 % Milchpulver in TBST und Primärantikörper. Die Membran wird dreimal 10 Minuten 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 wird wieder entfernt durch 5 x 5 Minuten Waschen mit 1 x TBS. Das ECL-Substratmix wird frisch aus den Lösungen 1 und 2 im Verhältnis 1:1 angesetzt, für eine Membran (9,5 x 6,5 cm) werden 3 ml Substratmix benötigt. Die Membran wird mit der Proteinseite nach oben auf ein Stück Haushaltsfolie gelegt, und mit dem Substratmix 1 Minuten inkubiert. Überschüssiger Substratmix wird abgeschüttet und die Membran in Haushaltsfolie eingeschlagen. Die Detektion der Chemilumineszenzsignale erfolgt durch Exposition eines Röntgenfilms, je nach Signalstärke für 15 s bis 10 min. Der Autoradiographiefilm wird dann für 1-5 Minuten entwickelt, kurz gewässert und 3 Minuten fixiert.

4.15 Einbettung von Proben für Elektronenmikroskopie

Diese Methode wurde von Andrea Olbrich durchgeführt.

Ernte: Waschpuffer wurde in eine Petrischale auf Eis gegeben, von den Blättern wurden Mittelrippe und Rand verworfen, 2x2 mm große Stücke mit scharfer Klinge geschnitten und in Primärfixativ überführt.

Durch Evakuieren und erneut belüften, wurde Austausch und Durchdringen des Primärfixativs ins Gewebe erzielt.

Primärfixativ	4 h bei RT (incl. Evakuieren)	
	ü. N. bei 4 °C	
Waschpuffer	2 x 10 min bei RT	7.00
Sekundärfixativ	4 h bei RT	8.00
Waschpuffer	2 x 10 min bei RT	12.00
H ₂ O bidest.	2 x 10 min bei RT	
Kontrastmittel	4 h bei RT	13.40
H ₂ O bidest.	2 x 10 min bei RT	17.40
25 % Aceton	ü.N. bei RT	18.15
50 % Aceton	45 min bei RT	7.00
75 % Aceton	45 min bei RT	8.00
95 % Aceton	45 min bei RT	9.00
100 % wasserfreies Aceton	2 x 45 min bei RT	10.00

Infiltration erst ab Zugabe von Spurr unter Bewegung auf dem Rotor.

Kunstharzinfiltration und Polymerisation:

25 % (v/v)	Spurr in wasserfreiem Aceton p.a.	45 min bei RT
50 % (v/v)	Spurr in wasserfreiem Aceton p.a.	45 min bei RT
75 % (v/v)	Spurr in wasserfreiem Aceton p.a.	45 min bei RT
100 % (v/v)	Spurr ü. N. bei 4 °C	
100 % (v/v)	Spurr	4 h bei RT

Die Proben werden in Flacheinbettungsformen aus weichem Gummi eingebettet und zur Polymerisation des Harzes für mindestens 24 Stunden in einen 60 °C warmen Trockenschrank gestellt.

4.16 Bestimmung des Chlorophyllgehalts

100 mg Blattmaterial wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. 1 ml Methanol wurden zugegeben und für 30 min bei 60°C inkubiert. Es wurde für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und die Extinktion des Überstandes (evtl. 1:10 verdünnt) im Photometer bei 650 nm und 665 nm gemessen. Berechnung: $E_{650} * 0,025 + E_{665} * 0,005 = \text{mg Chlorophyll pro ml Messlösung}$ mit E=Extinktion

4.17 Stressbedingungen für *A. thaliana*

Um die Pflanzen mit oxidativem Stress zu behandeln, wurde das Herbizid Paraquat verwendet. Von der 10 mM Stammlösung, die bei -80°C gelagert werden konnte, wurden verschiedene Mengen eingesetzt, um die im Ergebnisteil angegebenen Konzentrationen in MS-Medium zu erhalten. Es wurde MS-Medium mit 1x MS-Salzen und ohne Zucker verwendet. Die sterilisierten *A. thaliana* Samen wurden auf den Agarplatten ausgelegt, 2 Tage bei 4°C vernalisiert und für 10 Tage in der Langtag-Klimakammer angezogen. Dann wurden die nicht gekeimten Samen, die grünen Keimlinge und die weißen Keimlinge ausgezählt und als Prozent der grünen Keimlinge im Diagramm aufgetragen.

4.18 Analyse von T-DNA-Insertionsmutanten von *A. thaliana*

Die Salk T-DNA Linien (Alonso et al., 2003) wurden nach Erhalt angezogen und homozygote Mutanten identifiziert, d.h. solche bei denen beide Chromosomen eine T-DNA-Insertion im interessierenden Gen aufweisen. Dafür wurden ein linker genomischer Primer (Primer LP) und ein rechter genomischer Primer (Primer RP) abgeleitet, die auf beiden Seiten der Insertion liegen. Einen Vorschlag für diese Primer konnte auf der Internetseite <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.html> angefordert werden.

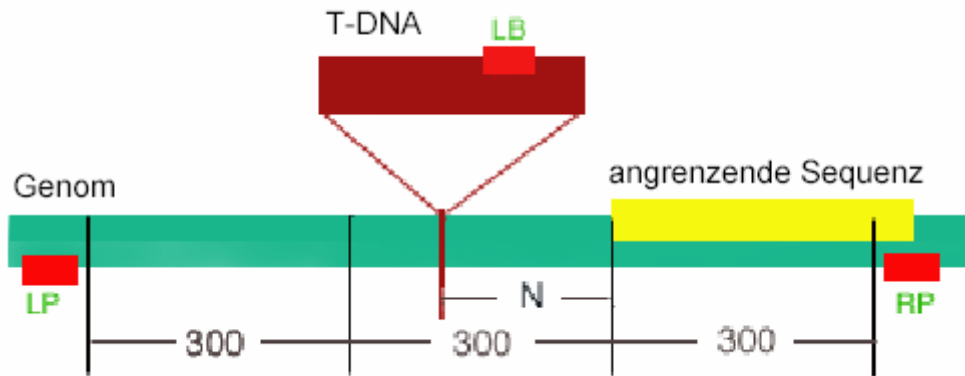


Abbildung 9: Anordnung der T-DNA-Insertion und der Primer bei SALK-Mutanten (aus: <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.html>).

N: Unterschied der eigentlichen Insertionsstelle und der Stelle der angrenzenden Sequenz (0 - 300 Basen), **LB:** "Left border" (linker Rand) Primer der T-DNA-Sequenz

Homozygote Mutanten wurden über PCRs identifiziert. Bei der PCR mit LP und RP sollte bei Wildtyp- und heterozygoten Pflanzen ein PCR-Produkt von ca. 900 bp amplifiziert werden, bei homozygoten dagegen nichts. Bei Verwendung der Primer RP und LB sollte bei homo- und heterozygoten Pflanzen ein PCR-Produkt von $410+N$ bp (110 bp von LB zum linken Rand der T-DNA) amplifiziert werden und bei Wildtyppflanzen nichts.

Das erhaltene PCR-Produkt von homozygoten Pflanzen wurde in pSK-T Easy kloniert und sequenziert.

Homozygote Pflanzen wurden zu weiteren Analysen vermehrt.

4.19 Verwendete Computerprogramme

- VectorNTI 10.1.1 (Invitrogen Corporation) – Bearbeitung von DNA- und Proteinsequenzen
- Geneious v4.7 (Drummond et al., 2009) – Bearbeitung von DNA- und Proteinsequenzen
- Chromas1.55 (Technelysium, 1998) – Analyse von Sequenzierdaten
- Blast (Altschul et al., 1997; Schäffer et al., 2001) – Programme zur Suche von ähnlichen DNA- oder Proteinsequenzen
- EasyGO (Zhou und Su, 2007) – Analyse der Microarraydaten
- ExPASy (Gasteiger et al., 2003) – Proteomic Server zur Analyse von Proteinsequenzen und Strukturen und Server für viele andere nützliche Programme
- Genevestigator (Zimmermann et al., 2004) – Analyse der Microarraydaten
- NetPhos 2.0 (Blom et al., 1999) – Voraussage von eukaryotischen Protein-Phosphorylierungsstellen
- MicrosoftOffice 2003
- PcBAS[®]2.09 (Raytest)
- Tina[®]2.0 (Raytest)
- Wasabi 1.5 (Hamamatsu Photonics) – zur Auswertung der Lumineszenzfotos
- Blattfläche

5 Ergebnisse

5.1 Eine Interaktion von AKR2A und AKR2B mit Gruppe C bZIP-Transkriptionsfaktoren sollte überprüft werden

In Tabak interagieren das Ankyrin-repeat Protein NtANK1 und der bZIP-Transkriptionsfaktor NtBZI-1 miteinander, was in verschiedenen *in vivo* und *in vitro* Systemen gezeigt worden ist (Kuhlmann et al., 2003; Böttner et al., 2009). Im Rahmen dieser Arbeit sollten homologe Proteine aus Arabidopsis auf eine Interaktion getestet werden, wegen der Vorteile, die dieses verbreitete Modellsystem bietet. Microarrays können einfacher durchgeführt werden, da fertige „Chips“ erhältlich sind und T-DNA-Insertionsmutanten stehen zur Verfügung, die komplementiert werden können, was bei RNAi-Pflanzen schwieriger ist.

5.1.1 In zwei verschiedenen Two-Hybrid-Systemen wurde die Interaktion zwischen AKR2A/B und Gruppe C-bZIP-Faktoren getestet

Dazu wurde ein Y2H-Experiment durchgeführt, das ein klassisches System zur Analyse von *in vivo* Protein-Protein Interaktionen ist. Es basiert auf dem modularen Aufbau des Transkriptionsfaktors GAL4 aus einer DNA-Bindedomäne (BD) und einer Aktivierungsdomäne (AD) (Brent und Ptashne, 1985; Ma und Ptashne, 1987). Die GAL4-BD interagiert mit der GAL4-UAS („upstream activating sequence“), so dass der Transkriptionsfaktor an dieser Stelle an die DNA bindet, die GAL4-AD wird benötigt, um die Transkription durch Interaktion mit dem RNA-Polymerase II Komplex einzuleiten (Giniger et al., 1985).

In Y2H Tests untersucht man die Interaktion zwischen zwei Proteinen, indem man das eine Protein an die GAL4-BD und den putativen Partner an die GAL4-AD fusioniert. Wenn die Proteine miteinander interagieren, wird der GAL4 Transkriptionsfaktor rekonstituiert und aktiviert die Expression eines *lacZ*-Reportergens, das unter der Kontrolle eines GAL4-UAS abhängigen Promotors steht (Fields und Song, 1989).

Um quantitative Werte für die Interaktion zu erhalten, wurden oNPG-Tests mit jeweils drei unabhängigen Kolonien durchgeführt. Der oNPG-Test erlaubt eine quantitative Bestimmung der Aktivität der vom *lacZ*-Reportergen kodierten β -Galaktosidase, was

ein Maß für Protein-Protein Interaktionen ist. Als Negativ-Kontrolle wurden der leere BD-Vektor pDEST32 und der leere AD-Vektor pDEST22 verwendet (Abb. 10).

Einige Proteine haben zu starke Auto-Aktivierungseigenschaften, um sinnvoll als BD-Fusion verwendet zu werden. Daher wurden die Ankyrin-repeat Proteine AKR2A und B aus Arabidopsis sowie NtANK1 aus Tabak nur als AD-Fusionen verwendet. Von bZIP9 und NtBZI-1 lagen Deletionsderivate vor, bZIP9 Δ N und NtBZI-1 Δ N, die reduzierte Aktivierungseigenschaften zeigen (Kuhlmann et al., 2003; Ehlert et al., 2006). Für bZIP10 wurde analog hierzu ein bZIP10 Δ N-Derivat hergestellt, bei dem die N-terminalen 80 Aminosäuren deletiert worden sind. Die Aktivierungseigenschaft von bZIP10 konnte so bis auf den Wert der Leervektoren reduziert werden (Abb. 10). Im Y2H-Ansatz wurden die Kombinationen aus dem Tabak-Protein NtBZI-1 Δ N als BD-Fusion zusammen mit NtANK1 aus Tabak und AKR2A/B aus Arabidopsis als AD-Fusionen getestet. Die Interaktion von NtANK1 und NtBZI-1 Δ N ist deutlich zu erkennen, während die Werte von AKR2A und B mit NtBZI-1 nur etwa das 0,5- bzw. 0,25-fache betragen (Abb. 10). Da sie noch deutlich über dem Hintergrund des Leervektors liegen, ist von einer schwachen Interaktion bei der Kombination dieser Proteine auszugehen. Desweiteren wurden die bZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppe C aus Arabidopsis als BD-Fusionen eingesetzt und mit AKR2A und B als AD-Fusionen kombiniert. Bei diesen Kombinationen zeigte sich keine Interaktion, die Zugabe von AKR2A oder AKR2B führte in keinem Fall zu einer Erhöhung der Reporteraktivierung gegenüber dem AD-Leervektor (Abb. 10). Die Kombination des Tabak-Proteins NtANK1 mit den Arabidopsis bZIP-Proteinen ergab ebenfalls keine Interaktion (Abb. 33 im Anhang).

Die Interaktion von AKR2A/B und den Gruppe C bZIPs aus Arabidopsis wurde ebenfalls im „Protoplasten-Two-Hybrid“ (P2H)-System getestet, welches analog zum Y2H mit Gal4-BD- und AD-Fusionen durchgeführt wird (Ehlert et al., 2006). In Arabidopsis-Protoplasten konnte jedoch auch keine Interaktion gefunden werden (Abb. 34 im Anhang). Tabak-Protoplasten wurden ebenfalls getestet, weil es einen Kofaktor geben könnte, der für die Interaktion nötig ist, in Arabidopsis aber evtl. fehlt (Abb. 35 im Anhang). Da hier auch keine Interaktion detektiert wurde, ist davon auszugehen, dass die Arabidopsis Gruppe C bZIP-Proteine nicht mit AKR2A und B interagieren.

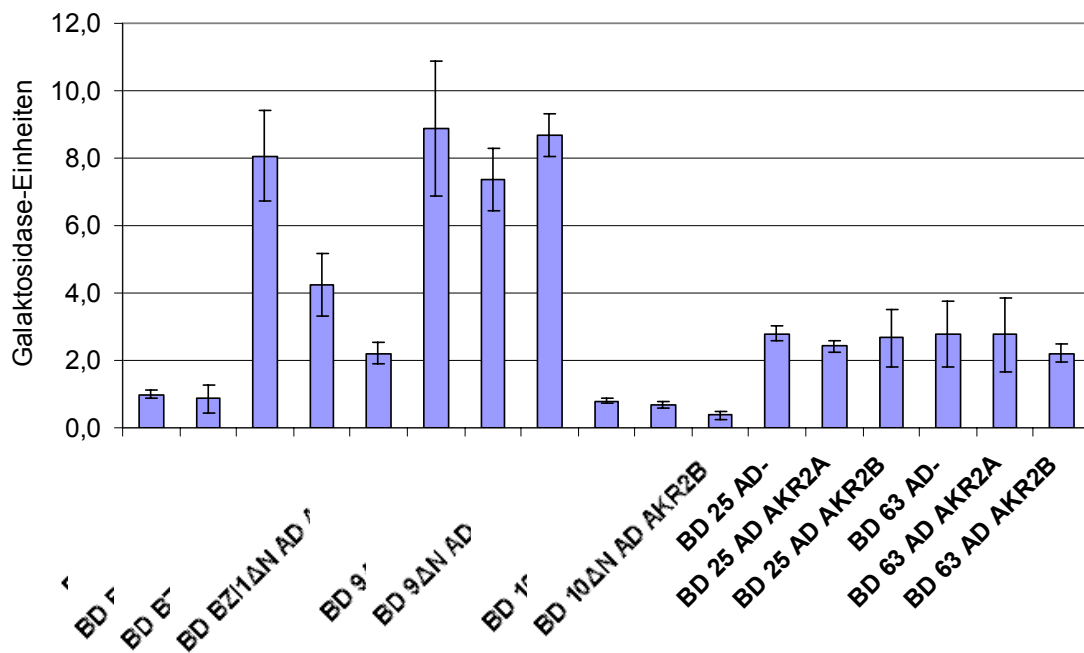


Abbildung 10: oNPG-Test verschiedener Protein-Protein-Interaktionen im Y2H-System. Gal4-Bindedomäne (BD)- und Gal4-Aktivierungsdomäne (AD)-Fusionen wurden verwendet, mit pDEST22 (AD) und pDEST32 (BD) als Ausgangsvektoren. -: Leervektoren als Kontrollen, BZ11ΔN und ANK1: Proteine aus Tabak, 9ΔN, 10ΔN, 25, 63: bZIP-Faktoren aus Arabidopsis. Der Mittelwert wurde jeweils aus den Ergebnissen von 3 unabhängigen Kolonien gebildet.

5.1.2 Test auf Interaktion mit „bimolecular fluorescence complementation“ (BiFC)

Für „bimolecular fluorescence complementation“ (BiFC)-Analysen wurden im Rahmen dieser Arbeit Gateway-kompatible Vektoren erstellt. Als Grundlage dienten die Vektoren pSPYNE-35S und pSPYCE-35S („split YFP N-terminal/C-terminal fragment expression“; YFP: „yellow fluorescent protein“; Walter et al., 2004). Mithilfe dieser Vektoren können zu untersuchende Proteine entweder an die N-terminalen 155 Aminosäuren (YFP_N) oder an die C-terminalen 86 Aminosäuren (YFP_C) des YFP-Proteins fusioniert werden (Hu et al., 2002). Die Fusionsproteine enthalten außerdem einen c-myc- (pSPYNE-35S) oder einen HA- (pSPYCE-35S) Anhang, mit dem die Proteine im Western-Blot detektiert werden können. Wenn die zu untersuchenden Proteine miteinander interagieren, wird das YFP-Protein rekonstituiert und die Fluoreszenz ist im Mikroskop detektierbar. Von den Vektoren wurde jeweils der Abschnitt mit YFP_{N/C} und c-myc-/HA-Anhang amplifiziert und so in den binären Gateway-Destination-Vektor pE inseriert, dass Fusionsproteine mit YFP_{N/C} am N-Terminus entstehen (Abb. 11; Abb. 37 im Anhang). Die Vektoren

wurden pE-SPYNE-GW und pE-SPYCE-GW benannt, sowie die Leerkontrollen, in denen ein Teil der Gateway-Kassette mit dem *ccdB*-Gen entfernt wurde: pE-SPYNE(-) und pE-SPYCE (-) (Abb. 37 im Anhang).

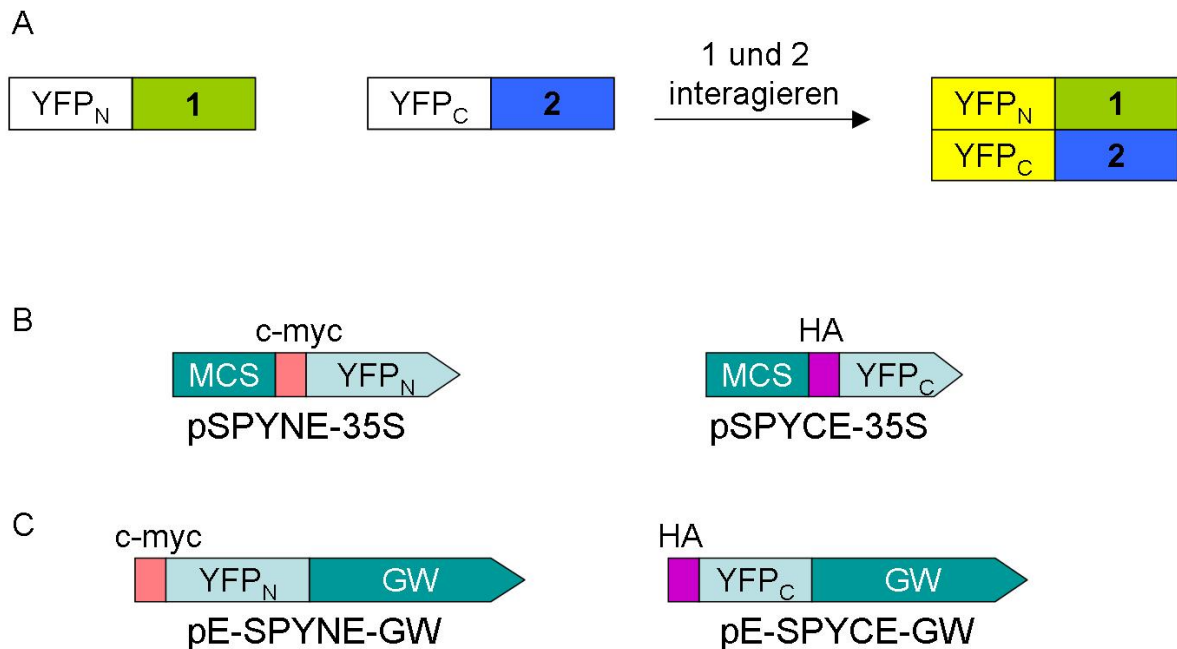


Abbildung 11: Schematische Übersicht über die Funktionsweise und die Vektoren des BiFC. **A:** Die synthetisierten Fusionsproteine mit 1 und 2 als zu untersuchende Proteine. Gelb eingefärbt ist das rekonstituierte YFP mit detektierbarer Fluoreszenz. **B:** Die vorliegenden Vektoren pSPYNE-35S und pSPYCE-35S, MCS: multiple cloning site. **C:** Die in dieser Arbeit erstellten Vektoren pE-SPYNE-GW und pE-SPYCE-GW, GW: Gateway, c-myc und HA: Anhang zur Detektion im Western-Blot.

Zum Test der Vektoren wurde die gut charakterisierte Interaktion zwischen bZIP10 und bZIP53 reproduziert (Weltmeier et al., 2006). Es wurden Agrobakterien mit den pE-SPYNE/SPYCE-Vektoren transformiert um verschiedene Kombinationen in *Nicotiana benthamiana* Blättern transient zu exprimieren. In Abb. 12 A ist bei der Koexpression der Fusionsproteine YFP_N-bZIP10 und YFP_C-bZIP53 die Interaktion in den Kernen der Epidermiszellen zu sehen. Bei Koexpression von YFP_N und YFP_C-bZIP53 als Kontrolle ist keine Fluoreszenz detektierbar. Die Interaktion von YFP_N-AKR2A und YFP_C-bZIP10 sowie YFP_N-bZIP10 und YFP_C-AKR2A konnte nicht nachgewiesen werden, da keine Fluoreszenz detektierbar war, obwohl die Proteine exprimiert wurden (Abb. 12 B und C). Als einziges Fusionsprotein konnte im Western Blot YFP_C-bZIP53 nicht nachgewiesen werden, da die Bande auf gleicher Höhe mit einer Hintergrundbande des HA-Antikörpers ist. YFP_N-bZIP53, YFP_N-AKR2A und YFP_N-bZIP10 sind mit dem c-myc-Antikörper gut nachweisbar, genauso wie YFP_C-

AKR2A und YFP_C-bZIP10 mit dem HA-Antikörper (Abb. 12 C). Deshalb und aufgrund der sichtbaren Interaktion ist davon auszugehen, dass YFP_C-bZIP53 ebenfalls in ausreichender Menge exprimiert wird.

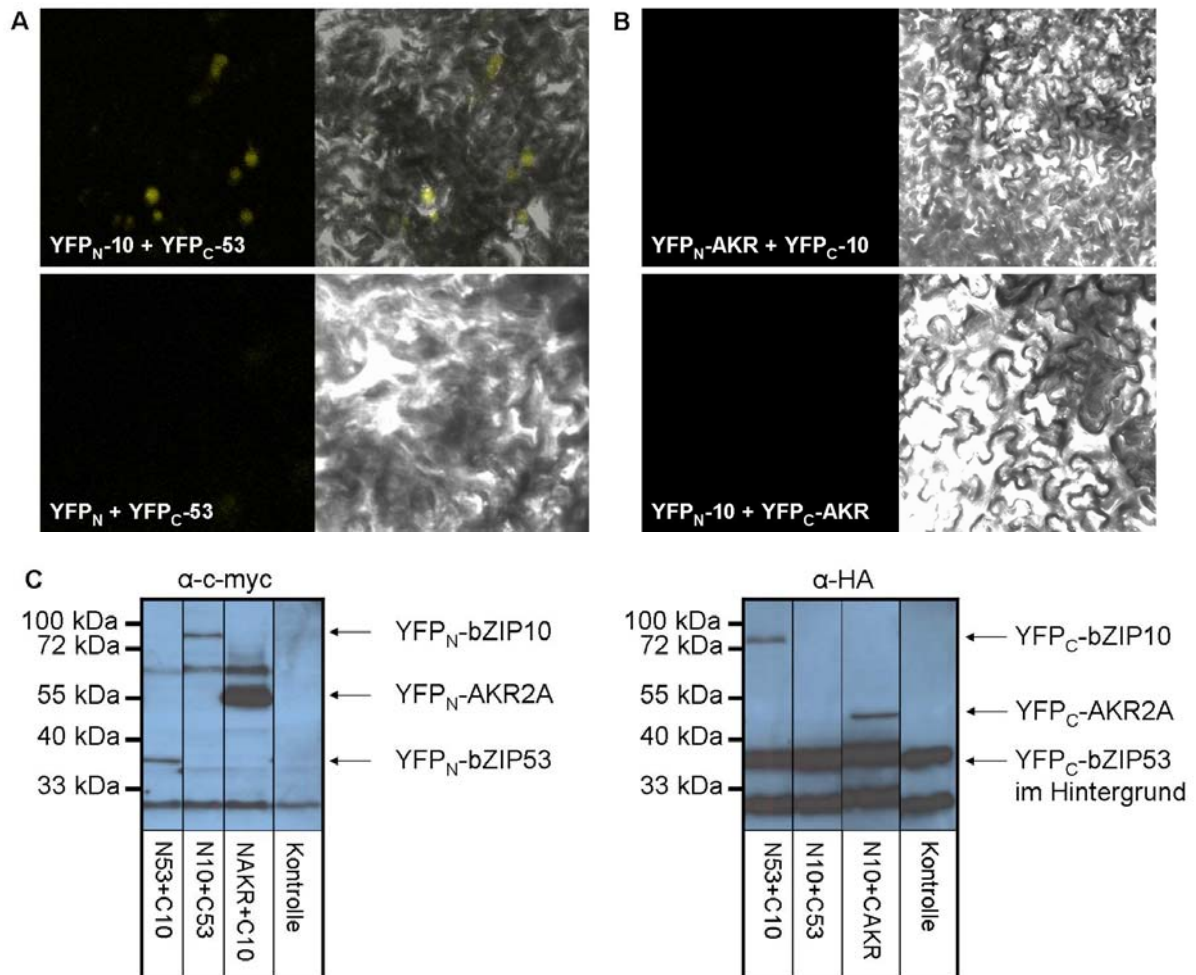


Abbildung 12: BiFC-Analysen in transient transformierten *N. benthamiana* Blättern. **A:** Koexpression der Fusionsproteine YFP_N-bZIP10 und YFP_C-bZIP53 (oben), die Fluoreszenz ist in den Kernen zu sehen (links), rechts ist die Überlagerung mit dem Durchlichtbild zu sehen. Bei der Kontrolle YFP_N (unfusioniert) und YFP_C-bZIP53 ist keine Fluoreszenz detektierbar (unten links); Durchlicht (rechts). **B:** Koexpression der Fusionsproteine YFP_N-AKR2A und YFP_C-bZIP10 (oben), sowie YFP_N-bZIP10 und YFP_C-AKR2A (unten): es ist keine Fluoreszenz zu sehen; Durchlichtbilder rechts. **C:** Western Blot mit Proben der infiltrierten Blätter und den Antikörpern gegen c-myc und HA: N53+C10: YFP_N-bZIP53 und YFP_C-bZIP10; N10+C53: YFP_N-bZIP10 und YFP_C-bZIP53; NAKR+C10: YFP_N-AKR2A und YFP_C-bZIP10; Kontrolle: Transformation mit leerem Vektor. Die detektierbaren Fusionsproteine sind markiert, nur YFP_C-bZIP53 läuft auf Höhe einer Hintergrundbande und ist deshalb nicht zu sehen. YFP_N: die N-terminalen 155 Aminosäuren des YFP-Proteins; YFP_C: die C-terminalen 86 Aminosäuren des YFP-Proteins

5.1.3 Die Zugabe von AKR2A oder AKR2B im Protoplasten-System steigert bZIP-Heterodimer-induzierte Reporter-genaktivierung

In Alonso et al. (2009) ist beschrieben, dass im Protoplasten-System die durch das Heterodimer bZIP10/bZIP53 induzierte Reporter-gen-Aktivierung durch Zugabe eines dritten Proteins (ABI3) erhöht werden kann. Analog zu diesem Ansatz wurden ebenfalls im Protoplasten-System zum bZIP10/bZIP53 Heterodimer AKR2A und B zugegeben (Abb. 13). Dabei lag bZIP53 als BD-Fusion vor, bZIP10 als AD-Fusion und AKR2A/B als HA-Fusion. Es ist eine deutliche Steigerung der Aktivierung des Heterodimers um das 1,5fache bei Zugabe von AKR2A oder AKR2B zu sehen. Diese drei Proteine bilden also möglicherweise einen trimeren Komplex auf der DNA, dabei würde AKR2A/B mit dem Heterodimer aus bZIP10 und bZIP53 interagieren. Jedoch konnte dieser mutmaßliche Komplex weder in Hefe noch im BiFC nachgewiesen werden (Abb. 36 im Anhang).

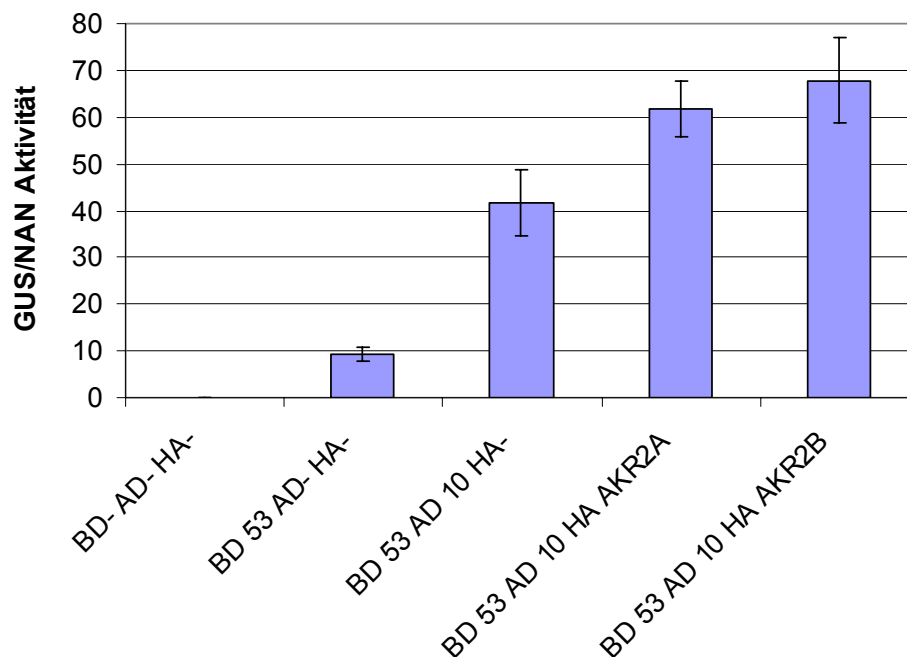


Abbildung 13: Steigerung der Reporter-genaktivierung des Heterodimers bZIP10/bZIP53 durch die Zugabe von AKR2A/B im Protoplasten-System. BD: GAL-4 Bindedomäne; AD: GAL-4 Aktivierungsdomäne, -: Leervektoren als Kontrolle. In den Ansätzen wurden 9 µg GAL4-UAS4:GUS und 3 µg Pro_{35S}:NAN als Reporterplasmide sowie 5 µg der Plasmide mit bZIP53 und bZIP10 und 9,3 µg der Plasmide mit AKR2A und B eingesetzt. Die Standardabweichungen beziehen sich auf 2 unabhängige Transformationen. Bei Einsetzen von gleichen Mengen DNA aller drei Plasmide konnte nur eine geringere Steigerung erzielt werden als in diesem Experiment.

5.2 Lokalisation von YFP-AKR2A/AKR2B

5.2.1 AKR2A und AKR2B sind im Cytoplasma lokalisiert

Zur Analyse eines Proteins ist auch die zelluläre Lokalisation wichtig, denn daraus ergeben sich potentielle Funktionsbereiche. Sowohl für NtANK1 aus Tabak, als auch für AKR2A aus Arabidopsis wurde eine cytosolische Lokalisation festgestellt, die hier für AKR2A und AKR2B reproduziert werden konnte (Abb. 14; Kuhlmann et al., 2003; Bae et al., 2008). Dazu wurden Arabidopsis-Protoplasten transient mit den Fusionsproteinen YFP-AKR2A/B und ARR2-RFP (Arabidopsis response regulator 2 – red fluorescent protein als Kernkontrolle, Hass et al., 2004) kotransformiert. Das Fluoreszenzsignal von YFP-AKR2A/B ist nur im Cytoplasma, nicht aber im Kern zu sehen, die Proteine befinden sich also nur im Cytoplasma. In den Überlagerungsbildern ist deshalb der Kern rot eingefärbt, wie die Kernkontrolle.

Zusätzlich wurden *N. benthamiana* Epidermiszellen durch Infiltration mit transformierten *A. tumefaciens* transient transformiert. Die Fluoreszenz der YFP-AKR2A/B Fusionsproteine ist ebenfalls im Cytoplasma und nicht im Kern zu sehen (Abb. 14 B, Pfeile deuten auf die ausgesparten Kerne).

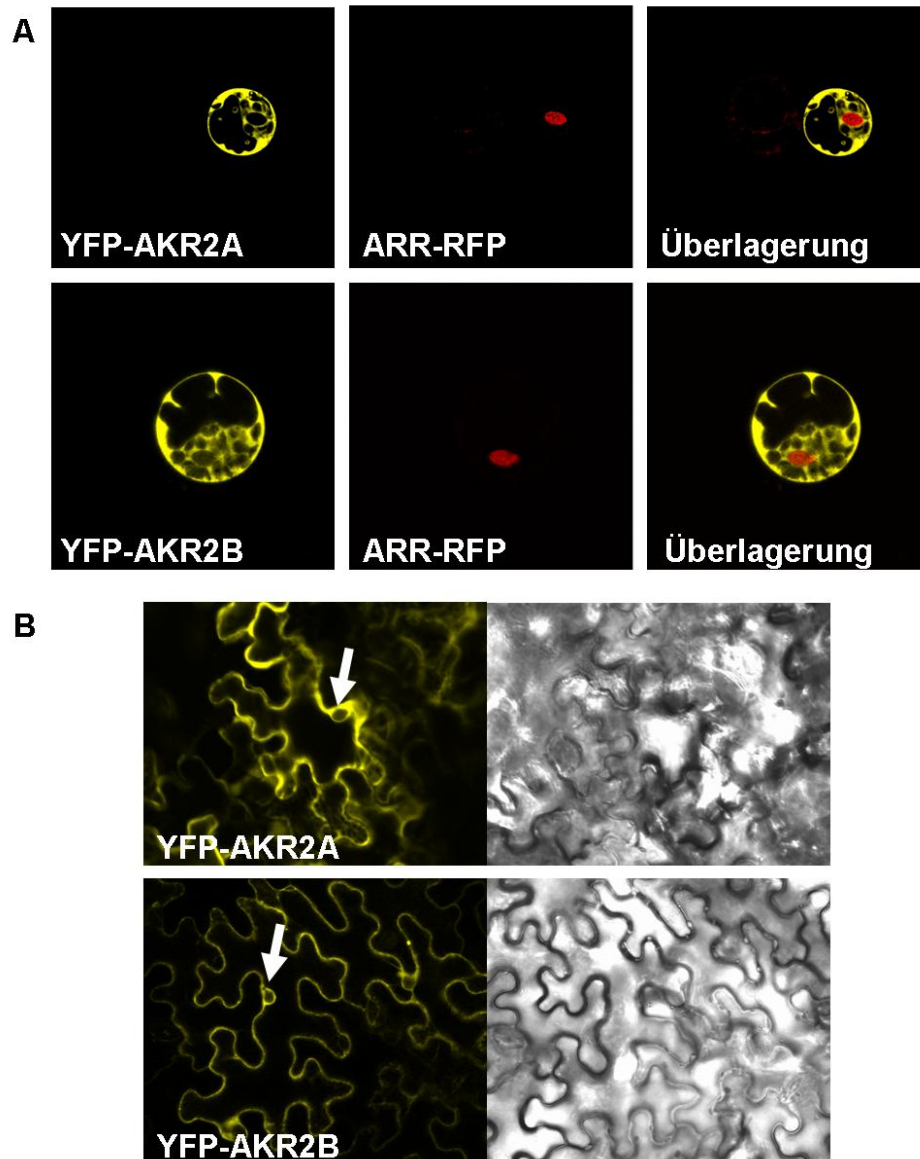


Abbildung 14: Zelluläre Lokalisation von AKR2A/B. **A:** Arabidopsis-Protoplasten wurden mit YFP-AKR2A/B und ARR2-RFP kotransformiert und die Fluoreszenz im konfokalen Mikroskop detektiert. YFP-Fluoreszenz ist im Cytoplasma zu sehen und nicht im Kern, die Fluoreszenz der Kernkontrolle ARR-RFP ist nur im Kern zu sehen. 1. Spalte: YFP-Kanal, 2. Spalte: RFP-Kanal, 3. Spalte: Überlagerung. **B:** *N. benthamiana* Epidermiszellen wurden durch Infiltration mit transformierten *A. tumefaciens* Zellen transformiert. Die YFP-Fluoreszenz von YFP-AKR2A/B ist im Cytoplasma zu sehen, nicht aber im Kern. Kerne sind mit Pfeilen markiert. Rechts: Durchlichtbilder der Epidermiszellen.

5.2.2 Nach pharmakologischer Inhibierung des Kernexports sind AKR2A und AKR2B auch im Kern lokalisiert

In Böttner et al. (2009) wird gezeigt, dass NtANK1 aus Tabak unter bestimmten Bedingungen im Kern akkumuliert. Dazu gehört die Hemmung des Kernexports durch den Inhibitor LMB (Haasen et al., 1999). LMB inhibiert die Interaktion von Exportin 1 (XPO1) aus Arabidopsis mit der Leucin-reichen NES ("nuclear export

sequence") in Proteinen, die aus dem Kern exportiert werden sollen. Sowohl AKR2A als auch AKR2B besitzen eine solche putative NES, wie der Vergleich mit NtANK1 aus Tabak, RanBP1a und c und der in Haasen et al. (1999) postulierten NES zeigt (Abb. 15; Böttner et al., 2009; Haasen et al., 1999).

AKR2A	(325)	KLNSQ LEVVKLLEK DAFL
AKR2B	(327)	RLNNQ LDVVKLLEK DAFL
ANK1	(333)	KLNNQ QEVVKLLEK DVFL
RanBP1a	(171)	DTAG LLEKLTVEET KTEE
RanBP1c	(170)	EAAG LIENLSVEENI SEE
NES		LxxxLxxLxL

Abbildung 15: Vergleich der Aminosäuresequenzen der putativen NES am C-Terminus der Proteine. AKR2A und B aus Arabidopsis, NtANK1 aus Tabak (Böttner et al., 2009), RanBP1a und c aus Arabidopsis und NES nach Haasen et al. (1999). Konservierte Aminosäuren sind fett gedruckt.

Zur LMB-Behandlung wurden Arabidopsis Protoplasten mit YFP-AKR2A/B und ARR2-RFP kotransformiert und 0,5 - 4 Stunden vor der Betrachtung im Mikroskop wurde das LMB (2 μ M) hinzugegeben. Dies führte in ca. 25% der Fälle zu einer deutlichen Akkumulation der Ankyrin-repeat Proteine im Kern (Abb. 16). In transformierten, aber nicht mit LMB behandelten Zellen war eine Kernlokalisierung nie detektierbar.

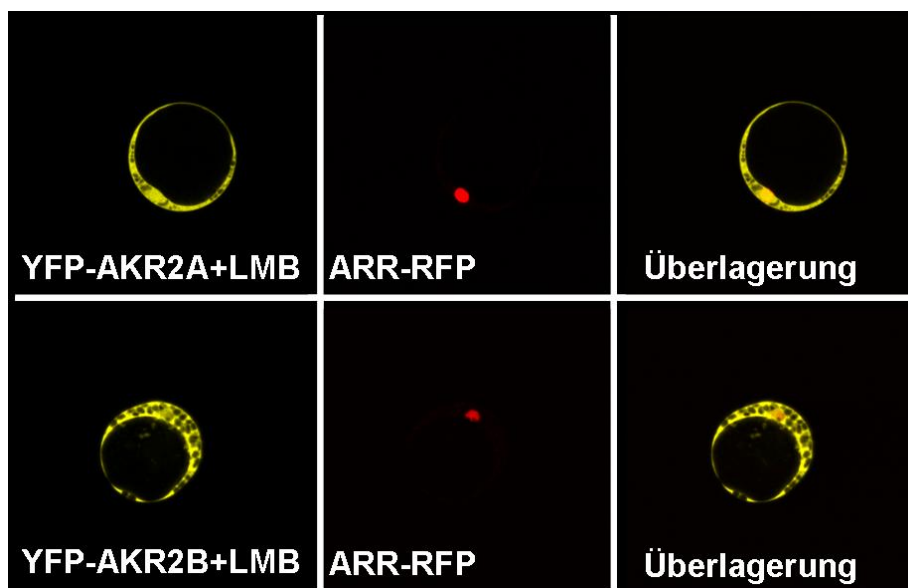


Abbildung 16: Zelluläre Lokalisation von AKR2A/B nach LMB-Behandlung. Arabidopsis-Protoplasten wurden mit YFP-AKR2A/B und ARR2-RFP kotransformiert, 0,5 – 4 Stunden mit 2 μ M LMB inkubiert und die Fluoreszenz im konfokalen Mikroskop detektiert. YFP-Fluoreszenz ist im Cytoplasma und im Kern zu sehen, die Fluoreszenz der Kernkontrolle ARR-RFP ist nur im Kern zu sehen. 1. Spalte: YFP-Kanal, 2. Spalte: RFP-Kanal, 3. Spalte: Überlagerung

5.2.3 Mutation der putativen NES von AKR2A und AKR2B führt ebenfalls zur Kernlokalisierung

Um die Funktionalität der NES zu überprüfen wurden in AKR2A und B die vier konservierten, hydrophoben Aminosäuren mutiert und durch Alanin ersetzt (Abb. 17; Böttner et al., 2009).

AKR2A	(325)	KLNSQLEVVKLEKDAFL
NES _{mut}		A A A A
AKR2B	(327)	RLNNQLDVKLEKDAFL
NES _{mut}		A A A A
NES		LxxxLxxLxL

Abbildung 17: Übersicht über die mutierten Aminosäuren, um die Funktionalität der NES zu überprüfen. Alle 4 konservierten Aminosäuren wurden durch Alanin ersetzt.

In transformierten Arabidopsis-Protoplasten führte die Mutation der NES zur Lokalisation der Proteine im Kern und im Cytoplasma in ca. 25% der Fälle, ähnlich wie nach der LMB-Behandlung (Abb. 18). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass AKR2A und B eine funktionelle NES besitzen, die dafür sorgt, dass die Proteine sich unter normalen Bedingungen nur im Cytoplasma befinden und keine Akkumulation im Kern stattfindet. Nur unter Bedingungen, in denen die NES außer Funktion ist, akkumulieren AKR2A/B auch im Kern.

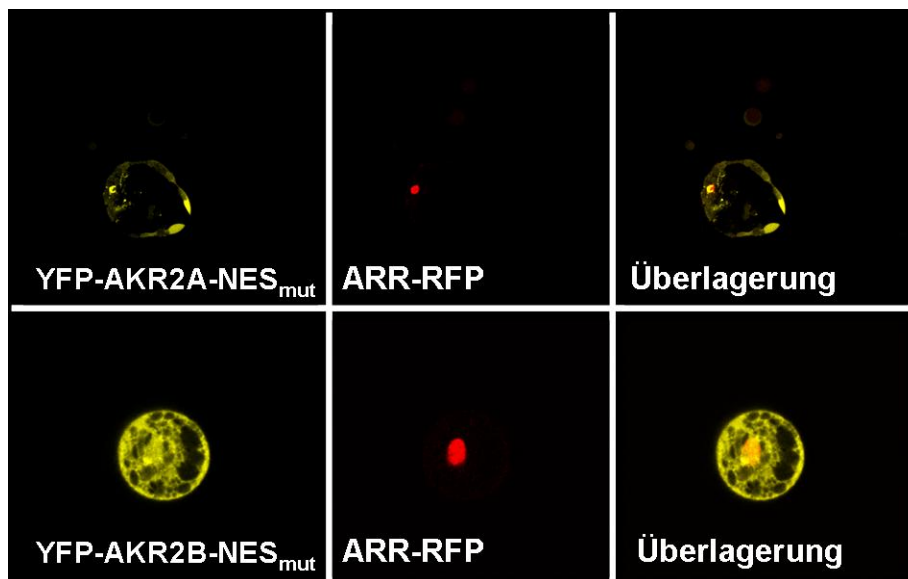


Abbildung 18: Zelluläre Lokalisation von AKR2A/B-NES_{mut}. Arabidopsis-Protoplasten wurden mit YFP-AKR2A/B-NES_{mut} und ARR2-RFP kotransformiert und die Fluoreszenz im konfokalen Mikroskop detektiert. YFP-Fluoreszenz ist im Cytoplasma und im Kern zu sehen, die Fluoreszenz der Kernkontrolle ARR-RFP ist nur im Kern zu sehen. 1. Spalte: YFP-Kanal, 2. Spalte: RFP-Kanal, 3. Spalte: Überlagerung

5.3 Erzeugung von transgenen Pflanzen zur funktionalen Analyse von AKR2A und AKR2B

Zur Analyse von Proteinfunktionen stehen mehrere Methoden zur Verfügung, dazu gehört auch die Analyse von transgenen Pflanzen mit erhöhter oder reduzierter Transkriptmenge des zu untersuchenden Proteins. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit Pro_{35S}:AKR2A- und Pro_{35S}:AKR2B- (Überexpressions-) Pflanzen und AKR2-RNAi-Pflanzen erzeugt.

5.3.1 Erzeugung von Pro_{35S}:AKR2A und Pro_{35S}:AKR2B Pflanzen

Zur Erzeugung von Überexpressionspflanzen wurden in den Gateway-Expressionsvektor pAlligator2 die Gene *AKR2A* und *B* inseriert (Bensmihen et al., 2004). Die zu übertragende T-DNA in diesem Vektor enthält neben der Gateway-Kassette mit dem 35S-Promotor zur Überexpression auch das *GFP*-Gen (grün fluoreszierendes Protein) unter Kontrolle eines Samen-spezifischen Promotors. Dies führt dazu, dass die nach der „floral dip“-Transformation erhaltenen Arabidopsis-Samen unter einem Fluoreszenz-Mikroskop selektioniert werden konnten, so dass nur grün fluoreszierende Samen, die die T-DNA enthielten, zur weiteren Verwendung ausgelegt wurden. Mit Blättern dieser Pflanzen wurde ein Western-Blot mit einem Antikörper gegen AKR2A durchgeführt, um zu überprüfen welche Pflanzen eine starke Überexpression zeigen. Der Antikörper erkennt sowohl AKR2A als auch AKR2B aufgrund der hohen Sequenzidentität. Das Signal der endogenen Proteine entspricht einem Molekulargewicht von ca. 37 kDa, die überexprimierten Proteine sind Fusionsproteine mit HA-Anhang, weshalb deren Signal einem Molekulargewicht von ca. 43 kDa entspricht (Abb. 19). Trotz der deutlichen Überexpression unterschieden sich die Pflanzen phänotypisch nicht vom Wildtyp.

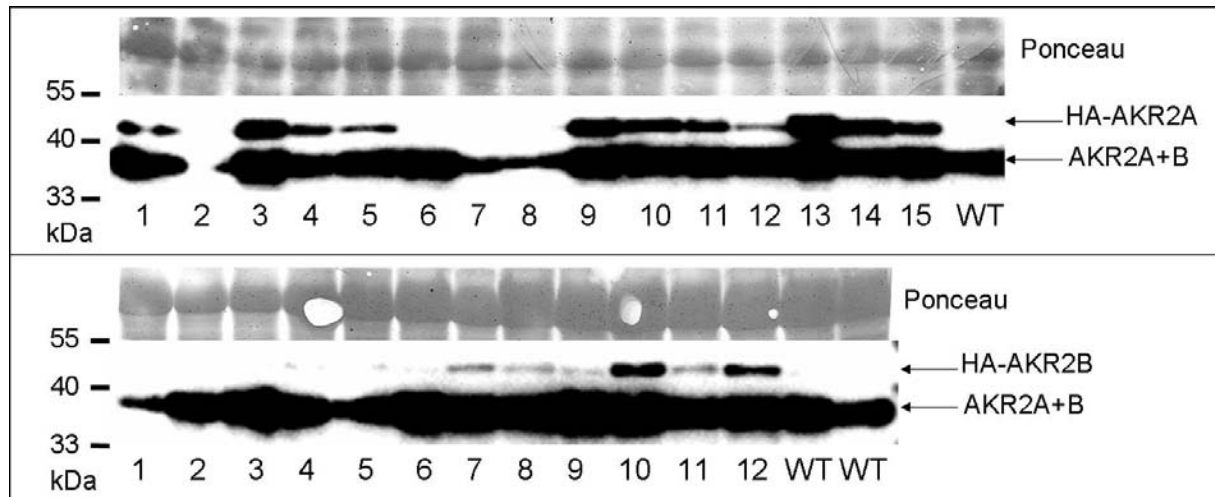


Abbildung 19: Western Blot von Pro_{35S}:AKR2A (oben) und Pro_{35S}:AKR2B (unten) Pflanzen der F₁-Generation mit dem α -AKR2A-Antikörper. AKR2A + B: Signal der endogenen Proteine; HA-AKR2A bzw. B: Signale des Fusionsproteins mit HA-Anhang in überexprimierenden Pflanzen. Ponceau: Färbung aller Proteine auf der Membran zur Ladungskontrolle.

5.3.2 Identifizierung von *akr2b* Mutanten

In der öffentlichen Datenbank des SIGnAL (Salk Institute Genomic Analysis Laboratory) konnte nach T-DNA-Insertionsmutanten recherchiert werden, die dann auf reduzierte Transkriptmenge und evtl. Phänotypen untersucht werden konnten. Es standen T-DNA-Insertionsmutanten der Linie SALK_039330 zu Verfügung, bei der die Insertion im 7. (vorletzten) Exon von *AKR2B* liegt. Durch PCR auf genomische DNA konnten die Pflanzen auf Homozygotie überprüft werden (Abb. 20). Es wurden 8 Pflanzen getestet, bei 5 davon konnte durch eine Bande mit den Primern LBa1 und pHOS6 die Insertion der T-DNA bestätigt werden. Bei diesen 5 Pflanzen fehlt die Bande in der zweiten PCR (pHOS2 und pHOS6), sie sind also homozygot (Abb. 20 A). In der Übersicht (Abb. 20 B) ist zu erkennen, wo die Primer binden im Verhältnis zum Insertionsort der T-DNA. Bei Mutanten mit Insertion entsteht kein PCR-Produkt mit den Primern pHOS2 und pHOS6, weil diese dann zu weit auseinander liegen. Andererseits entsteht kein PCR-Produkt mit LBa1 und pHOS6, wenn die Insertion fehlt (z.B. im Wildtyp).

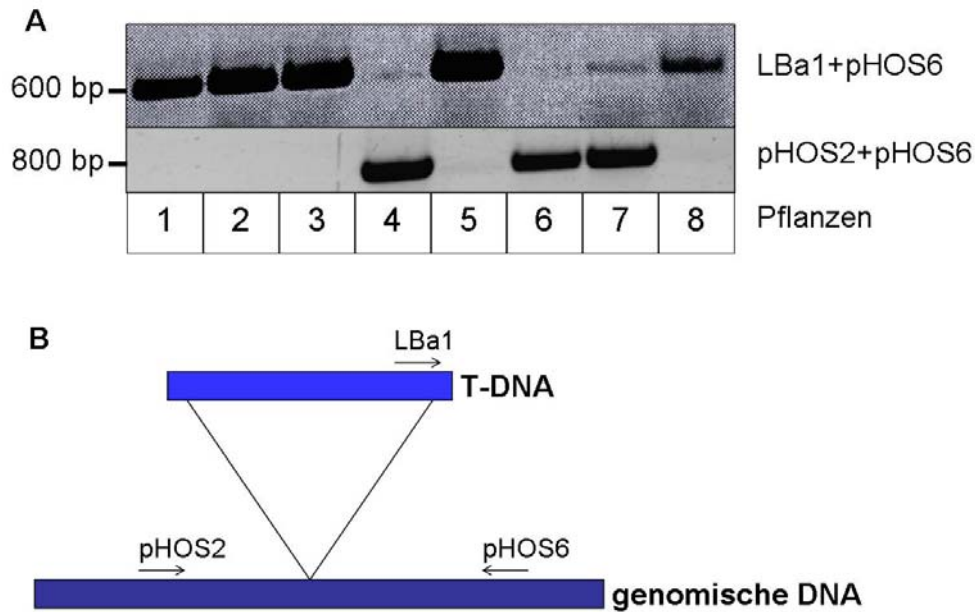


Abbildung 20: Test der SALK_039330-Mutanten auf Homozygotie bezüglich der T-DNA-Insertion. **A:** Gelbild der PCRs auf genomische DNA von 8 verschiedenen SALK_039330-Pflanzen mit den angegebenen Primern. **B:** Schema der T-DNA-Insertion mit den zugehörigen und in (A) verwendeten Primern. pHOS2: linker genomischer Primer; pHOS6: rechter genomischer Primer; LbA1: „left border“ Primer der T-DNA

Die *akr2b*-Mutante wurde im Northern Blot untersucht, ob die Transkriptmenge von *AKR2B* reduziert ist (Abb. 21). Die Nachkommen von zwei verschiedenen Pflanzen (2 und 5) zeigen keine RNA für *AKR2B*, wohingegen beim Wildtyp eine Bande zu sehen ist und in einer Pro_{35S}:*AKR2B* Linie ein stärkeres Signal zu sehen ist. Die Signale für *AKR2A* sind in allen Pflanzen gleich. Die Mutante ist also ein *akr2b*-knock-out, zeigt aber keinen veränderten Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp.

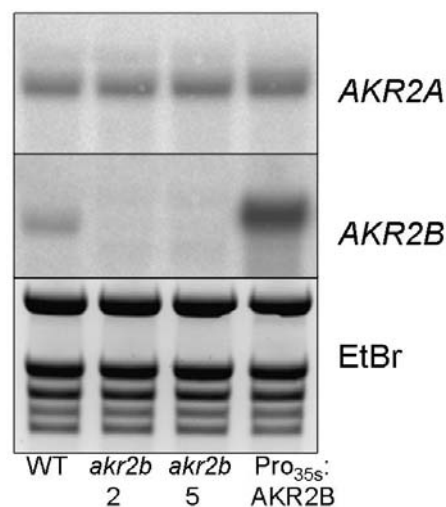


Abbildung 21: Northern Blot von transgenen Pflanzen mit veränderter *AKR2B* Expression. oben: alle Pflanzen zeigen ein gleich starkes Signal für *AKR2A*, Mitte: Pflanzen 2 und 5 der *akr2b*-Mutante zeigen kein Signal für *AKR2B*, Pro_{35S}:*AKR2B* Pflanzen zeigen ein stärkeres Signal als der Wildtyp (WT), unten: Ethidium Bromid (EtBr) Ladungskontrolle.

5.3.3 Erzeugung von AKR2-RNAi Pflanzen

Um die Expressionsmenge von *AKR2A* und *B* zu reduzieren, wurden RNAi-Pflanzen erzeugt, in denen beide Proteine nicht oder nur wenig synthetisiert werden. Dafür wurde *AKR2A* in den RNAi-Vektor pFGC rekombiniert und für „floral dip“ verwendet. Positive Transformanten konnten mit BASTA® selektiert werden. Im Western Blot ist zu erkennen, dass die ARK2A/B-Proteinmenge in einigen Pflanzen stark reduziert ist (Abb. 22). Aufgrunddessen wurden die Linien 6, 8, 18 und 21 weiter verwendet und analysiert.

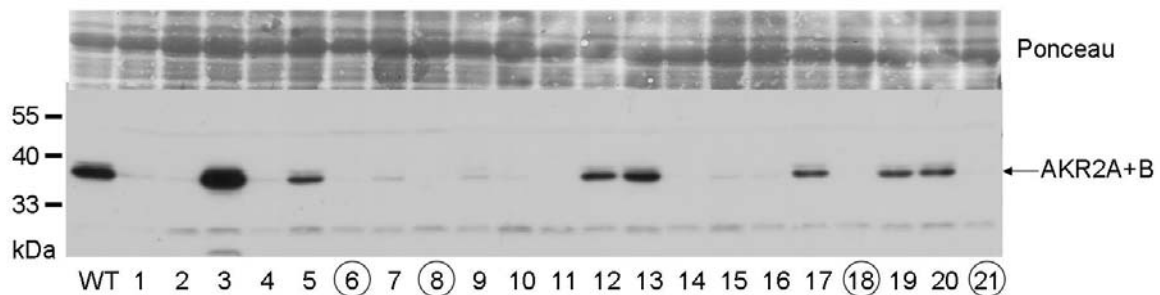


Abbildung 22: Western Blot der AKR2-RNAi-Pflanzen der F₁-Generation mit dem α -AKR2A-Antikörper. AKR2A + B: Signal der endogenen Proteine, das aufgrund des RNAi-Effekts in einigen Pflanzen fehlt. Ponceau: Färbung aller Proteine auf der Membran zur Ladungskontrolle.

In der Veröffentlichung Yan et al. (2002) sind Antisense Pflanzen von *AKR2A* beschrieben, die nekrotische Flecken auf den Blättern zeigen. Diese Pflanzen wurden im C24-Hintergrund erstellt, während in dieser Arbeit Columbia (Col-0) als Hintergrund für die transgenen Pflanzen verwendet wurde und die Col-0-AKR2-RNAi Pflanzen zeigen keine nekrotischen Flecken. Um den von Yan et al. (2002) beschriebenen Phänotyp zu reproduzieren, wurden ebenfalls AKR2-RNAi Pflanzen und auch Pro_{35S}:*AKR2A* Pflanzen im C24-Hintergrund erzeugt (Abb. 23).

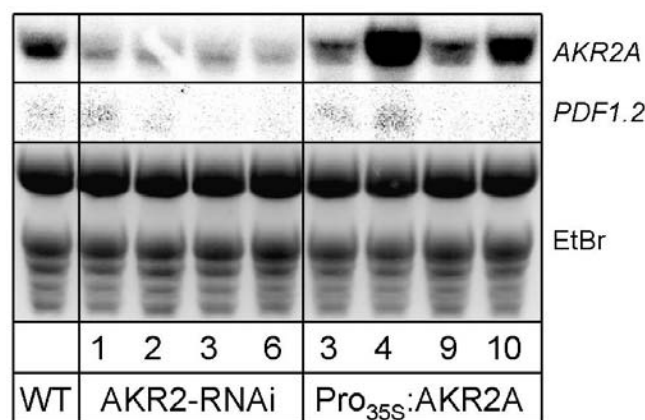


Abbildung 23: Northern Blot von RNA aus ganzen Keimlingen mehrerer Linien der transgenen *AKR2A*-Pflanzen im C24-Hintergrund. *AKR2A* ist in den RNAi Pflanzen deutlich reduziert, in den Pro_{35S}:*AKR2A* Pflanzen in Linien 4 und 10 deutlich stärker als im Wildtyp exprimiert, *PDF1.2* ist nicht deutlich exprimiert. Die Pflanzen wuchsen in Sterilkultur auf MS-Medium und waren ca. 2 Wochen alt. EtBr: Ladungskontrolle, WT: Wildtyp.

Dazu wurden die gleichen Methoden und Vektoren benutzt wie schon beschrieben. Die *AKR2A*-Expression ist in den *AKR2-RNAi* Pflanzen deutlich reduziert und in zwei der getesteten *Pro_{35S}:AKR2A* Linien (4 und 10) deutlich verstärkt (Abb. 23). Die Pflanzen zeigten allerdings keine nekrotischen Flecken oder andere phänotypische Auffälligkeiten, weder in Sterilkultur noch bei Wachstum in Erde.

In den folgenden Kapiteln werden als *AKR2-RNAi* Pflanzen immer die Pflanzen im Col-0-Hintergrund bezeichnet.

5.3.4 *AKR2-RNAi* Pflanzen unterscheiden sich phänotypisch vom Wildtyp

Bei der Anzucht der *AKR2-RNAi* Pflanzen in Erde war nach 3-4 Wochen gut zu erkennen, dass sie kleiner und heller sind als der Wildtyp. Dies war besonders beim Wachstum der Blütenstände zu sehen (Abb. 24 A), der Wildtyp hatte deutlich höhere Blütenstände als die *RNAi*-Pflanzen. Interessanterweise gibt es bei den *RNAi*-Pflanzen bei allen gemessenen Parametern eine Abstufung in Abhängigkeit der *AKR2A/B*-Proteinmenge (Abb. 24 B). In den *RNAi*-Pflanzen #6 und #8 ist kein Protein detektierbar und sie sind die Linien mit der geringsten Wuchshöhe. Bei #18 ist etwas Protein im Western Blot detektierbar und bei #21 ist das Signal fast so stark wie im Wildtyp. Dementsprechend wächst der Blütenstand von #18 höher als bei #6 und #8, und der von #21 ist noch höher. Es wurde auch die Blattfläche gemessen (Abb. 24 C), wobei sich das gleiche Muster ergibt: #6 und #8 haben die kleinste Blattfläche, dann #18, und #21 zeigt hier die gleiche Blattfläche wie der Wildtyp.

Das Samengewicht wurde bestimmt, indem 100 Samen auf der Feinwaage ausgewogen wurden, und es zeigte sich, dass #6 und #8 ein reduziertes Samengewicht aufweisen (Abb. 24 D). Wie oben erwähnt war nicht nur die reduzierte Größe der *RNAi*-Pflanzen auffällig, sondern sie sahen auch heller aus. Deshalb wurde der Chlorophyllgehalt der Blätter gemessen und der optische Eindruck wurde dadurch bestätigt, dass die *RNAi*-Linien weniger Chlorophyll enthalten (Abb. 24 E). Dabei wurde #18 nicht mit getestet, die anderen Linien zeigen die Ausprägung wieder in Abhängigkeit der *AKR2A/B*-Proteinmenge, #6 und #8 haben die geringste Menge Chlorophyll und #21 etwas mehr, jedoch weniger als der Wildtyp.

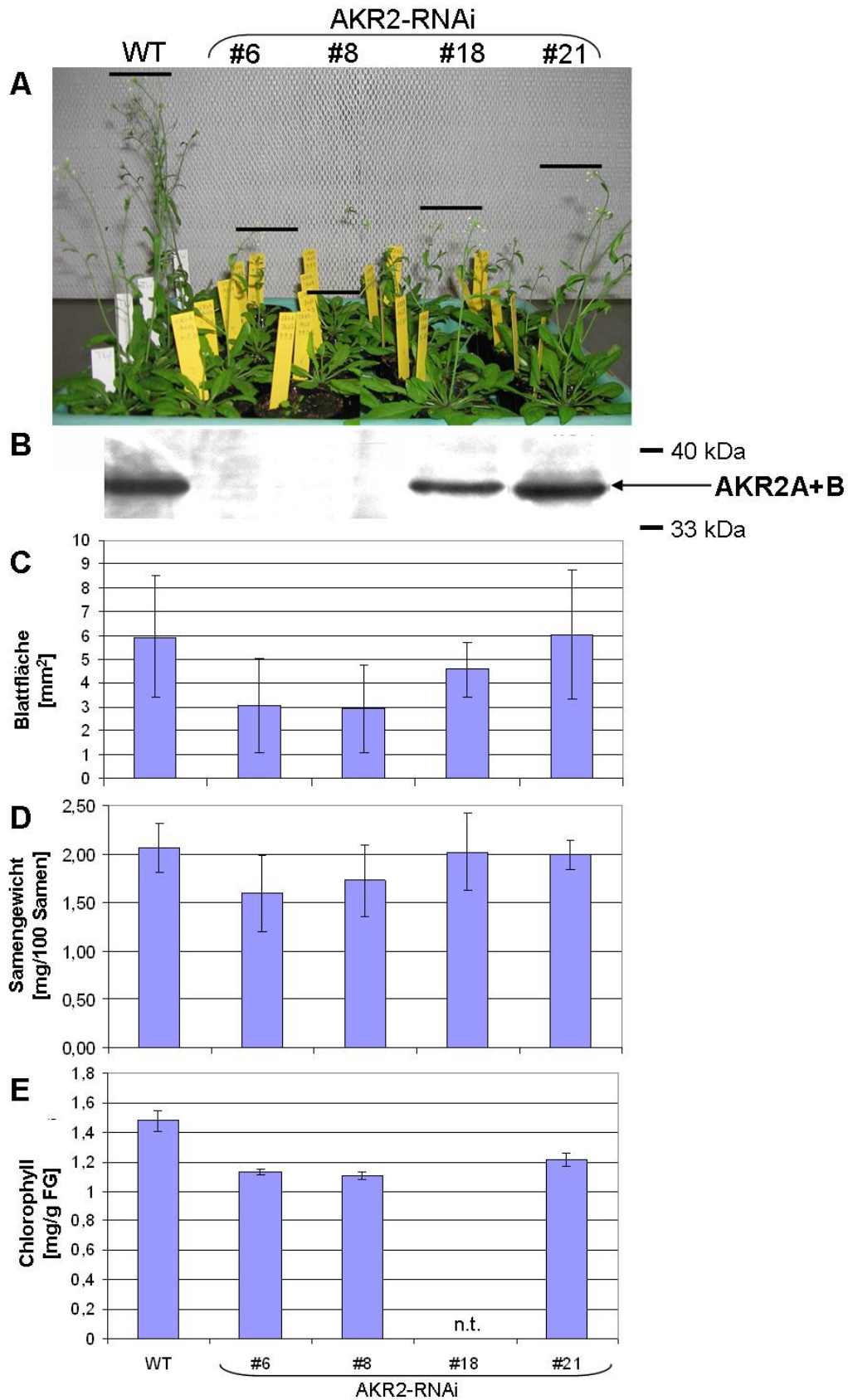


Abbildung 24: AKR2-RNAi Pflanzen zeigen Unterschiede im Phänotyp verglichen mit dem Wildtyp. **A:** Die Blütenstände des Wildtyps (WT) sind höher als die der RNAi Pflanzen, in Abhängigkeit der Proteinmenge im Western Blot (**B**). **C:** Die Blattfläche wurde mithilfe des Programms „Blattfläche“ von Fotos gleichaltriger Pflanzen, die noch nicht blühten, bestimmt. **D:** Für das Samengewicht wurden 100 Samen auf der Feinwaage ausgewogen. **E:** Chlorophyllgehalt der Blätter wurde photometrisch in Methanollösung bestimmt (s. Material und Methoden). Linie #18 wurde nicht getestet (n.t.).

5.4 Funktionale Analyse der AKR2-RNAi und Pro_{35S}:AKR2A Pflanzen und der akr2b Mutante

5.4.1 Microarray zur Analyse der AKR2-RNAi und Pro_{35S}:AKR2A Pflanzen

Aufgrund des beobachteten Phänotyps der RNAi Pflanzen wurden diese zur weiteren Untersuchung für ein Microarray-Experiment eingesetzt. Beim Microarray-Experiment kann das gesamte Transkriptom einer Pflanze untersucht werden, es wurden dafür "Arizona whole-genome microarrays" verwendet. Das Transkriptom der RNAi Pflanzen konnte so mit dem des Wildtyps verglichen werden. Außerdem wurden Pro_{35S}:AKR2A Pflanzen in diesem Microarray-Experiment eingesetzt, so dass deren Transkriptom ebenfalls mit dem des Wildtyps verglichen werden konnte. Die Pflanzen mussten dazu unter gleichen, möglichst reproduzierbaren Bedingungen, die wenigen Schwankungen unterliegen, angezogen werden. Aufgrund von Erfahrungen im Labor wurde die sterile Anzucht auf Agarplatten mit 1xMS-Salzen und 2% Saccharose im Langtag gewählt. 2 Wochen alte Keimlinge von 2 Agarplatten wurden vereinigt und 2 Replikate von jeder Probe zur RNA-Extraktion verwendet.

5.4.1.1 Ergebnisse der Transkriptomanalyse der AKR2-RNAi Pflanzen

Die kompletten Listen mit den in AKR2-RNAi Pflanzen stärker und schwächer exprimierten Genen, verglichen mit dem Wildtyp, sind im Anhang. Insgesamt sind 115 Gene stärker in den RNAi Pflanzen exprimiert als im Wildtyp („hochreguliert“) und 102 schwächer („herunterreguliert“), wobei der Schwellenwert für den P-Wert als 0,02 definiert wurde und für das Signal log (RNAi/WT) als 3. In Tabelle 17 sind jeweils die ersten 20 Gene dieser Listen aufgezeichnet. Dabei stehen *AKR2A* und *AKR2B* an erster Stelle der herunterregulierten Gene, was nochmals die Funktionalität des RNAi-Effektes bestätigt. Außerdem sind keine anderen, homologen Ankyrin-repeat Proteine unter den herunterregulierten Genen, d.h. dass der RNAi-Effekt spezifisch ist.

Ein ebenfalls stark hochreguliertes Gen ist *WRKY40*, für das ebenfalls eine Rolle in der Pathogenabwehr beschrieben ist. Die *wrky18/wrky40*-Doppelmutante und die *wrky18/wrky40/wrky60*-Triplemutante sind resistenter gegenüber *P. syringae*, aber anfälliger gegenüber einer Infektion mit *B. cinerea* als der Wildtyp (Xu et al., 2006).

Tabelle 17: Gene, die laut Microarray in den AKR2-RNAi Pflanzen stärker, bzw. schwächer exprimiert wurden als im Wildtyp. Davon sind jeweils die 20 am stärksten regulierten Gene aufgeführt. Ein negatives Vorzeichen bedeutet schwächere Expression in der transgenen Pflanze, je kleiner der P-Wert, desto signifikanter sind die Expressionsdaten.

Gen AGI	log (RNAi/WT)	P-Wert	Annotation
At1g75830	10.8	0.00317	plant defensin protein, (PDF1.1)
At5g44420	10.6	0.00333	plant defensin protein, (PDF1.2a)
At5g59320	10.6	0.00557	lipid transfer protein 3 (LTP3)
At5g59310	10.4	0.00852	lipid transfer protein 4 (LTP4)
At5g44430	8.5	0.00328	plant defensin protein, (PDF1.2c)
At2g26020	7.3	0.00681	plant defensin protein, (PDF1.2b)
At1g80840	6.5	0.00246	WRKY40
At4g22690	6.5	0.00247	cytochrome P450 family protein flavonoid, CYP706A1
At4g24570	6.4	0.00232	mitochondrial substrate carrier protein
At2g41100	6.2	0.00275	touch-responsive protein (TCH3)
At5g08680	5.9	0.00297	ATP synthase beta chain, mitochondrial, putative
At3g55980	5.8	0.00547	zinc finger (CCCH-type) family protein
At2g26010	5.7	0.00415	plant defensin-fusion protein (PDF1.3)
At4g30270	5.6	0.00264	endo-xyloglucan transferase, MERI-5(B) (SEN4)
At5g67480	5.4	0.00254	TAZ zinc finger family protein / BTB/POZ domain-containing protein (BT4)
At2g18193	5.4	0.00232	AAA-type ATPase family protein
At1g24260	5.4	0.00315	MADS-box protein (AGL9) (SEP3)
At4g23600	5.3	0.00477	coronatine-responsive tyrosine aminotransferase / tyrosine transaminase (CORI3, JR2)
At2g28630	5.2	0.00204	beta-ketoacyl-CoA synthase family protein (Very-long-chain fatty acid condensing enzyme 12)
At5g33355	5.0	0.00216	defensin-like (DEFL) family protein
At4g38860	-4.8	0.00233	auxin-responsive protein, putative
At4g12545	-4.8	0.00258	protease inhibitor/seed storage/LTP family protein
At2g39800	-4.8	0.00232	P5CS1: delta1-pyrroline-5-carboxylate synthase
At4g26530	-4.8	0.00264	fructose-bisphosphate aldolase, cytoplasmic
At3g22600	-4.9	0.00221	protease inhibitor/seed storage/LTP family protein
At4g19690	-5.1	0.00232	Fe(II) transport protein (IRT1)
At1g32080	-5.2	0.00246	membrane protein, putative
At5g48000	-5.3	0.00301	cytochrome P450 family protein, CYP708A2
At2g05510	-5.3	0.00276	glycine-rich protein
At2g33790	-5.8	0.00226	pollen Ole e 1 allergen protein
At3g25830	-6.3	0.00424	monoterpene 1,8-cineole synthase, atTPS-Cin
At4g11320	-6.5	0.00232	cysteine proteinase, putative
At3g25820	-6.6	0.00276	monoterpene 1,8-cineole synthase, atTPS-Cin
At2g14610	-6.7	0.00427	PR1
At2g02120	-6.8	0.00226	plant defensin-fusion protein, putative (PDF2.1)
At5g47450	-7.2	0.00232	Tonoplast intrinsic protein (TIP2;3) (DELTA-TIP3)
At4g33550	-7.4	0.00248	protease inhibitor/seed storage/LTP family protein
At3g53980	-8.2	0.00252	protease inhibitor/seed storage/LTP family protein
At4g35450	-10.6	0.0161	AKR2A
At2g17390	-10.6	0.00204	AKR2B

Bei den hochregulierten Genen fällt außerdem auf, dass mehrere *PDF* (Pflanzen-Defensin) Gene darunter sind. Pflanzliche Defensine inhibieren das Wachstum von vielen Pilzen, sind aber für tierische und pflanzliche Zellen nicht toxisch (Thomma et al., 2002). Sie gehören deshalb zur Abwehr der Pflanze gegen pilzliche, nekrotrophe Pathogene, wie z.B. *Botrytis cinerea* (Leon-Reyes et al., 2009). In Tabelle 18 sind alle *PDF*-Gene und deren Regulation in den AKR2-RNAi Pflanzen aufgelistet. Es ist zu sehen, dass alle signifikant regulierten *PDF1.x* Gene hochreguliert sind und alle signifikant regulierten *PDF2.x* Gene herunterreguliert sind. Die drei Gene mit einem P-Wert von 1 sind nicht signifikant reguliert gegenüber dem Wildtyp.

Tabelle 18: *PDF*-Gene und deren Regulation in den AKR2-RNAi Pflanzen.

Gen AGI	Name	log (RNAi/WT)	P-Wert
At1g75830	PDF1.1	10.8	0.0031
At5g44420	PDF1.2a	10.6	0.00333
At2g26020	PDF1.2b	7.3	0.0068
At5g44430	PDF1.2c	8.5	0.0032
At2g26010	PDF1.3	5.7	0.0041
At1g19610	PDF1.4	1.4	0.0036
At1g55010	PDF1.5	-1.0	1
At2g02120	PDF2.1	-6.8	0.0022
At2g02100	PDF2.2	-4.0	0.0020
At2g02130	PDF2.3	-3.3	0.0027
At1g61070	PDF2.4	-0.1	1
At5g63660	PDF2.5	-3.0	0.0035
At2g02140	PDF2.6	-0.09	1

Um die Daten des Microarrays weiter zu analysieren standen noch die GO (Gene Ontology)-Annotationen zur Verfügung, die jedes Gen einer Zellkomponente, molekularen Funktionen und biologischen Prozessen zuordnen, soweit bekannt bzw. prognostiziert (Ashburner et al., 2000). Es ist möglich zu überprüfen, welche GO-Annotationen im Microarray-Datensatz im Vergleich mit dem gesamten Arabidopsis Genom überrepräsentiert sind (<http://bioinformatics.cau.edu.cn/easygo/>; Zhou and Su, 2007). In Tabelle 19 ist aufgezeichnet, welche GO-Annotationen in den Genen, die in den RNAi Pflanzen hochreguliert sind, häufiger vorkommen als im gesamten Arabidopsis Genom. Es sind jeweils die Prozentsätze der Gene angegeben, die diese Annotation haben. Demnach befinden sich mehr Genprodukte im Mitochondrium (14% statt 4,6%) und in der Zellwand (10,3% statt 1,1%) als erwartet. In der Kategorie „molekularen Funktionen“ ist nur die Transferase Aktivität überrepräsentiert. Dagegen sind die Antworten auf mehrere Stimuli

überrepräsentiert, z.B. Antwort auf ABA, Abwehrreaktion, Antwort auf oxidativen und biotischen Stress und Antwort auf Kälte.

Tabelle 19: Überrepräsentierte GO-Annotationen der laut Microarray in den RNAi Pflanzen hochregulierten Gene nach Zhou and Su (2007). Zum Vergleich steht in der dritten Spalte der Prozentsatz der so annotierten Gene aus dem gesamten Arabidopsis Genom.

	% der in RNAi hochregulierten	% A.t.
Zellkomponente		
Zellbestandteil	79,4	61,1
↳ Mitochondrium	14,0	4,6
äußere verkapselnde Struktur	10,3	1,1
↳ Zellwand	10,3	1,1
Molekulare Funktion		
Transferase Aktivität, transferiert Acylgruppen	5,0	0,8
Biologischer Prozess		
Antwort auf Stimulus	41,9	10,9
↳ Antwort auf endogenen Stimulus	13,3	3,9
↳ Antwort auf ABA	5,7	0,9
↳ Abwehrreaktion	12,4	2,4
↳ Antwort auf Stress	21,0	4,3
↳ Antwort auf oxidativen Stress	9,5	0,9
↳ Antwort auf Temperatur-Stimulus	8,6	1,3
↳ Antwort auf Kälte	6,7	0,9
↳ Antwort auf externen Stimulus	8,6	1,0
↳ Antwort auf biotischen Stress	8,6	1,8
↳ Antwort auf anderen Organismus	8,6	1,6

In Tabelle 20 ist für die in den RNAi Pflanzen herunterregulierten Gene angegeben, welche GO-Annotationen häufiger vorkommen als im gesamten Arabidopsis Genom. Hierbei befinden sich ungewöhnlich viele Genprodukte im Endomembransystem, dazu gehören das Endoplasmatische Reticulum, der Golgi Apparat, Vesikel, die Zellmembran und die Kernmembran. Die überrepräsentierte molekulare Funktion ist in diesem Fall Lipidbindung, da in den RNAi Pflanzen viele „protease inhibitor/seed storage/LTP (lipid transfer protein)“-Gene herunterreguliert sind. Diese führen auch zur Überrepräsentation des Lipidtransports in Tabelle 20. Außerdem sind, wie bei den hochregulierten Genen auch die Antworten auf Stimuli (Abwehrreaktion, Stress, Auxin) überrepräsentiert.

Tabelle 20: Überrepräsentierte GO-Annotationen der laut Microarray in den RNAi Pflanzen herunterregulierten Gene nach Zhou and Su (2007). Zum Vergleich steht in der dritten Spalte der Prozentsatz der so annotierten Gene aus dem gesamten Arabidopsis Genom.

	% der in RNAi herunterregul.	% A.t.
Zellkomponente		
Membran	55,2	30,6
↳ Endomembransystem	42,7	19,2
Molekulare Funktion		
Lipidbindung	12,4	0,7
Biologischer Prozess		
Antwort auf Stimulus	32,7	10,9
↳ Abwehrreaktion	9,9	2,4
↳ Antwort auf Stress	10,9	4,3
↳ Antwort auf Hormon-Stimulus	14,9	2,7
↳ Antwort auf Auxin	6,9	1,1
Lokalisation	21,8	7,5
↳ Transport	21,8	7,4
↳ Lipidtransport	11,9	0,5

5.4.1.2 AKR2-RNAi Pflanzen zeigen eine beeinträchtigte Chloroplasten-Biogenese

In einer Arbeit aus Korea, die während der Anfertigung dieser Arbeit veröffentlicht wurde, wurde AKR2A als Vermittler für den Import von chloroplastidären Membranproteinen identifiziert (Bae et al, 2008). Es wird dort beschrieben, dass AKR2A im Cytoplasma an OEPs bindet, sie transportiert und ihre Insertion in die Membran vermittelt. Die Arbeitsgruppe hat Dexamethason-induzierbare AKR2A-RNAi Pflanzen im *akr2b*-Hintergrund hergestellt, die beim Wachstum auf Dexamethason gelbe oder weiße Blätter zeigen und ein stark reduziertes Wachstum haben. Außerdem war in diesen Pflanzen die Menge von mehreren Chloroplastenproteinen reduziert und die Chloroplasten enthielten statt Thylakoidmembranen mehrere Vesikel (Bae et al, 2008).

Aufgrund dieser Daten wurden die hier analysierten AKR2-RNAi Pflanzen elektronenmikroskopisch untersucht. Alle elektronenmikroskopischen Aufnahmen und die vorherige Einbettung der Proben in Kunstharz (Spurr) wurden von Andrea Olbrich durchgeführt. Auch in diesem Fall unterscheiden sich die Chloroplasten der AKR2-RNAi Pflanzen von denen des Wildtyps, allerdings nicht so drastisch wie in der Veröffentlichung beschrieben. Die Thylakoidmembranen bilden Grana und es sind auch Stärkekörner zu sehen, wie im Wildtyp (Abb. 25 A, B). Allerdings sind die Thylakoidmembranen lockerer gepackt und es gibt einige leere Zwischenräume, die

Vesikeln ähneln, allerdings von keiner Membran umgeben sind (Pfeile, Vergrößerung in Abb. 25 C). Interessanterweise sind die gleichen Veränderungen in Tabak (*Nicotiana tabacum*) NtANK1-RNAi Pflanzen zu sehen (Abb. 25 D-F). Die NtANK1-RNAi Pflanzen zeigen Läsionen, insbesondere in der Nähe der Blattadern, die sich durch eine reduzierte Mesophyllschicht und damit auch einen reduzierten Chlorophyllgehalt auszeichnen (Böttner et al., 2009). Elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden von Chloroplasten aus dem grünen, unauffälligen Teil eines Blattes gemacht (Abb. 25 E) und von Chloroplasten aus einer gelblichen Läsion (Abb. 25 F). In beiden Fällen sind Stärkekörner zu sehen und die lockere Packung der Thylakoide mit Leerräumen dazwischen (Pfeile). In Abb. 25 F ist die große Anzahl von Vesikeln auffällig, die sich innerhalb der Chloroplastenmembran, jedoch außerhalb des Thylakoidnetzwerks befinden.

Trotz der Überrepräsentation von mitochondrialen Proteinen (Tabelle 19), waren die Mitochondrien der AKR2-RNAi Pflanzen in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen unauffällig im Vergleich zum Wildtyp.

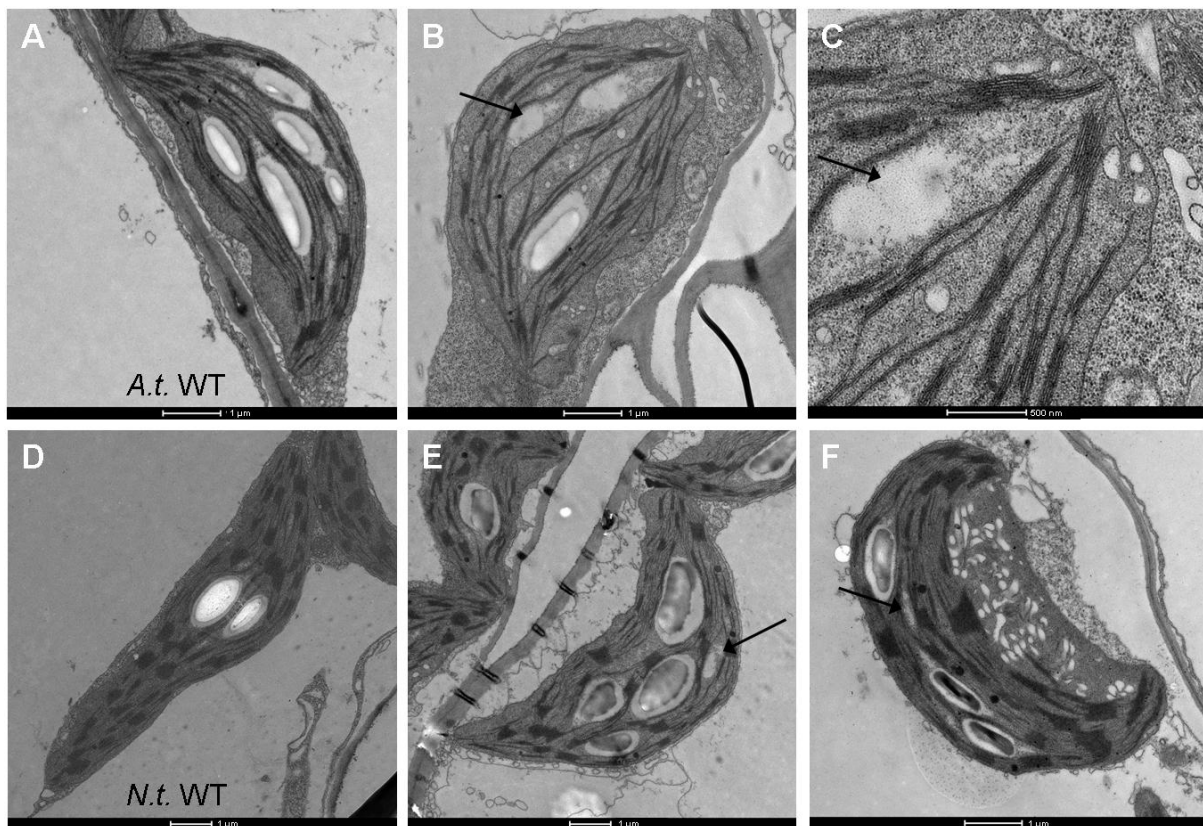


Abbildung 25: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Chloroplasten aus verschiedenen Pflanzen. **A:** Arabidopsis Wildtyp (*A.t.* WT), **B:** Arabidopsis AKR2-RNAi, **C:** Vergrößerung aus B, **D:** Tabak Wildtyp (*N.t.* WT), **E:** Tabak NtANK1-RNAi grünes Blattstück, **F:** Tabak NtANK1-RNAi gelbes Blattstück („Läsion“). Pfeile deuten auf Leerräumen zwischen den Thylakoidmembranen, die nicht von einer Membran umgeben sind. Die Balken unter den Bildern entsprechen 1 µm, außer in C: 500 nm.

Chloroplastidäre Proteine sind nach den Microarraydaten weder bei den hoch- noch bei den herunterregulierten Genen überrepräsentiert. Es sind allerdings einige Gene dabei, deren Genprodukt sich laut Annotation im Chloroplasten befindet, diese sind in Tabelle 21 zusammengestellt.

Tabelle 21: Gene, die im Microarray der AKR2-RNAi Pflanzen hoch- (positive Zahl) bzw. herunterreguliert (negatives Vorzeichen) waren und denen die GO-Annotation „Chloroplast“ zugeordnet ist.

Gen AGI	log (RNAi/WT)	Annotation
At4g25100	4.4	superoxide dismutase [Fe], chloroplast (SODB) / iron superoxide dismutase (FSD1)
At1g73540	3.9	Nudix hydrolase 21, chloroplast precursor (NUDT21)
At5g61440	3.9	thioredoxin family protein
At4g08390	3.9	L-ascorbate peroxidase, stromal (sAPX)
At1g60950	3.3	ferredoxin, chloroplast (PETF) (AtFD2) (FEDA)
At2g22880	3.3	VQ motif-containing protein
At2g45180	3.2	protease inhibitor/seed storage/LTP family protein
At5g01600	3.2	ferritin 1 (FER1)
At1g48570	3.0	zinc finger (Ran-binding) family protein
At2g42540	-3.8	cold-responsive protein (cor15a)
At4g19170	-3.8	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, putative (NCED4)
At1g32080	-5.2	membrane protein, putative

5.4.1.3 Ergebnisse der Transkriptomanalyse der Pro_{35S}:AKR2A Pflanzen

Die kompletten Listen mit den in Pro_{35S}:AKR2A Pflanzen stärker und schwächer exprimierten Genen, verglichen mit dem Wildtyp, sind im Anhang. Insgesamt sind 45 Gene stärker in den Pro_{35S}:AKR2A Pflanzen exprimiert als im Wildtyp („hochreguliert“) und 17 schwächer („herunterreguliert“), wobei hier ebenfalls der Schwellenwert für den P-Wert als 0,02 definiert wurde und für das Signal log (Pro_{35S}/WT) als 3. In Tabelle 22 sind jeweils die ersten 20 bzw. alle (17) Gene dieser Listen aufgezeichnet. Dabei fällt auf, dass es sich bei ca. der Hälfte der Gene um dieselben handelt, die auch in den AKR2-RNAi Pflanzen hoch- bzw. herunterreguliert sind (Abb. 26).

Tabelle 22: Gene, die laut Microarray in den Pro_{35S}:AKR2A Pflanzen stärker, bzw. schwächer exprimiert wurden als im Wildtyp. Davon sind jeweils die 20 am stärksten regulierten bzw. alle 17 Gene aufgeführt. Ein negatives Vorzeichen bedeutet schwächere Expression in der transgenen Pflanze, je kleiner der P-Wert, desto signifikanter sind die Expressionsdaten. Reg. wie RNAi: die angekreuzten Gene sind in den AKR2-RNAi Pflanzen ebenfalls hoch- bzw. herunterreguliert.

Gen AGI	log (Pro _{35S} /WT)	P-Wert	Annotation	reg. wie RNAi
At5g59320	14.9	0.00561	lipid transfer protein 3 (LTP3)	X
At5g59310	14.9	0.0065	lipid transfer protein 4 (LTP4)	X
At1g75830	9.0	0.00636	plant defensin-fusion protein (PDF1.1)	X
At4g23600	8.0	0.00518	coronatine-responsive tyrosine aminotransferase / tyrosine transaminase (CORI3, JR2)	X
At4g15210	7.9	0.00621	beta-amylase (BMY1)/1,4-alpha-D-glucan maltohydrolase	X
At5g44420	7.7	0.00773	plant defensin protein (PDF1.2a)	X
At4g35295	6.7	0.00737	homoserine kinase, putative / HSK	X
At5g44430	6.5	0.00731	plant defensin-fusion protein, (PDF1.2c)	X
At4g35610	6.2	0.00651	zinc finger (C2H2 type) family protein	
At4g24570	5.9	0.00476	mitochondrial substrate carrier family protein	X
At2g26020	5.5	0.0157	plant defensin-fusion protein, putative (PDF1.2b)	X
At1g80840	4.4	0.00578	WRKY40	X
At5g51190	4.4	0.0055	ERF protein subfamily B-3 of ERF/AP2	
At1g72910	4.3	0.00515	disease resistance protein (TIR-NBS class), putative	X
At2g37770	4.3	0.00625	aldo/keto reductase family protein	X
At1g66100	4.2	0.00476	probable thionin-2.4 precursor	
At1g27730	4.1	0.0055	zinc finger (C2H2 type) family protein (ZAT10) / salt-tolerance zinc finger protein (STZ)	X
At2g26010	4.1	0.01	plant defensin-fusion protein, putative (PDF1.3)	X
At3g28290	4.1	0.00515	integrin-related protein 14a	
At3g55980	4.1	0.0142	zinc finger (CCCH-type) family protein	X
At5g57240	-3.0	0.0113	oxysterol-binding family protein	
At1g18400	-3.0	0.00476	BR enhanced expression 1 (BEE1)	
At5g39110	-3.0	0.00513	germin-like protein, putative	
At5g48485	-3.1	0.00611	protease inhibitor/seed storage/LTP family protein; DIR1: DEFECTIVE IN INDUCED RESISTANCE 1	
At3g56980	-3.1	0.00518	OBP3-responsive gene 3 (ORG3) (BHLH039)	
At2g05510	-3.2	0.00837	glycine-rich protein	X
At3g05950	-3.6	0.0065	Germin-like protein subfamily 1 member 7 precursor	
At3g56970	-3.6	0.00511	OBP3-responsive gene 2 (ORG2) (BHLH038)	
At1g65960	-3.9	0.00515	glutamate decarboxylase 2 (GAD 2)	
At3g25830	-4.0	0.0128	monoterpene 1,8-cineole synthase, atTPS-Cin	X
At3g25820	-4.2	0.00756	monoterpene 1,8-cineole synthase, atTPS-Cin	X
At2g47270	-4.6	0.00601	transcription factor/ transcription regulator	X
At1g49570	-5.0	0.00862	Peroxidase 10 precursor (PER10)	X
At1g23730	-5.8	0.0055	carbonic anhydrase/carbonate dehydratase, putative	X
At5g19890	-6.4	0.00515	peroxidase, putative	
At4g33720	-6.9	0.00431	pathogenesis-related protein, putative	
At2g14610	-7.0	0.00627	PR1	X

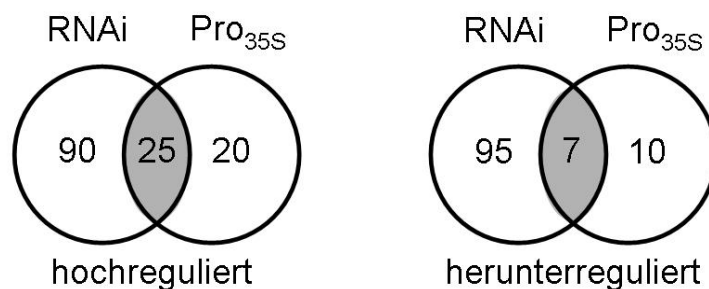


Abbildung 26: Venn-Diagramme der signifikant hoch- bzw. herunterregulierten Gene in den Microarrays der RNAi und Pro_{35S} Pflanzen. Grau hinterlegt ist die Anzahl der Gene, die in beiden Pflanzenlinien hochreguliert (links) oder in beiden herunterreguliert (rechts) sind. Auf weißem Grund steht die Anzahl der Gene, die in den Pflanzenlinien unterschiedlich reguliert sind. Die Schwellenwerte sind: P-Wert 0,02, log(ratio): 3.

Diese gleich regulierten Gene sind in Tabelle 24 aufgeführt, in der log (Pro_{35S}/WT) und log (RNAi/WT) zum Vergleich nebeneinander stehen. Die relative Expressionsstärke stimmt oft bei beiden Pflanzenlinien überein, z.B. gehören *LTP3*, *LTP4* und *PDF1.1* zu den am stärksten hochregulierten Genen. Es sind bei den hochregulierten Genen viele durch Stress induzierte Gene dabei, wie z.B. die *PDF1*-Gene, das Pathogen-induzierte *WRKY40* und „disease resistance proteins“. Auch aus Tabelle 23 lässt sich anhand der überrepräsentierten GO-Annotationen entnehmen, dass in den Pro_{35S}:AKR2A Pflanzen, genau wie in den AKR2-RNAi Pflanzen, ungewöhnlich viele Stress-induzierte Gene exprimiert werden, verglichen mit dem Wildtyp (Abwehrreaktion, Antwort auf Stress, Antwort auf abiotischen Stimulus). Außerdem sind Transkriptionsfaktoren überrepräsentiert von den in Pro_{35S}:AKR2A Pflanzen hochregulierten Genen. Von den in diesen Pflanzen herunterregulierten Genen ist keine GO-Annotation überrepräsentiert.

Tabelle 23: Überrepräsentierte GO-Annotationen der laut Microarray in den Pro_{35S}:AKR2A Pflanzen hochregulierten Gene nach Zhou and Su (2007). Zum Vergleich steht in der dritten Spalte der Prozentsatz der so annotierten Gene aus dem gesamten Arabidopsis Genom.

	% der in Pro _{35S} hochregulierten	% A.t.
Zellkomponente		
Zellwand	13,6	1,1
Molekulare Funktion		
DNA-Bindung	21,7	9,1
↳ Transkriptionsfaktor-Aktivität	21,7	6,9
Biologischer Prozess		
Antwort auf Stimulus	47,7	10,9
↳ Abwehrreaktion	27,3	2,4
↳ Antwort auf Stress	15,9	4,3
↳ Antwort auf abiotischen Stimulus	15,9	3,6
↳ Antwort auf Hormon-Stimulus	20,5	2,7
Regulierung eines zellulären metabolischen Prozesses	20,5	7,5
↳ Regulierung der Transkription	20,5	7,1

Tabelle 24: Gene, die in den Pro_{35S}:AKR2A und in den AKR2-RNAi Pflanzen gleich reguliert werden, d.h. in beiden Pflanzenlinien stärker oder in beiden schwächer als im Wildtyp exprimiert werden.

Gen AGI	log (Pro _{35S} /WT)	log (RNAi/WT)	Annotation
At5g59320	14.9	10.6	lipid transfer protein 3 (LTP3)
At5g59310	14.9	10.4	lipid transfer protein 4 (LTP4)
At1g75830	9.0	10.8	plant defensin-fusion protein (PDF1.1)
At4g23600	8.0	5.3	coronatine-responsive tyrosine aminotransferase / tyrosine transaminase (CORI3, JR2)
At4g15210	7.9	4.1	beta-amylase (BMY1)/1,4-alpha-D-glucan maltohydrolase
At5g44420	7.7	10.6	plant defensin protein (PDF1.2a)
At4g35295	6.7	3.3	homoserine kinase, putative / HSK
At5g44430	6.5	8.5	plant defensin-fusion protein (PDF1.2c)
At4g24570	5.9	6.4	mitochondrial substrate carrier family protein
At2g26020	5.5	6.2	plant defensin-fusion protein, putative (PDF1.2b)
At1g80840	4.4	6.5	WRKY40
At1g72910	4.3	3.3	disease resistance protein (TIR-NBS class), putative
At2g37770	4.3	3.4	aldo/keto reductase family protein
At1g27730	4.1	3.2	zinc finger (C2H2 type) family protein (ZAT10) / salt-tolerance zinc finger protein (STZ)
At2g26010	4.1	5.7	plant defensin-fusion protein, putative (PDF1.3)
At3g55980	4.1	5.8	zinc finger (CCCH-type) family protein
At1g72900	3.7	3.2	disease resistance protein (TIR-NBS class)
At1g72940	3.7	3.5	disease resistance protein (TIR-NBS class)
At2g41100	3.5	6.2	touch-responsive protein / calmodulin-related protein 3, touch-induced (TCH3)
At1g24260	3.3	5.4	MADS-box protein (AGL9) (SEP3)
At1g07135	3.1	3.5	glycine-rich protein
At2g40140	3.1	3.3	zinc finger (CCCH-type) family protein (CZF1/ZFAR1)
At5g06320	3.0	3.5	harpin-induced (HIN1, NDR1) family protein (NHL3)
At1g75900	3.0	3.0	family II extracellular lipase 3 (EXL3)
At2g05510	-3.2	-5.3	glycine-rich protein
At3g25830	-4.0	-6.3	monoterpene 1,8-cineole synthase, atTPS-Cin
At3g25820	-4.2	-6.6	monoterpene 1,8-cineole synthase, atTPS-Cin
At2g47270	-4.6	-4.1	transcription factor/ transcription regulator
At1g49570	-5.0	-4.2	Peroxidase 10 precursor (PER10)
At1g23730	-5.8	-4.4	carbonic anhydrase/carbonate dehydratase, putative
At2g14610	-7.0	-6.7	PR1

5.4.2 AKR2-RNAi Pflanzen sind stressanfälliger als der Wildtyp

Die Ergebnisse des Microarrays deuteten darauf hin, dass die Reduktion von *AKR2A* und *AKR2B* in Arabidopsis zu einer veränderten Stressantwort führt. Insbesondere die Hochregulierung der *PDF1*-Gene und die in Tabelle 19 gezeigte Häufung von „Antwort auf Stimulus“-Annotationen implizieren dies. Deshalb wurden die AKR2-RNAi Pflanzen mit verschiedenen Methoden Stress unterzogen.

5.4.2.1 AKR2-RNAi Pflanzen sind anfälliger gegenüber oxidativem Stress als der Wildtyp

Pflanzen sind in ihrer normalen Entwicklung oxidativem Stress ausgesetzt. Trockenheit, zu hohe Belichtung oder Kälte führen zu oxidativem Stress, bei dem „reaktive Sauerstoffspezies“ (ROS, reactive oxygen species) entstehen (Greene, 2002). Auch das Herbizid Paraquat (Methylviologen) induziert oxidativen Stress. Das angeregte Photosystem I überträgt ein Elektron auf Paraquat, welches dann Sauerstoff zum chemisch aggressiven Superoxidradikal reduziert. Zudem konkurriert Paraquat mit Dehydroascorbat um die durch Photosystem I bereitgestellten Reduktionsäquivalente, so dass Dehydroascorbat nicht zu Ascorbat reduziert wird. Deshalb kann die Reaktion der Ascorbat-Peroxidase nicht ablaufen, durch die sonst H_2O_2 eliminiert wird. Die vermehrte Bildung von Superoxid und die verminderte Entgiftung von H_2O_2 führt Paraquat zu sehr schweren Schäden der Mesophyllzellen, wie man durch das Ausbleichen der Blätter erkennen kann (Heldt, 1999).

Zur Applikation von oxidativem Stress wurden Samen vom Wildtyp, von 2 AKR2-RNAi Linien (#6 und #8) und *akr2b* Pflanzen auf Agarplatten mit Paraquat-haltigem MS-Medium ausgelegt. Nach 2 Wochen in der Langtag-Klimakammer konnten die Keimlinge ausgezählt werden. Ohne Paraquat waren alle Keimlinge grün, mit steigender Paraquat-Konzentration stieg der Anteil der weißen Keimlinge und der nicht gekeimten Samen. Dies ist in Abb. 27 als % der grünen Keimlinge aufgetragen. Es ist zu erkennen, dass die Keimlinge der AKR2-RNAi Linien deutlich sensibler auf Paraquat reagieren, da bei der gleichen Paraquat-Konzentration der Anteil grüner Keimlinge geringer ist als im Wildtyp. Die *akr2b* Mutante ist anfälliger als der Wildtyp, allerdings nicht in so hohem Maße wie die AKR2-RNAi Pflanzen.

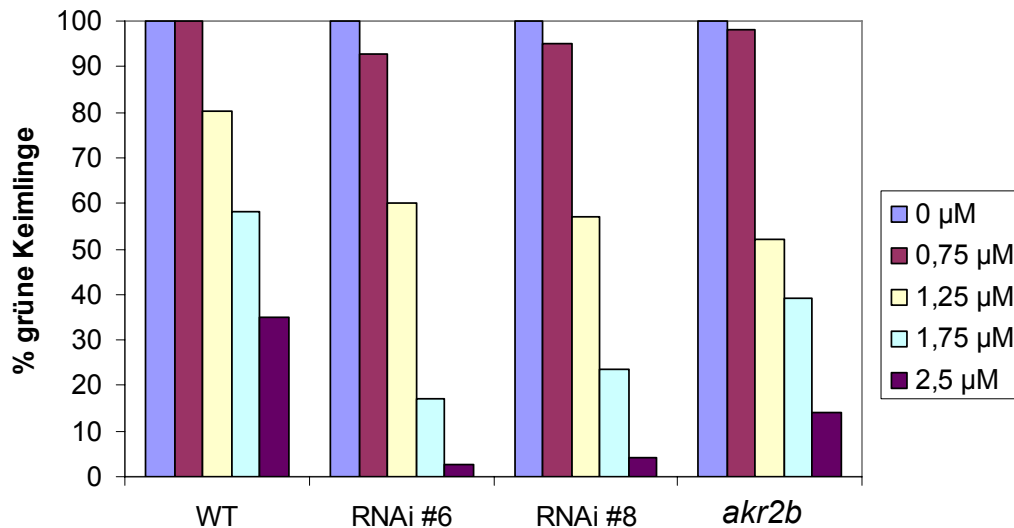


Abbildung 27: Wachstum von Keimlingen des Wildtyps, der AKR2-RNAi Pflanzen und der *akr2b*-Mutante auf MS-Medium mit verschiedenen Konzentrationen Paraquat. Samen wurden auf MS-Agarplatten mit den rechts angegebenen Konzentrationen Paraquat ausgelegt und nach 2 Wochen in der Klimakammer wurde der Anteil der grünen Keimlinge an den gesamten ausgelegten Samen ausgezählt. Die AKR2-RNAi Linien #6 und #8 sind sensitiver als der Wildtyp, *akr2b* zeigt einen moderaten Phänotyp. Das Experiment wurde dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

5.4.2.2 AKR2-RNAi Pflanzen sind susceptibler gegenüber *Pseudomonas syringae* als der Wildtyp

In den Ergebnissen des Microarray (Tab. 19) sind auch Gene mit der Annotation „Antwort auf biotischen Stress“ überrepräsentiert. Um zu testen, ob die AKR2-RNAi Pflanzen anders auf biotischen Stress reagieren als der Wildtyp, wurde eine Infektion mit dem Bakterium *Pseudomonas syringae* DC3000 durchgeführt. Es wurde ein Stamm verwendet, der den LuxCDABE Operon aus *Photobacterium luminescens* mit einem konstitutiven Promoter enthält, was zur konstitutiven Lumineszenz der Bakterien führt (Fan et al., 2008). Dieser Stamm wurde zur Infektion von Arabidopsis Pflanzen durch Infiltration in die Blätter verwendet. Die Lumineszenz der Bakterien kann in den Blättern der Pflanzen nachgewiesen werden (Abb. 28 A). An Tag 3 nach der Infektion kann auf dem Lumineszenz-Bild schon mit bloßem Auge ein Unterschied zwischen den Pflanzenlinien gesehen werden. Die AKR2-RNAi Linien #6 und #8 zeigen die stärkste Lumineszenz (in Falschfarben: rot), die RNAi Linie #21 etwas weniger und die *akr2b*-Mutante so wie der Wildtyp am wenigsten (Abb. 28 A). In einem anderen Experiment wurden Wildtyp, AKR2-RNAi #6 und *akr2b* mit einem nicht-lumineszenten *Pseudomonas syringae* DC3000 Stamm durch Eintauchen der Blätter in Bakteriensuspension infiziert. Die Auswertung erfolgte nach der klassischen Titer-Methode. Auch bei dieser Methode konnte die Suszeptibilität der RNAi Pflanzen

gezeigt werden (Abb. 28 B). An Tag 3 sind in den RNAi Pflanzen eine Zehnerpotenz mehr Bakterien gewachsen als im Wildtyp, an Tag 5 ist es fast eine Zehnerpotenz.

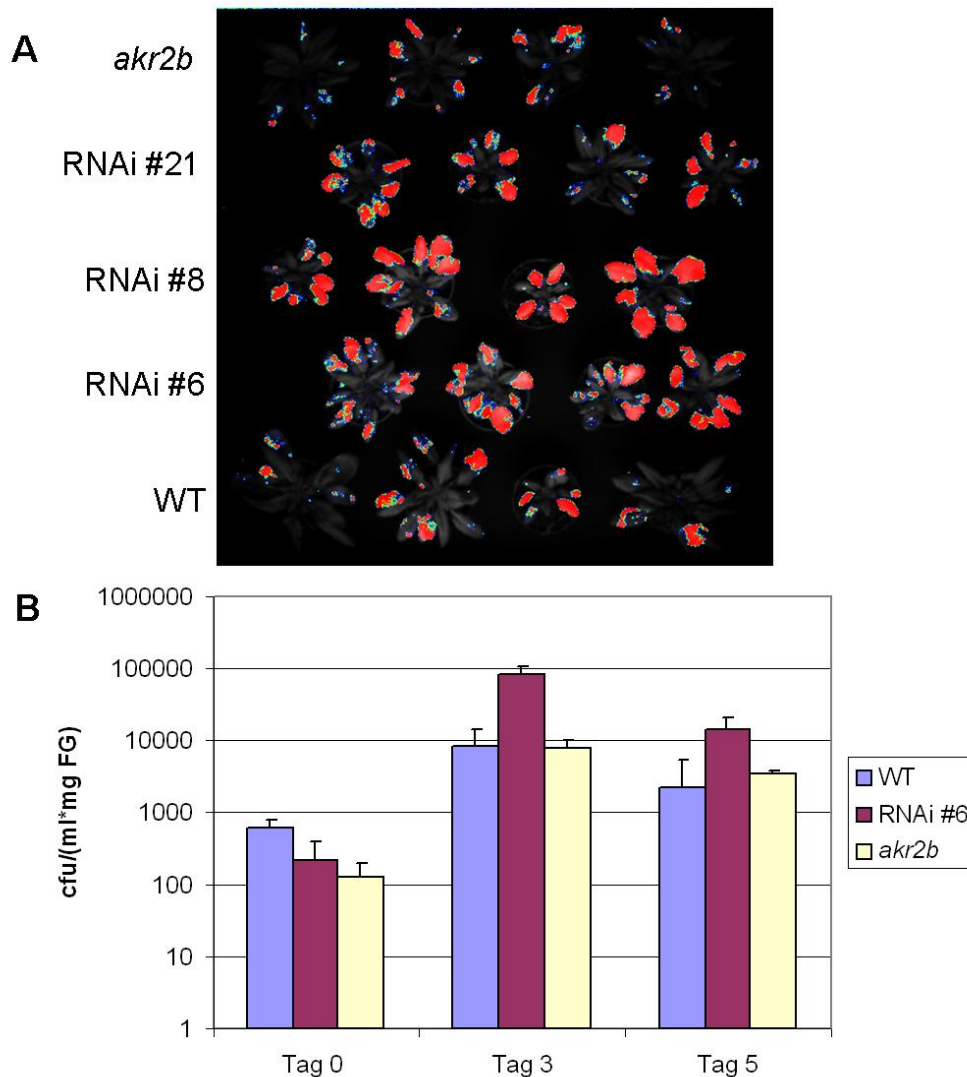


Abbildung 28: Infektion von Wildtyp, AKR2-RNAi Linien und der *akr2b*-Mutante mit *Pseudomonas syringae* und Messung der Bakterien mit zwei verschiedenen Methoden. **A:** Tag 3 nach der Infiltration mit *P. syringae* DC3000 JI Lux, einem konstitutiv lumineszenten Bakterienstamm. Aufnahme der Lumineszenz mit einer sensitiven CCD-Kamera, die Lumineszenz in Falschfarben wiedergegeben (rot-grün-blau). Von jeder Pflanzenlinie sind 5 Pflanzen zu sehen, WT: Wildtyp, AKR2-RNAi Linien #6, #8, #21 und *akr2b*-Mutante. **B:** Klassische *P. syringae* Infektion durch eintauchen der Pflanzen in Bakteriensuspension und austreichen und auszählen der Kolonien an den angegebenen Tagen nach Infektion. Infizierte Pflanzenlinien: WT: Wildtyp, AKR2-RNAi #6 und *akr2b*-Mutante.

5.4.2.3 AKR2-RNAi Pflanzen sind anfälliger gegenüber einer Infektion mit *Botrytis cinerea* als der Wildtyp

Neben der Infektion mit *P. syringae* wurde als weiterer biotischer Stress die Infektion mit dem nekrotrophen Pilz *Botrytis cinerea* durchgeführt. Befall mit diesem Pilz verursacht die Grauschimmelfäule, die zum Absterben der Wirtspflanze führt. Der nekrotrophe Pilz assimiliert die Nährstoffe aus den toten Zellen (van Kan, 2006). Die Infektion mit *Botrytis* induziert die pflanzliche Abwehrreaktion, unter anderem die Expression von JA-abhängigen Genen, wie z.B. *PDF1.2* (Ferrari et al., 2003). In der *coi1*-Mutante, die einen Defekte in vielen JA-abhängigen Funktionen hat, wird *PDF1.2* nach *Botrytis*-Infektion nicht exprimiert (Feys et al., 1994). Außerdem ist die *coi1*-Mutante suszeptibler für eine Infektion mit *Botrytis* verglichen mit dem Wildtyp (Thomma et al., 1998). Aufgründdessen wurde in den AKR2-RNAi Pflanzen, in denen *PDF1.2* konstitutiv exprimiert wird, eine veränderte Resistenz gegenüber *Botrytis* erwartet.

In Abb. 29 A sind Blätter der infizierten Pflanzen 6 Tage nach der Infektion gezeigt und es ist deutlich zu erkennen, dass die AKR2-RNAi Linien, insbesondere #6, suszeptibler gegenüber dem Pilz sind, ihre Blätter sind deutlich mehr beschädigt. Für das Foto wurden jeweils die am wenigsten befallenen Blätter der Pflanzen verwendet.

Auch bei der Quantifizierung des Pilzes in den Pflanzen mithilfe eines Northern Blots, für den jeweils um 13 Uhr an Tag 0-5 nach der Infektion Proben genommen wurden, ist anhand des Signals der *Botrytis Actin 3*-Sonde zu sehen, dass die RNAi Pflanzen suszeptibler sind als der Wildtyp (Abb. 29 B). Bei AKR2-RNAi #6 ist an Tag 3, 4 und 5 das Signal für *Botrytis Actin 3* deutlich stärker als im Wildtyp. Bei AKR2-RNAi #8 ist dies an Tag 5 und bei #21 an Tag 4 und 5 ebenfalls der Fall. Das Signal für *PR1* ist in AKR2-RNAi #6 ab Tag 2 erhöht, für *PDF1.2* schon ab Tag 1, verglichen mit dem Wildtyp.

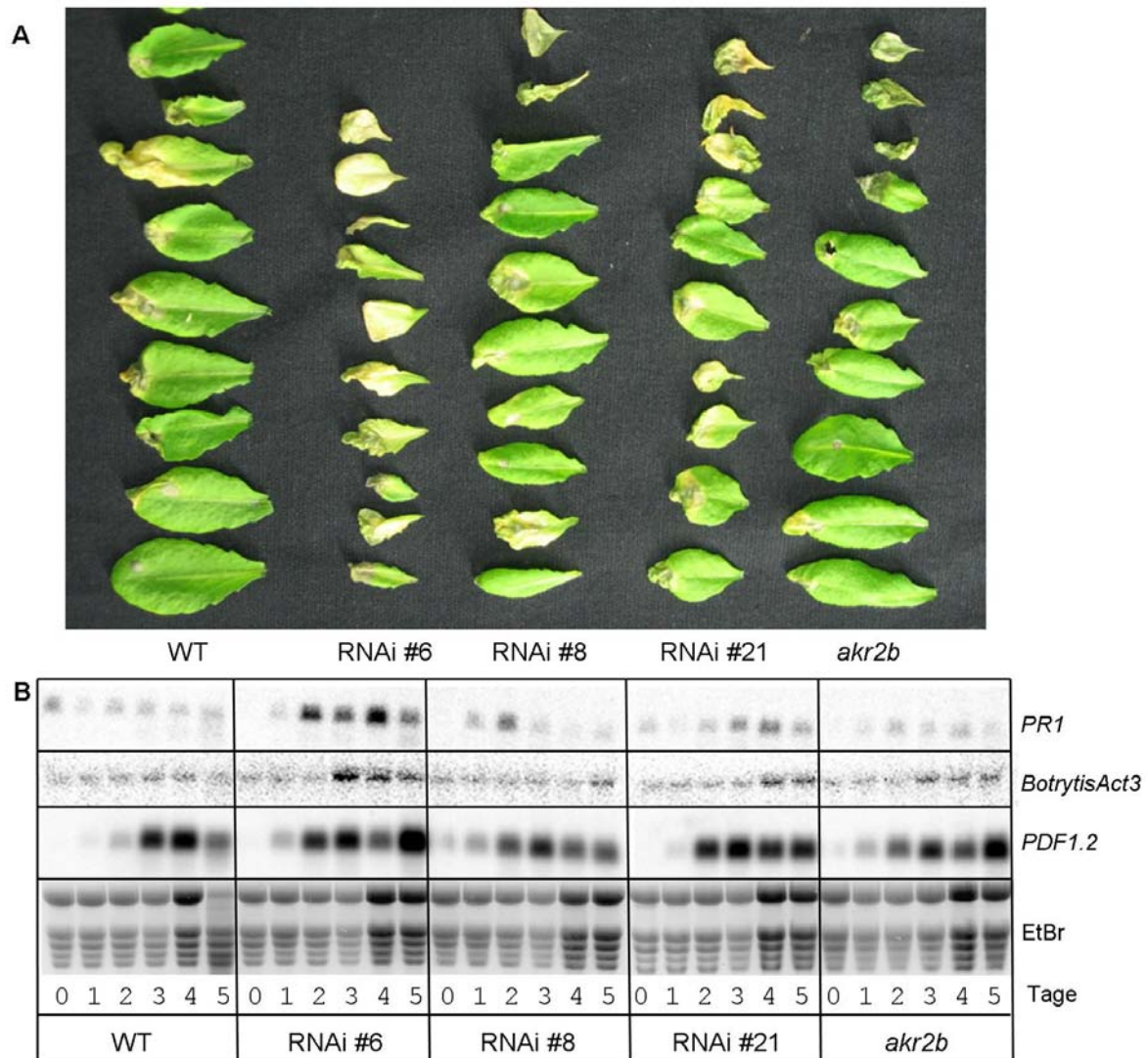


Abbildung 29: Vergleich der Infektion von Wildtyp, AKR2-RNAi Linien und *akr2b*-Mutante mit *Botrytis cinerea* mit infizierten Blättern und Änderungen der Gen-Expression. **A:** Die am wenigsten beschädigten Blätter 6 Tage nach der Infektion. **B:** Northern Blot mit den angegebenen Sonden, Probenahme an Tag 0-5 nach der Infektion, jeweils um 13 Uhr. Die Ethidium Bromid (EtBr) Kontrolle an Tag 4 und 5 ist stärker gefärbt, da neuer Ladebuffer verwendet wurde, dies ist kein Hinweis auf höhere RNA-Konzentrationen. Verwendete Pflanzenlinien: WT: Wildtyp, AKR2-RNAi Linien #6, #8, #21 und *akr2b*-Mutante.

Die aufgrund der Ergebnisse des Microarrays erwartete konstitutive Expression von *PDF1.2* ist hier nicht zu erkennen (Tag 0). Deshalb wurde ein Northern Blot durchgeführt, bei dem zu verschiedenen Tageszeitpunkten Proben von Wildtyp- und von AKR2-RNAi Pflanzen aus Erdkultur genommen wurden. Es wurde die Expression von *AKR2A* und von den beiden Pathogen-induzierten Genen *PR1* und *PDF1.2a* überprüft (Abb. 30). Wie erwartet werden in den AKR2-RNAi Pflanzen weder *AKR2* noch *PR1* exprimiert, jedoch ergab sich für *PDF1.2a* ein Tageszeiten abhängiges Expressionsmuster. Kurz nach Einschalten des Lichts (7:05 Uhr und 8 Uhr) ist die Expression schwach, um 9 Uhr sehr stark und nimmt dann bis mittags

(13:30 Uhr) wieder ab. In einem zweiten, unabhängigen Experiment war eine ähnliche Regulation zu sehen. Es handelt sich also nicht um eine konstitutive Expression von *PDF1.2*, sondern um eine Tageszeiten abhängige Regulation. Diese Regulation erklärt das Ausbleiben des *PDF1.2*-Signals an Tag 0 der *B. cinerea* Infektion, da die Proben um 13 Uhr genommen wurden, ein Zeitpunkt, an dem die *PDF1.2*-Expression herunterreguliert ist.

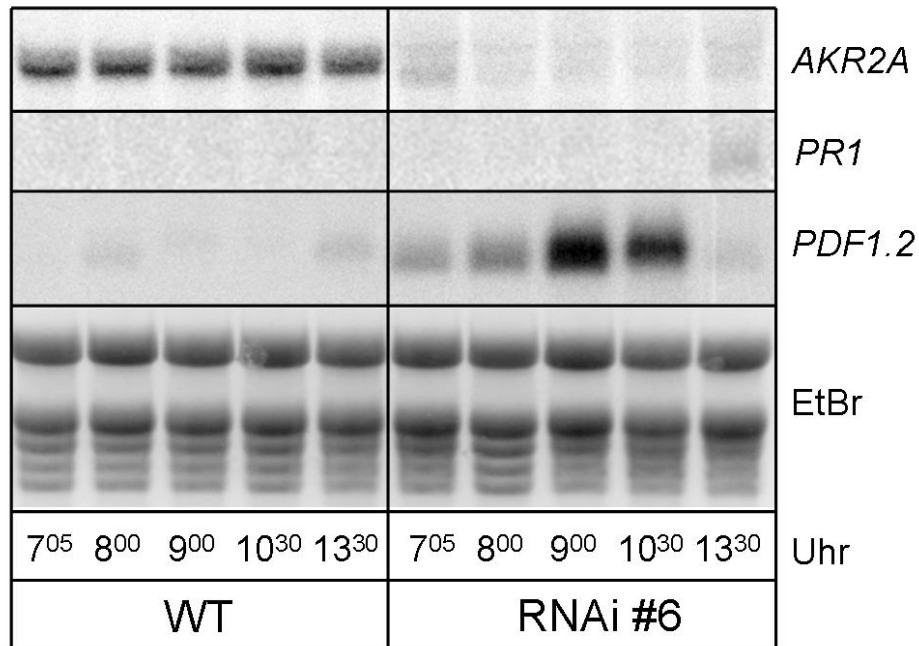


Abbildung 30: Northern Blot mit RNA aus Blättern von Wildtyp und AKR2-RNAi Pflanzen zur Analyse von tageszeitlichen Schwankungen der Genexpression. Die Probennahme erfolgte zu verschiedenen Tageszeiten („Uhr“), das Licht wurde um 7⁰⁰ Uhr angeschaltet. *AKR2A* und *PR1* sind nicht tageszeitlich reguliert, *PDF1.2* wird in den RNAi Pflanzen am Vormittag hochreguliert, bis mittags wieder herunterreguliert. Die Pflanzen wuchsen in Erde im Klimaschrank und waren ca. 3 Wochen alt. EtBr: Ladungskontrolle. WT: Wildtyp, RNAi #6: AKR2-RNAi Linie 6.

6 Diskussion

6.1 Interaktionen zwischen einem Ankyrin-repeat Protein und einem bZIP-Transkriptionsfaktor unterscheiden sich in Tabak und Arabidopsis

Die Ankyrin-repeat Proteindomäne kommt in Prokaryoten, Eukaryoten und einigen Viren vor und vermittelt Protein-Protein-Interaktionen (Sedgwick und Smerdon, 1999). Für das Arabidopsis Ankyrin-repeat Protein AKR2A wurden Interaktionen mit einem 14-3-3-Protein (At5g10450) und mit der Ascorbat Peroxidase 3 (APX3) gefunden (Yan et al., 2002). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass AKR2A und AKR2B mit chloroplastidären Membranproteinen interagieren (Bae et al., 2008). In Tabak ist die Interaktion zwischen dem homologen Ankyrin-repeat Protein NtANK1 und dem bZIP-Transkriptionsfaktor NtBZI-1 gut charakterisiert (Böttner et al., 2009; Kuhlmann et al., 2003). In dieser Arbeit sollte getestet werden, ob in Arabidopsis AKR2A und AKR2B mit einem zu NtBZI-1 homologen bZIP-Transkriptionsfaktor interagieren, da das Modellsystem Tabak Limitierungen hat im Vergleich zu Arabidopsis. Da das Genom nicht vollständig sequenziert ist, stehen keine T-DNA-Insertionsmutanten zur Komplementierung zur Verfügung, ebensowenig wie Microarrays zur Durchführung von Transkriptomanalysen.

Die Arabidopsis Proteine, die die höchste Homologie zu NtBZI-1 zeigen, sind die bZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppe C (bZIP9, bZIP10, bZIP25, bZIP63). Um die Interaktion zwischen den bZIP-Faktoren und den Ankyrin-repeat Proteinen in allen möglichen Kombinationen zu testen, wurden verschiedene experimentelle Systeme verwendet, und zwar Y2H, P2H und BiFC. Die beiden letzten Methoden haben den Vorteil, dass sie *in planta* Methoden sind, bei allen drei Methoden ist der Nachteil, dass Fusionsproteine getestet werden müssen. Durch die Fusion kann sich die dreidimensionale Struktur des zu untersuchenden Proteins ändern, oder der Anhang könnte die Interaktionsdomäne beeinflussen. Deshalb wurde beispielhaft für bZIP10 auch die C-terminale Fusion im BiFC getestet, sonst waren alle Proteine mit N-terminalen Fusionen versehen. Eine alternative Methode, bei der keine Fusionsproteine benötigt werden, ist z.B. Co-Immunpräzipitation (Co-IP), bei der Proteinkomplexe mithilfe eines an festes Substrat gebundenen Antikörpers aus dem Zellextrakt gefällt werden können.

Für die Arabidopsis Proteine konnte keine Interaktion detektiert werden. Da die Tabak Proteine in allen drei oben beschriebenen experimentellen Systemen miteinander interagieren, stellte sich die Frage, ob es in Tabak spezielle Bedingungen geben könnte, wie z.B. pH-Wert, andere Proteine oder Proteinmodifizierungen, die für die Interaktion essentiell sind, in Arabidopsis aber fehlen. Dies konnte nicht bestätigt werden, da die Arabidopsis Proteine nicht im P2H-System mit Tabak-Mesophyll-Protoplasten interagieren, die Tabak Proteine jedoch auch in Arabidopsis-Mesophyll-Protoplasten interagieren. Die Kombination von Tabak und Arabidopsis Proteinen in Arabidopsis-Protoplasten zeigte, dass die Arabidopsis Ankyrin-repeat Proteine AKR2A und AKR2B mit NtBZI-1 interagieren können, die Arabidopsis bZIP-Faktoren der Gruppe C jedoch nicht mit NtANK1 interagieren können. Das zeigt, dass sich insbesondere die bZIP-Proteine aus Tabak und Arabidopsis unterscheiden und unterschiedliche Funktionen ausüben können. Da Proteine oft mehrere Funktionen haben, ist nicht auszuschließen, dass es auch übereinstimmende Funktionsbereiche gibt. Ein anderer Grund für die verschiedenen Interaktionseigenschaften könnten verschiedene Proteinmodifikationen in den beiden Pflanzen sein.

In der Literatur ist ein trimerer Komplex beschrieben aus dem Heterodimer bZIP10/bZIP53 und ABI3, der in drei Systemen (P2H, Y2H und BiFC) nachgewiesen werden konnte (Alonso et al., 2009). Um die Bildung eines trimeren Komplexes mit den AKR2-Proteinen zu testen, wurden AKR2A und AKR2B zu bZIP10 und bZIP53 im Protoplasten-System zugegeben. Die starke Reporteraktivierung durch das Heterodimer bZIP10/bZIP53 (Ehlert et al., 2006) konnte durch Zugabe von AKR2A oder AKR2B verstärkt werden. Allerdings konnte diese potentielle Komplexbildung weder in Hefe noch mit BiFC reproduziert werden, was die Entstehung eines trimeren Komplexes unwahrscheinlich macht.

Die Protein-Protein-Interaktionen zwischen den beschriebenen Ankyrin-repeat Proteinen und den bZIP-Transkriptionsfaktoren unterscheiden sich also in Tabak und Arabidopsis. Daraus wird ersichtlich, dass Daten, die in einer Pflanzenspezies gewonnen wurden, nicht ohne weiteres auf homologe Proteine einer anderen Pflanzenspezies übertragen werden können. Die in Tabak für den Proteinkomplex NtBZI-1/NtANK1 beschriebene Funktion in der Auxin-vermittelten Transkriptionskontrolle wird in Arabidopsis unterschiedlich reguliert.

6.2 Mehrere zelluläre Lokalisationen von AKR2A und AKR2B (Cytoplasma, Kern und Chloroplastenmembran) deuten auf multiple Funktionen hin

Die Lokalisation von AKR2A und AKR2B im Cytoplasma konnte durch Expression von YFP-Fusionsproteinen bestätigt werden, wie es schon für NtANK1 beschrieben wurde (Böttner et al., 2009). Dazu wurden sowohl Arabidopsis-Protoplasten als auch *Nicotiana benthamiana* Epidermiszellen transient transformiert. Dabei ist deutlich zu erkennen, dass sich die AKR2-Proteine nicht im Kern befinden. Da für das homologe Protein NtANK1 eine Stimulus-abhängige Lokalisation auch im Kern beschrieben ist (Böttner et al., 2009), wurde dies für AKR2A und AKR2B ebenfalls getestet. Ein Sequenzvergleich zeigte, dass AKR2A und AKR2B eine Leucin-reiche Sequenz am C-Terminus besitzen, wie sie in Haasen et al. (1999) als NES beschrieben ist. In Arabidopsis bindet Exportin 1 (XPO1) an eine solche NES und vermittelt den Kernexport des Proteins mit der NES. Der Inhibitor LMB kann diese Bindung verhindern und so den XPO1-vermittelten Kernexport hemmen (Haasen et al., 1999). Sowohl nach Zugabe des Kernexport-Inhibitors LMB, als auch durch Mutation der putativen NES akkumulieren AKR2A und AKR2B im Kern. Das YFP-Signal war deutlich sowohl im Kern als auch im Cytoplasma zu erkennen. Daraus lässt sich schließen, dass beide Proteine eine funktionsfähige NES besitzen, die unter normalen Bedingungen dafür sorgt, dass die Proteine effektiv aus dem Kern exportiert werden und deshalb dort nicht akkumulieren können.

Welche natürlichen Bedingungen könnten zu einer Akkumulation im Kern führen?

In Tabak führte auch die Zugabe von Auxin zu einer Anhäufung von NtANK1 im Kern (Böttner et al., 2009). Für AKR2A und AKR2B konnte das in Protoplasten nicht bestätigt werden. In Peck et al. (2001) ist beschrieben, dass AKR2B innerhalb von wenigen Minuten nach Zugabe des bakteriellen Elicitors flg22 oder Chitin, einem pilzlichen Elicitor, phosphoryliert wird. Auch NtBZI-1, der Interaktionspartner von NtANK1, wird phosphoryliert, und zwar nach Infektion mit *Pseudomonas syringae* (Kuhlmann et al., 2002). Eine Phosphorylierung als Proteinmodifikation von AKR2A und AKR2B nach einem natürlichen Stimulus ist also nicht unwahrscheinlich. Laut dem Programm NetPhos 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) gibt es im AKR2A-Protein mehrere putative Phosphorylierungsstellen: 15 mal Serin, 3 mal Threonin, 2 mal Tyrosin. Diejenigen mit der höchsten Wahrscheinlichkeit sind mehrere Serin-Aminosäuren am N-Terminus des Proteins. Dort befindet sich die

PEST-Domäne, die schon als Phosphorylierungsort beschrieben wurde (Verma und Stevenson, 1997). Da die Phosphorylierung eines Proteins aufgrund der Polarität des Phosphatrests oft eine Konformationsänderung zur Folge hat, wäre es denkbar, dass beim phosphorylierten Protein die NES nicht mehr funktionstüchtig ist (Poirier und Bucher, 2002). Somit könnte eine Phosphorylierung von AKR2A und AKR2B unter natürlichen Bedingungen ein Grund für deren Kernlokalisierung sein. Um diese These experimentell zu bestätigen, könnten potentielle Phosphorylierungsstellen mutiert werden und die Lokalisation der erhaltenen Proteine überprüft werden.

In der Veröffentlichung Bae et al. (2008) wird gezeigt, dass AKR2A an die äußere Chloroplastenmembran bindet. Dazu wurden verschiedene Experimente durchgeführt. Bei der Aufreinigung von Chloroplasten aus dem Arabidopsis-Gesamtzellextrakt, konnte AKR2A in der Chloroplastenfraktion detektiert werden. Transformierte Protoplasten, die T7-AKR2A exprimierten, zeigten nach Immundetektion mit dem T7-Antikörper eine Färbung in der Chloroplastenmembran, und zwar die gleiche Färbung wie das chloroplastidäre Membranprotein Toc159. Fluoreszenzbilder zur Lokalisation von YFP-AKR2A/B wurden von Bae et al. (2008) nicht gezeigt, so dass nicht auszuschließen ist, dass sie mit einem solchen experimentellen Ansatz die gleiche cytoplasmatische Lokalisation, wie oben beschrieben, erhalten hätten. Bae et al. (2008) schlussfolgern aus ihren Ergebnissen, dass AKR2A und AKR2B im Cytoplasma an neu synthetisierte OEPs binden, sie zum Chloroplasten transportieren und deren Insertion in die Membran unterstützen. AKR2A/B haben dabei auch eine Chaperon-Funktion, um Aggregation der OEPs zu verhindern (Bae et al., 2008). Um allgemein die Fähigkeit von AKR2A zu zeigen, andere Proteine zu einem Organell zu transportieren wurde interessanterweise der Kerntransport verwendet: Das Chloroplastenmembranprotein OEP7 zeigte als GFP-Fusion keine Organellen-spezifische Lokalisation. Wenn aber gleichzeitig AKR2A als NLS-Fusion exprimiert wurde, waren beide Proteine, OEP7 und AKR2A, kernlokalisiert (Bae et al., 2008). Anstelle der NLS-Fusion könnte diese Aufgabe evtl. auch von der außer Funktion gesetzten NES von AKR2A übernommen werden, wodurch AKR2A ebenfalls im Kern lokalisiert wäre.

Für AKR2A und AKR2B wurden also verschiedene zelluläre Lokalisationen gezeigt: im Cytosol verteilt, gebunden an die äußere Chloroplastenmembran und nach Inhibierung des Kernexports im Kern. Die Proteine könnten also multiple Funktionen an den multiplen Lokalisationen ausführen. Dafür spricht auch, dass in der Literatur

verschiedene Protein-Interaktionspartner für AKR2A/B beschrieben worden sind: die chloroplastidären Membranproteine OEP7 und OEP64 (Bae et al., 2008); das 14-3-3 Protein At5g10450, 14-3-3 Proteine haben oft regulatorische Funktionen durch Protein-Protein-Interaktion mit phosphorylierten Partnern (Yan et al., 2002; Van Heusden, 2009; Oecking und Jaspert, 2009); die Ascorbat-Peroxidase 3 (APX3; Yan et al., 2002); Transkriptionsfaktoren, die im Y2H gefunden wurden (I. Hwang (Pohang, Korea), persönliche Mitteilung); und das homologe Tabak-Protein NtANK1 interagiert mit dem bZIP-Transkriptionsfaktor NtBZI-1 (Böttner et al., 2009). In einer Veröffentlichung, die direkt vor der Fertigstellung dieser Arbeit erschien, wurden noch andere Interaktionspartner von AKR2A und AKR2B identifiziert, und zwar 5 weitere Membranproteine: APX5 (Peroxisom), Toc34 (Chloroplast), CB5 und CB5R (Cytochrom b_5 (Reduktase), Mikrosom), Tom20 („translocase of the outer mitochondrial membrane“, Mitochondrium) (Shen et al., 2010, dieselbe Arbeitsgruppe wie Yan et al., 2002). Die Bindestelle bei all diesen Proteinen ist die Transmembrandomäne, jeweils mit einigen basischen Aminosäuren direkt folgend. Es liegt keine Sequenzhomologie dieser Bindestelle in den verschiedenen Proteinen vor, sondern die Struktur ist die gleiche. Die bZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppe C, die aufgrund ihrer Homologie zu NtBZI-1 als potentielle Interaktionspartner in Frage kamen, besitzen keine ähnlich strukturierte Bindestelle, da sie keine Transmembrandomäne haben.

Während Bae et al. (2008) Chaperonfunktion und den Transport OEPs zur äußeren Chloroplastenmembran als Funktionen für AKR2A/B postulieren, folgern Shen et al. (2010) aus ihren Ergebnissen, dass AKR2A auch als molekulares Chaperon für andere Membranproteine fungiert und diese zu den Membranen der verschiedenen Organellen transportiert (Peroxisom, ER, Mitochondrium). Außerdem wurde eine Kernlokalisierung von AKR2A bei konstitutiver Expression von GFP-AKR2A in transgenen Pflanzen, sowohl unter Kontrolle des 35S- als auch des endogenen AKR2A-Promotors, gezeigt (Shen et al., 2010). Da in dieser Arbeit ebenfalls eine Lokalisation von AKR2A und AKR2B im Kern detektiert werden konnte, könnten AKR2A/B auch Proteine zur Kernmembran oder in den Kern transportieren. Das macht eine Funktion im Kern für AKR2A/B plausibel. Im Kern könnten AKR2A/B z.B. mit einem Transkriptionsfaktor interagieren, und dadurch die Transkriptionskontrolle regulieren (Transkriptionsfaktoren als Interaktionspartner wurden gefunden, s.o.).

Eine weitere Spekulation wäre, dass die multiplen Lokalisationen auf eine Rolle von AKR2A/B im retrograden Signalweg vom Chloroplasten zum Kern hindeuten. Darunter versteht man die Kommunikation zwischen Chloroplast und Kern, bei der der Chloroplast seinen Status dem Kern vermittelt. Das ist nötig, weil 95% der Chloroplastenproteine kernkodiert sind und deren Genexpression dem Bedarf entsprechend koordiniert werden muss (Pesaresi et al., 2007). Nach dem Import in den Chloroplast bilden die kernkodierten Plastidenproteine zusammen mit plastidenkodierten Proteinen Multiproteinkomplexe, wie z.B. Photosysteme und metabolische Enzyme. Bisher sind drei chloroplastidäre Prozesse beschrieben, die retrograde Chloroplastensignale auslösen:

(1) Störungen im Tetrapyrrol-Biosyntheseweg, der u.a. zur Bildung von Chlorophyll führt, ausgelöst z.B. durch das Herbizid Norflurazon, führen zur reduzierten Expression von kernkodierten Chlorophyll-bindenden Proteinen (LHCA und LHCB, „light harvesting complex“). Es ist noch nicht geklärt, ob ein Intermediat aus dem Tetrapyrrol-Syntheseweg (Mg-ProtoporphyrinIX) nach Norflurazon-Behandlung im Chloroplasten akkumuliert und als retrogrades Signal dient (Strand et al., 2003), oder das Signal indirekt durch ROS und einen veränderten Redoxstatus (s.u. (3)) im Chloroplasten initiiert wird (Moulin et al.; 2008). Denn von Moulin et al. (2008) konnte keine Akkumulation einer Tetrapyrrol-Zwischenstufe nach Norflurazon-Behandlung nachgewiesen werden.

(2) Hemmung der Plastidengen-Expression durch das Herbizid Lincomycin führt zur Repression der kernkodierten Photosynthese-Expression. Diese Antwort auf Plastidengen-Expression erfolgt nur an den ersten 3 Tagen der Keimlingentwicklung und ist lichtabhängig (Beck, 2005).

(3) Der chloroplastidäre Redox-Status, z.B. in Form des reduzierten oder oxidierten Plastochinon (PQ)-Pools oder ROS (H_2O_2), sind Signale, die zur Expression der gleichen kernkodierten Gene führen wie Starklicht (reduzierter PQ-Pool) und Schwachlicht (oxidiertes PQ-Pool) (Nott et al., 2006).

Im Allgemeinen entstehen diese Signale bei abnormaler Chloroplastenentwicklung und bei Stressbedingungen aus der Umwelt. Alle drei Signale führen zur Aktivierung des Proteins GUN1 („GENOMES UNCOUPLED1“), das im Chloroplast lokalisiert ist. Ein unbekannter Signalweg führt dann zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors ABI4 („ABA INSENSITIVE4“) im Kern, der die Expression der Zielgene des retrograden Signalwegs blockiert (Koussevitzky et al., 2007; Abb. 31). Durch einen unabhängigen

Signalweg reguliert GUN1 die Expression des Transkriptionsfaktors GLK1 („GOLDEN2-LIKE1“) im Kern herunter, so dass die kernkodierten Photosynthesegene reprimiert werden (Kakizaki et al., 2009). GLK1 ist also ein positiver Regulator des retrograden Signalwegs (Kakizaki et al., 2009; Abb. 31).

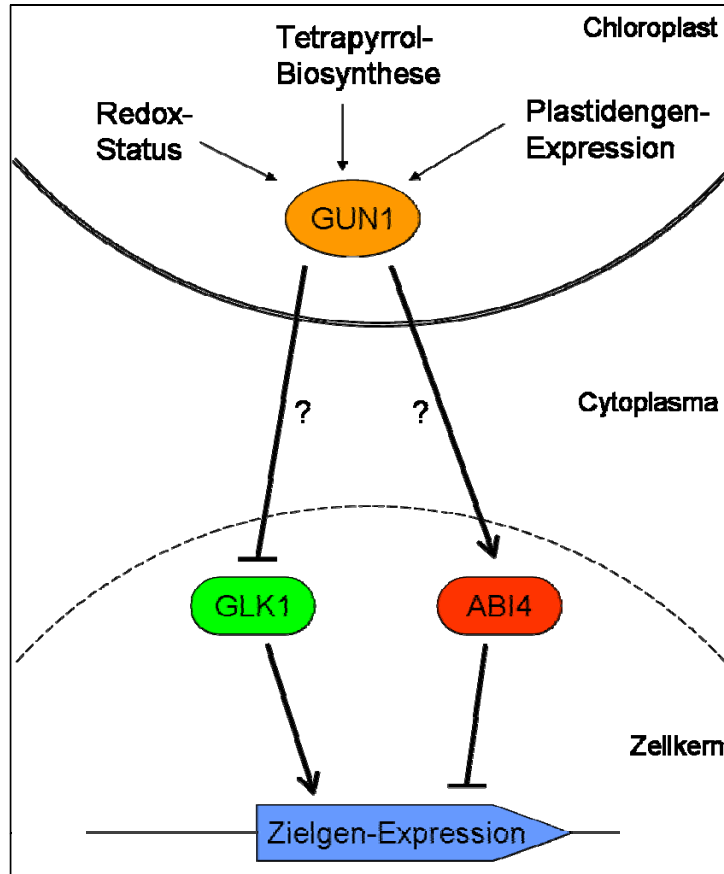


Abbildung 31: Modell zur Zielgen-Expression des retrograden Transports vom Chloroplasten zum Zellkern. Drei verschiedene Signale, die bei beeinträchtigter Chloroplastenentwicklung oder Stressbedingungen entstehen, aktivieren GUN1 im Chloroplasten. GUN1 teilt diesen Status auf unbekanntem Weg (?) dem Zellkern mit, wodurch die Transkriptionsfaktoren GLK1 und ABI4 reprimiert bzw. aktiviert werden und die Zielgen-Expression regulieren (modifiziert nach Zhang, 2007; Kakizaki et al., 2009).

Aufgrund der oben diskutierten Ergebnisse zur Lokalisation von AKR2A und AKR2B, kann spekuliert werden, dass AKR2A/B Signalüberträger des retrograden Transports von der Chloroplastenmembran bis in den Zellkern sind, wo die Transkriptionsfaktoren reguliert werden (? in Abb. 31). Dabei könnten sie entweder selbst das Signal übertragen, oder ein Signalprotein transportieren, wie es für die chloroplastidären Membranproteine gezeigt wurde.

Ein Experiment zur Prüfung dieser These könnte die Schädigung der Chloroplasten sein, um dann zu testen, ob sich die AKR2-Proteine im Kern anreichern. Dazu könnten z.B. die Herbizide Norflurazon oder Lincomycin verwendet werden, die speziell Abläufe im Chloroplasten inhibieren (Tetrapyrrol-Biosynthese bzw. Protein

Translation). Ein weiterer methodischer Ansatz, bei dem direkt die Funktion von AKR2A und AKR2B im Kern getestet werden könnte, wäre eine Überexpression von AKR2A/B mit mutierter NES in Pflanzen, die dann für Microarrays genutzt werden könnten, und deren Phänotyp untersucht werden könnte.

6.3 Die Überexpression von AKR2A führt zu keiner deutlichen phänotypischen Veränderung

Es wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene transgene Pflanzen hergestellt: Pro_{35S}:AKR2A, Pro_{35S}:AKR2B, AKR2-RNAi und *akr2b* Mutanten. Diejenigen, die einen sichtbaren Phänotyp zeigten, waren nur die AKR2-RNAi-Pflanzen.

Die Pro_{35S}:AKR2A Pflanzen wurden zum Vergleich mit für das Microarray eingesetzt, zeigten aber wesentlich weniger signifikant regulierte Gene als in den RNAi Pflanzen. Obwohl auch in diesem Fall besonders viele Gene hochreguliert sind, die der Annotation „Antwort auf einen Stimulus“ zugeordnet sind, konnte bei den Pro_{35S}:AKR2A Pflanzen keine veränderte Antwort auf die getesteten Stressbedingungen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Über den Grund, weshalb viele Gene in den RNAi und den Pro_{35S} Pflanzen gleich reguliert sind, kann hier nur spekuliert werden. Es scheint, als ob eine bestimmte Menge an AKR2A-Protein in der Pflanze benötigt wird, und wenn diese Menge weit über- oder unterschritten wird, führt dies zu einer Deregulation der Genexpression.

6.4 AKR2-RNAi Pflanzen zeigen reduziertes Wachstum und eine beeinträchtigte Chloroplasten-Biogenese

Die AKR2-RNAi-Pflanzen zeigen einen sichtbaren Phänotyp. Sie sind kleiner, sowohl die Blattfläche als auch die Höhe des Blütenstandes, ihr Blattgrün ist heller als im Wildtyp, und sie haben ein reduziertes Samengewicht, jeweils in Abhängigkeit der Proteinmenge. Bei zwei verwendeten Linien konnte kein AKR2A/B-Protein im Western-Blot nachgewiesen werden, zwei andere Linien zeigen eine geringe Proteinmenge, d.h. deutlich weniger als der Wildtyp. Im Microarray ist zusätzlich noch zu erkennen, dass der RNAi-Effekt spezifisch ist, da die beiden am stärksten herunterregulierten Gene *AKR2A* und *AKR2B* sind und keine weiteren homologen Ankyrin-repeat Proteine herunterreguliert sind. In der Veröffentlichung Yan et al. (2002) werden AKR2-Antisense Pflanzen beschrieben, die einen ganz anderen Phänotyp zeigen. Die Pflanzen zeigen, ebenfalls in Abhängigkeit der verbliebenen

AKR2A/B-Proteinmenge, einen Nekrose-Phänotyp, d.h. die Blätter zeigen nekrotische Flecken, die auf eine Überproduktion von H_2O_2 zurück zu führen sind. Außerdem wurden erhöhte Transkripte von *PR-1* und *GST6* detektiert und die Pflanzen zeigten erhöhte Resistenz gegen eine Infektion mit *P. syringae*. Der von Yan et al. (2002) verwendete Arabidopsis-Ökotyp ist C24, während in dieser Arbeit der Ökotyp Col-0 verwendet wurde. Beim Versuch die Daten von Yan et al. (2002) zu reproduzieren, wurden ebenfalls AKR2-RNAi Pflanzen im C24-Hintergrund hergestellt, diese zeigten allerdings keinen sichtbaren Phänotyp. Da außerdem eine Infektion der AKR2-RNAi Pflanzen mit *P. syringae* das Gegenteil, nämlich eine höhere Suszeptibilität, zeigte und Interaktionsdaten von Yan et al. (2002) nicht reproduziert werden konnten (Daten nicht gezeigt), wurden die Daten von Yan et al. (2002) nicht weiter zu Rate gezogen.

Ein Grund für die Herstellung von AKR2-RNAi Pflanzen war, dass nur eine *akr2b*-Mutante erhältlich ist, und keine *akr2a*-Mutante, so dass auch keine Doppelmutanten, in denen die beiden homologen Gene nicht exprimiert werden, erstellt werden konnten. Die hohe Homologie lässt eine Redundanz der Gene vermuten, was durch den unauffälligen Phänotyp der *akr2b*-Mutante (wie Wildtyp) bestätigt wird. Das Fehlen einer *akr2a*-Mutante legt allerdings nahe, dass eine solche Mutation letal ist und *AKR2B* nicht das Fehlen von *AKR2A* komplementieren kann. Die beiden Proteine haben also wahrscheinlich auch unterschiedliche Funktionen (Shen et al., 2010).

In einer anderen Arbeitsgruppe wurden ebenfalls AKR2-RNAi Pflanzen hergestellt. In Bae et al. (2008) werden Dexamethason-induzierbare AKR2-RNAi beschrieben. Im Wildtyp-Hintergrund zeigten diese Pflanzen keinen sichtbaren Phänotyp, im *akr2b*-Hintergrund führt Wachstum auf Dexamethason jedoch zu einem schwerwiegenden Phänotyp: die Pflanzen haben gelbe oder weiße Blätter und bleiben sehr klein. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen dieser Blätter sind stark beeinträchtigte Chloroplasten zu sehen, in denen statt Thylakoidmembranen mehrere Vesikel zu sehen sind (Bae et al., 2008). Es verwundert allerdings nicht, dass Pflanzen mit einem so ausgeprägten Phänotyp auch auf zellulärer Ebene stark beeinträchtigt sind. Pflanzen mit einem weniger stark ausgeprägten Phänotyp, wie die in dieser Arbeit hergestellten AKR2-RNAi Pflanzen, könnten sich besser eignen, um die zelluläre Organisation zu untersuchen. Tatsächlich zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen von Blättern dieser AKR2-RNAi Pflanzen, dass sich die Chloroplasten

von denen im Wildtyp unterscheiden. Die Thylakoidmembranen in den AKR2-RNAi Pflanzen sind lockerer gepackt und dazwischen befinden sich Vesikel-ähnliche Strukturen (ohne Membran). Die Chloroplasten-Biogenese scheint also beeinträchtigt zu sein und spiegelt sich im reduzierten Chlorophyllgehalt und der helleren Farbe der AKR2-RNAi Pflanzen wider.

Zur Analyse der Funktionsfähigkeit der Chloroplasten könnten Messungen der Photosyntheserate durchgeführt werden. Dazu kann ein Gaswechselanalysegerät verwendet werden, oder die Chlorophyll-Fluoreszenz mithilfe eines „Imaging-PAM“ Fluorometers gemessen werden (Oxborough 2004).

Es wurden auch elektronenmikroskopische Aufnahmen von Blättern der Tabak NtANK1-RNAi Pflanzen gemacht, in denen eine ganz ähnliche lockere Packung der Thylakoidmembranen mit Vesikel-ähnlichen Strukturen zu sehen ist. Deshalb kann vermutet werden, dass NtANK1 ebenfalls eine Rolle in der Chloroplasten-Biogenese spielt und somit NtANK1 und AKR2A/B eine ähnliche Funktion in Tabak bzw. Arabidopsis ausüben. Es könnte sein, dass NtANK1 die in Böttner et al. (2009) beschriebene Funktion in der Auxin-vermittelten Transkriptionskontrolle zusammen mit NtBZI-1 zusätzlich zu der Rolle in der Chloroplasten-Biogenese hat. Wenn AKR2A und AKR2B in allen Bereichen eine ähnliche Funktion haben sollten wie NtANK1, dann könnten andere Transkriptionsfaktoren, die nicht homolog zu NtBZI-1 sind und hier deshalb nicht getestet wurden, mit AKR2A und AKR2B interagieren (im Y2H identifiziert, I. Hwang, persönliche Mitteilung). Es wäre auch möglich, dass es in Arabidopsis einen zusätzlichen Proteinpartner für die Interaktion mit den Gruppe C bZIP-Transkriptionsfaktoren gibt, der bisher noch nicht gefunden wurde, aber essentiell für die zu Tabak homologe Interaktion ist.

Bae et al. (2008) erklären die Beeinträchtigung der Chloroplasten-Biogenese damit, dass bei reduzierter AKR2A/B-Proteinmenge die chloroplastidären Membranproteine nicht mehr in ausreichender Menge zur äußeren Chloroplastenmembran transportiert werden können. Dadurch kann die Membranintegrität geschädigt werden und der Import in den Chloroplasten könnte nicht mehr ausreichend funktionieren.

Die AKR2-RNAi Pflanzen aus dieser Arbeit zeigen einen ähnlichen Phänotyp wie die in Bae et al. (2008) beschriebenen. Obwohl dies auch auf eine beeinträchtigte Chloroplasten-Biogenese schließen lässt, waren im Microarray mit den AKR2-RNAi Pflanzen keine entsprechenden Gene herunterreguliert. Auch bei den GO-Annotationen sind Chloroplasten nicht überrepräsentiert. Dazu wäre evtl. eine

stärkere Reduktion der AKR2-Proteine nötig, wie sie in Bae et al. (2008) erzielt wurde, obwohl im Western Blot in den AKR2-RNAi Linien #6 und #8 schon kein Protein detektierbar ist. Es sind allerdings besonders viele mitochondriale Gene hochreguliert, was durch den Stress erklärt werden kann, dem die Pflanzen aufgrund der beeinträchtigten Chloroplasten unterliegen. Dafür spricht auch, dass viele Stress- oder Stimulus-induzierte Gene heraufreguliert sind.

Besonders viele der herunterregulierten Gene sind in der Membran annotiert, allerdings gehören die meisten davon zum Endomembransystem und nicht zur Chloroplastenmembran. Es kann also sein, dass AKR2A/B auch für den Transport zu anderen Membranen als der Chloroplastenmembran zuständig sind. Bae et al. (2008) haben hierzu nur gezeigt, dass AKR2A/B nicht mit zwei mitochondrialen und einem peroxisomalen Membranprotein interagieren, Proteine des Endomembransystems wurden nicht getestet. Die Überrepräsentation von Lipidbindung und Lipidtransport bei den herunterregulierten Genen deutet zusätzlich auf eine Beteiligung an Membranabläufen hin. Deshalb besteht die Möglichkeit, dass Proteine von AKR2A/B auch zu anderen als der äußeren Chloroplastenmembran transportiert werden. Dafür kommen aufgrund der im Microarray regulierten Gene die Mitochondrienmembran und das Endomembransystem (mit Endoplasmatischem Reticulum, Golgi Apparat, Vesikel, Zellmembran, Kernmembran) infrage, insbesondere also die Kernmembran, da AKR2A und AKR2B auch im Kern lokalisiert sein können. Um diese Möglichkeit zu testen, wäre es sinnvoll, einen Y2H-„Screen“ durchzuführen, bei dem mögliche Interaktionspartner, d.h. auch zu transportierende Proteine, gefunden werden könnten. Dabei müsste allerdings erst ein Derivat von AKR2A oder AKR2B gefunden werden, das keine so hohe Autoaktivierung in Hefe zeigt, oder ein anderer Hefestamm, in dem BD-AKR2-Fusionen keine Autoaktivierung zeigen.

Dass auch die Antwort auf Auxin besonders häufig herunterreguliert ist, passt zu den Daten von NtANK1 aus Tabak (Böttner et al., 2009). Jedoch konnte für die AKR2-RNAi Pflanzen nie eine abweichende Reaktion auf Auxin festgestellt werden, verglichen mit dem Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Dazu war das Wurzellängenwachstum auf verschiedenen Auxinkonzentrationen getestet worden und die Zugabe von Auxin zu Protoplasten bei Lokalisationsuntersuchungen.

6.5 Die erhöhte Stressanfälligkeit der AKR2-RNAi Pflanzen könnte ein sekundärer Effekt sein

Es gibt in der Literatur verschiedene Hinweise, dass AKR2A und AKR2B an der Antwort auf Stress beteiligt sind: für AKR2A-Antisense Pflanzen wurde erhöhte Resistenz gegenüber *P. syringae* und H₂O₂-Produktion in Blättern beschrieben (Yan et al., 2002); für AKR2B wurde eine Phosphorylierung nach flg22- oder Chitin-Stimulus nachgewiesen (Peck et al., 2001).

Auch die Ergebnisse des Microarrays lassen eine Beteiligung an der Stress-Antwort vermuten, da sehr viele Stimulus-induzierte Gene, insbesondere die *PDF1.x*-Gene heraufreguliert sind. Deshalb wurden die AKR2-RNAi Pflanzen verschiedenen Stressbedingungen unterzogen: oxidativer Stress (Wachstum in Sterilkultur mit verschiedenen Konzentrationen des Herbizids Paraquat), Infektion mit dem biotrophen Bakterium *P. syringae* und Infektion mit dem nekrotrophen Pilz *B. cinerea*. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Pflanzen anfälliger gegenüber allen drei Bedingungen waren als der Wildtyp. Die *akr2b*-Mutante zeigte meist eine etwas erhöhte Anfälligkeit, jedoch nicht so stark wie die RNAi Pflanzen. Eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber *P. syringae* widerspricht den Ergebnissen von Yan et al. (2002), die eine erhöhte Resistenz ihrer AKR2A-Antisense Pflanzen beschreiben. Diese Diskrepanz wurde weiter oben bereits diskutiert.

Für die Infektion mit *B. cinerea* wurde anfangs eine höhere Resistenz erwartet, da eine erhöhte Expression des JA-Markergens *PDF1.2* im Microarray der AKR2-RNAi Pflanzen detektiert worden war. Allerdings führt eine Überexpression von *PDF1.2* in Arabidopsis nicht zu einer veränderten Resistenz gegenüber nekrotrophen Pathogenen (J. Sels (Heverlee, Belgien), persönliche Mitteilung). Bei der näheren Analyse von *PDF1.2* in den AKR2-RNAi Pflanzen stellte sich heraus, dass es sich um keine konstitutive *PDF1.2*-Expression handelt, sondern dass diese im Tagesverlauf schwankt und vormittags deutlich stärker ist. Daher kann angenommen werden, dass die erhöhte *PDF1.2*-Expression zu Beginn der Lichtphase stattfindet, weil die Pflanzen dann Stress durch die beginnende Belichtung unterliegen. Damit können sowohl die erhöhte *PDF1.2*-Expression als auch die erhöhte Anfälligkeit gegenüber den drei getesteten Stressbedingungen sekundärere Effekte zu sein, die sich aus der beeinträchtigten Chloroplasten-Biogenese ergeben. Dadurch wären die AKR2-RNAi Pflanzen in ihrer allgemeinen Fitness herabgesetzt sind, was sich in deren geringerem Samengewicht widerspiegelt. Die andere Möglichkeit ist, dass es

sich bei *PDF1.2*-Expression und erhöhter Anfälligkeit um einen direkten Effekt der reduzierten AKR2A/B-Proteinmenge handelt. In Wildtyp Pflanzen führen PAMPs („pathogen associated molecular patterns“) zur Phosphorylierung von AKR2B (Peck et al., 2001). Diese Phosphorylierung könnte die pflanzliche Pathogenabwehr aktivieren, evtl. durch Modifikation von Membranen mithilfe von Membranproteinen. In AKR2-RNAi Pflanzen kann AKR2B (und AKR2A) nicht phosphoryliert werden, so dass die potentielle Aktivierung der Abwehr nicht stattfinden kann, weshalb die Pflanzen suszeptibler gegenüber Pathogenen sind.

6.6 Modell der potentiellen Funktionen von AKR2A und AKR2B

Aus den oben diskutierten Ergebnissen konnte ein Modell erstellt werden, welche Funktionen AKR2A und AKR2B in der Zelle haben (Abb. 32). Demnach haben AKR2A/B eine Chaperonfunktion für Membranproteine und transportieren sie zu verschiedenen zellulären Kompartimenten (Bae et al., 2008; Shen et al., 2010). In Peck et al. (2001) wird eine Phosphorylierung von AKR2B nach flg22 oder Chitin-Behandlung beschrieben.

Abb. 32 zeigt, dass PAMPs von einem Rezeptor (R, orange) erkannt werden und ein Signal (gestrichelter Pfeil) führt zur Phosphorylierung (P) von AKR2 (steht für AKR2A und/oder AKR2B).

Desweiteren kann AKR2 an ein Protein (Pr, grün) im Cytoplasma binden, und daraufhin dieses zu verschiedenen Organellen transportieren: Peroxisomen, Mitochondrium, ER, Kern und Chloroplast. Experimentell bestätigt wurde der Transport zum Peroxisom und zum Chloroplast (Bae et al., 2008; Shen et al., 2010), die anderen Transportwege sind mit einem ? versehen. Am Chloroplast wird gezeigt, dass das Protein nach dem Transport in die äußere Chloroplastenmembran inseriert wird (Abb. 32). Aufgrund der bestätigten Kernlokalisierung von AKR2A/B ist für den Kern auch in Co-Transport eines Proteins in den Kern hinein denkbar, nicht nur in die Membran.

Eine weitere putative Funktion von AKR2A/B beginnt mit einem Signal, das den Chloroplasten betrifft (roter Blitz) z.B. durch Stressbedingungen. AKR2 könnte das entstehende retrograde Signal vom Chloroplasten zum Kern übertragen und dann in den Kern transportiert werden. Im Kern könnte AKR2 die Transkription regulieren, z.B. durch Interaktion mit einem Transkriptionsfaktor (TF). Der Kernexport von AKR2,

der unter normalen Bedingungen aufgrund der NES stattfindet, kann durch LMB-Behandlung inhibiert werden (Abb. 32).

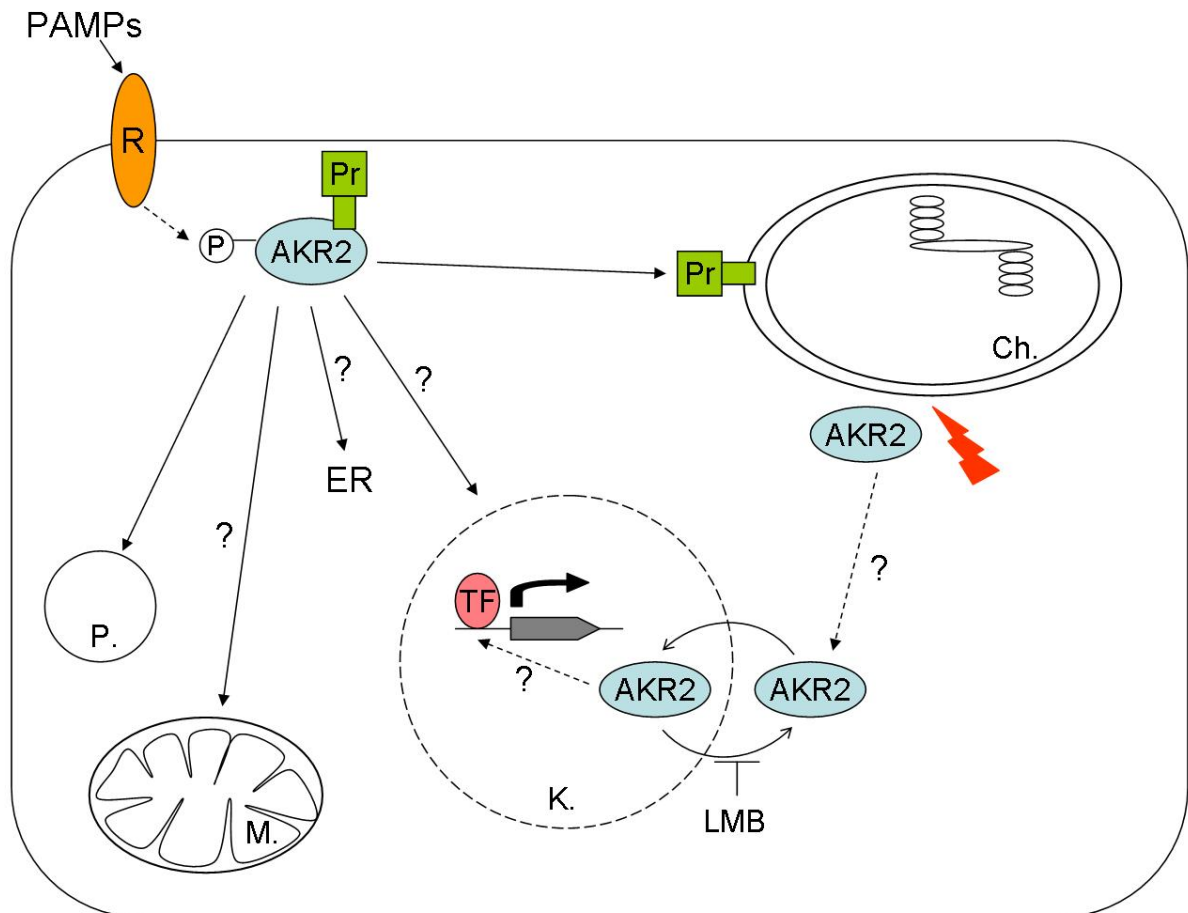


Abbildung 32: Modell der Funktionen von AKR2A und AKR2B in der Zelle. Beschreibung s. Text. Gestrichelte Pfeile bedeuten Signale, durchgehende Pfeile heißt Transport. Abkürzungen: PAMPs: „pathogen associated molecular patterns“, R: Rezeptor, P: Phosphorylierung, Pr: Protein, AKR2: AKR2A und AKR2B, M.: Mitochondrium, P.: Peroxisom, ER: Endoplasmatisches Reticulum, TF: Transkriptionsfaktor, K.: Kern, Ch.: Chloroplast, LMB: Leptomycin B, ?: nicht experimentell überprüfte Funktionen

7 Literatur

- Aerts A.M., François I.E., Cammue B.P., Thevissen K. (2008): The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins. *Cell Mol Life Sci.* **65**: 2069-79
- Albert S., Després B., Guillemint J., Bechtold N., Pelletier G., Delseny M., Devic M. (1999): The EMB 506 gene encodes a novel ankyrin repeat containing protein that is essential for the normal development of *Arabidopsis* embryos. *Plant J.* **17**: 169-79
- Alonso J.M., Stepanova A.N., Leisse T.J., Kim C.J., Chen H., Shinn P., Stevenson D.K., Zimmerman J., Barajas P., Cheuk R., Gadriab C., Heller C., Jeske A., Koesema E., Meyers C.C., Parker H., Prednis L., Ansari Y., Choy N., Deen H., Geralt M., Hazari N., Hom E., Karnes M., Mulholland C., Ndubaku R., Schmidt I., Guzman P., Aguilar-Henonin L., Schmid M., Weigel D., Carter D.E., Marchand T., Risseuw E., Brogden D., Zeko A., Crosby W.L., Berry C.C., Ecker J.R. (2003): Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**: 653-657
- Alonso R., Oñate-Sánchez L., Weltmeier F., Ehlert A., Diaz I., Dietrich K., Vicente-Carbajosa J., Dröge-Laser W. (2009): A Pivotal Role of the Basic Leucine Zipper Transcription Factor bZIP53 in the Regulation of *Arabidopsis* Seed Maturation Gene Expression Based on Heterodimerization and Protein Complex Formation. *Plant Cell* **21**: 1747-61
- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402
- Arabidopsis Genome Initiative (2000): Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815
- Ashburner M., Ball C.A., Blake J.A., Botstein D., Butler H., Cherry J.M., Davis A.P., Dolinski K., Dwight S.S., Eppig J.T., Harris M.A., Hill D.P., Issel-Tarver L., Kasarskis A., Lewis S., Matese J.C., Richardson J.E., Ringwald M., Rubin G.M., Sherlock G. (2000): Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat. Genet.* **25**: 25-9
- Bader S., Kühner S., Gavin A.C. (2008): Interaction networks for systems biology. *FEBS Lett.* **582**: 1220-4
- Bae W., Lee Y.J., Kim D.H., Lee J., Kim S., Sohn E.J., Hwang I. (2008): AKR2A-mediated import of chloroplast outer membrane proteins is essential for chloroplast biogenesis. *Nat Cell Biol.* **10**: 220-7
- Becerra C., Jahrmann T., Puigdomènech P., Vicient C.M. (2004): Ankyrin repeat-containing proteins in *Arabidopsis*: characterization of a novel and abundant group of genes coding ankyrin-transmembrane proteins. *Gene* **340**: 111-21

- Beck C.F. (2005) Signaling pathways from the chloroplast to the nucleus. *Planta* **222**: 743–756
- Bédard J. und Jarvis P. (2008): Green light for chloroplast outer-membrane proteins. *Nat Cell Biol.* **10**: 120-122
- Benito E.P., ten Have A., Klooster J.W. van 't, Kan J.A.L. van (1998): Fungal and plant gene expression during synchronized infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* **104**: 207-220
- Bennett V. und Chen L. (2001): Ankyrins and cellular targeting of diverse membrane proteins to physiological sites. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**: 61–67
- Bensmihen S., To A., Lambert G., Kroj T., Giraudat J., Parcy F. (2004): Analysis of an activated ABI5 allele using a new selection method for transgenic *Arabidopsis* seeds. *FEBS Letters* **561**: 127-31
- Bent A.F. (2000): *Arabidopsis* in planta transformation. Uses, mechanisms, and prospects for transformation of other species. *Plant Physiol.* **124**: 1540-7
- Bernard P., Kezdy K.E., Van Melder L., Steyaert J., Wyns L., Pato M.L., Higgins P.N., Couturier M. (1993): The F plasmid CcdB protein induces efficient ATP-dependent DNA cleavage by gyrase. *J Mol Biol.* **234**: 534-41
- Blom N., Gammeltoft S., Brunak S. (1999): Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol.* **294**: 1351-1362
- Bolton E.T. und McCarthy B.J. (1962): A general method for isolation of RNA complementary to DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **48**: 1390-1397
- Böttner S., Iven T., Carsjens C.S., Dröge-Laser W. (2009): Nuclear accumulation of the ankyrin repeat protein ANK1 enhances the auxin-mediated transcription accomplished by the bZIP transcription factors BZI-1 and BZI-2. *Plant J.* **58**: 914-26
- Bowler C., Van Camp W., Van Montagu M., Inze D. (1994): Superoxide dismutases in plants. *Crit. Rev. Plant Sci* **13**: 199–218
- Bradford M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254
- Brenner W. (2002): I. Etablierung eines induzierbaren Suizidsystems zur Identifizierung von Mutanten der salizylsäureabhängigen Signaltransduktion II. Expression von tierischen Signaltransduktionskomponenten in Tabak zur Herstellung eines induzierbaren Expressionssystems. Dissertation, Universität Göttingen
- Brent R. und Ptashne M. (1985): A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell.* **43**: 729-36

- Bucher G.L., Tarina C., Heinlein M., Di Serio F., Meins F., Iglesias V.A. (2001): Local expression of enzymatically active class I β -1,3-glucanase enhances symptoms of TMV infection in tobacco. *Plant J.* **28**: 361-369
- Cao H., Glazebrook J., Clarke J.D., Volko S., Dong X. (1997): The Arabidopsis NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell.* **88**: 57-63
- Chinchilla D., Merchan F., Megias M., Kondorosi A., Sousa C., Crespi M. (2003): Ankyrin protein kinases: a novel type of plant kinase gene whose expression is induced by osmotic stress in alfalfa. *Plant Mol Biol.* **51**: 555-66
- Chomczynski, P. (1993): A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques.* **15**: 532-4, 536-7
- Chomczynski P. und Sacchi N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* **162**: 156-9
- Church G.M. und Gilbert W. (1984): Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **81**: 1991-1995
- Clough S.J. und Bent A.F. (1998): Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**: 735-43
- Corrêa L.G.G., Riaño-Pachón D.M., Schrago C.G., Vicentini dos Santos R., Mueller-Roeber B., Vincentz M. (2008): The Role of bZIP Transcription Factors in Green Plant Evolution: Adaptive Features Emerging from Four Founder Genes. *PLoS ONE* **3**: e2944
- Dangl J.L., Dietrich R.A., Richberg M.H. (1996): Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* **8**: 1793-1807
- Dong X.N. (2004): NPR1, all things considered. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 547-552
- Drummond A.J., Ashton B., Cheung M., Heled J., Kearse M., Moir R., Stones-Havas S., Thierer T., Wilson A. (2009): Geneious v4.7. Available from <http://www.geneious.com/>
- Ehlert A., Weltmeier F., Wang X., Mayer C.S., Smeekens S., Vicente-Carbajosa J., Dröge-Laser W. (2006): Two-hybrid protein-protein interaction analysis in Arabidopsis protoplasts: establishment of a heterodimerization map of group C and group S bZIP transcription factors. *Plant J.* **46**: 890-900
- Fan J., Crooks C., Lamb C. (2008): High-throughput quantitative luminescence assay of the growth in planta of *Pseudomonas syringae* chromosomally tagged with *Photorhabdus luminescens* luxCDABE. *Plant J.* **53**: 393-9
- Feinberg A. P. und Vogelstein B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* **132**: 6-13

- Feinberg A. P. und Vogelstein B. (1984) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Addendum. *Anal Biochem* **137**: 266-7
- Ferrari S., Plotnikova J.M., De Lorenzo G., Ausubel F.M. (2003): *Arabidopsis* local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires EDS4 and PAD2, but not SID2, EDS5 or PAD4. *Plant J.* **35**: 193-205
- Feys B., Benedetti C.E., Penfold C.N., Turner J.G. (1994): *Arabidopsis* Mutants Selected for Resistance to the Phytotoxin Coronatine Are Male Sterile, Insensitive to Methyl Jasmonate, and Resistant to a Bacterial Pathogen. *Plant Cell.* **6**: 751-759
- Fields S. und Song O. (1989): A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature.* **340**: 245-6
- Fridborg I., Grainger J., Page A., Coleman M., Findlay K., Angell S. (2003): TIP, a novel host factor linking callose degradation with the cell-to-cell movement of Potato virus X. *Mol Plant Microbe Interact.* **16**: 132-40
- Garcion C., Guilleminot J., Kroj T., Parcy F., Giraudat J., Devic M. (2006): AKRP and EMB506 are two ankyrin repeat proteins essential for plastid differentiation and plant development in *Arabidopsis*. *Plant J.* **48**: 895-906
- Gasteiger E., Gattiker A., Hoogland C., Ivanyi I., Appel R.D., Bairoch A. (2003) ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* **31**: 3784-3788
- Giniger E., Varnum S.M., Ptashne M. (1985): Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell.* **40**: 767-74
- Govrin E.M. und Levine A. (2000): The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr. Biol.* **10**: 751–757
- Greene R. (2002): Oxidative Stress and Acclimation Mechanisms in Plants. The *Arabidopsis* Book. Rockville, MD: American Society of Plant Biologists. doi: 10.1199/tab.0036.1
- Guilfoyle T.J. und Hagen G. (2007): Auxin response factors. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**: 453–460
- 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
- Hagar H., Ueda N., Shah S.V. (1996): Role of reactive oxygen metabolites in DNA damage and cell death in chemical hypoxic injury to LLC-PK1 cells. *Am. J. Physiol.* **271**: 209–215

- Hanson J., Hanssen M., Wiese A., Hendriks M.M., Smeekens S. (2008): The sucrose regulated transcription factor bZIP11 affects amino acid metabolism by regulating the expression of ASPARAGINE SYNTHETASE1 and PROLINE DEHYDROGENASE2. *Plant J.* **53**: 935-49
- Hartings H., Maddaloni M., Lazzaroni N., Di Fonzo N., Motto M., Salamini F., Thompson R.D. (1989): The O2 gene which regulates zein deposition in maize endosperm encodes a protein with structural homologies to transcriptional activators. *EMBO J.* **8**: 2795–2801
- Hass C., Lohrmann J., Albrecht V., Sweere U., Hummel F., Yoo S.D., Hwang I., Zhu T., Schäfer E., Kudla J., Harter K. (2004): The response regulator 2 mediates ethylene signalling and hormone signal integration in *Arabidopsis*. *EMBO J.* **23**: 3290-302
- 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 elements in the promoters of phenylpropanoid pathway genes in vitro, but it is not involved in their regulation in vivo. *Mol Genet Genomics.* **267**: 16-26
- Heinekamp T., Strathmann A., Kuhlmann M., Froissard M., Müller A., Perrot-Rechenmann C., Dröge-Laser W. (2004): The tobacco bZIP transcription factor BZI-1 binds the GH3 promoter in vivo and modulates auxin-induced transcription. *Plant J.* **38**: 298-309
- Heldt H.W. (1999): Pflanzenbiochemie. 2. Aufl. Heidelberg: Spektrum
- Herrera-Estrella L., Depicker A., Van Montagu M., Schell J. (1992): Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Biotechnology.* **24**: 377-81
- Hill J., Donald K.A., Griffiths D.E. (1991): DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. *Nucleic Acids Res.* **19**. 5791
- Hofmann N.R., Theg S.M. (2005): Protein- and energy-mediated targeting of chloroplast outer envelope membrane proteins. *Plant J.* **44**: 917-27
- Hokema 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
- Hu C.D., Chinenov Y., Kerppola T.K. (2002): Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell.* **9**: 789-98

- Inoue H., Nojima H., Okayama H. (1990): High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. **96** 23-28
- Invitrogen (2001): Proquest Two-Hybrid System - Instruction Manual
- Ito H., Fukuda Y., Murata K., Kimura A. (1983): Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol.* **153**: 163-8
- Jakoby M., Weisshaar B., Dröge-Laser W., Vicente-Carbajosa J., Tiedemann J., Kroj T., Parcy F.; bZIP Research Group. (2002): bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* **7**: 106-11
- Kakizaki T., Matsumura H., Nakayama K., Che F.S., Terauchi R., Inaba T. (2009): Coordination of plastid protein import and nuclear gene expression by plastid-to-nucleus retrograde signaling. *Plant Physiol.* **151**: 1339-53
- Kaminaka H., Näke C., Epple P., Dittgen J., Schütze K., Chaban C., Holt B.F. 3rd, Merkle T., Schäfer E., Harter K., Dangl J.L. (2006): bZIP10-LSD1 antagonism modulates basal defense and cell death in *Arabidopsis* following infection. *EMBO J.* **25**: 4400-11
- Katagiri F., Thilmony R., He S.Y. (2002): The *Arabidopsis Thaliana-Pseudomonas Syringae* Interaction. The *Arabidopsis* Book. Rockville, MD: American Society of Plant Biologists. doi: 10.1199/tab.0039
- Kirby J. und Kavanagh T.A. (2002): NAN fusions: a synthetic sialidase reporter gene as a sensitive and versatile partner for GUS. *Plant J.* **32**: 391-400
- Kliebenstein D.J., Rowe H.C., Denby K.J. (2005): Secondary metabolites influence *Arabidopsis/Botrytis* interactions: variation in host production and pathogen sensitivity. *Plant J.* **44**: 25-36
- Koncz C. und Schell J. (1986): The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue specific expression chimeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *Mol Gen Genet.* **204**: 383-396
- Koornneef A., Leon-Reyes A., Ritsema T., Verhage A., Den Otter F.C., Van Loon L.C., Pieterse C.M. (2008): Kinetics of Salicylate-Mediated Suppression of Jasmonate Signaling Reveal a Role for Redox Modulation. *Plant Physiol.* **147**: 1358-68
- Koussevitzky S., Nott A., Mockler T.C., Hong F., Sachetto-Martins G., Surpin M., Lim J., Mittler R., Chory J. (2007): Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression. *Science*. **316**: 715-9
- 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 ANK1 and is important for BZI-1 function, both in auxin signaling and pathogen response. *J Biol Chem.* **278**: 8786-94

- Kyhse-Andersen 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**: 680-685
- Lam E., Kato N., Lawton M. (2001): Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature.* **411**: 848-853
- Lara P., Oñate-Sánchez L., Abraham Z., Ferrándiz C., Díaz I., Carbonero P., Vicente-Carbajosa J. (2003): Synergistic activation of seed storage protein gene expression in *Arabidopsis* by ABI3 and two bZIPs related to OPAQUE2. *J Biol Chem.* **278**: 21003-11
- Leon-Reyes A., Spoel S.H., De Lange E.S., Abe H., Kobayashi M., Tsuda S., Millenaar F.F., Welschen R.A., Ritsema T., Pieterse C.M. (2009): Ethylene modulates the role of NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES1 in cross talk between salicylate and jasmonate signaling. *Plant Physiol.* **149**: 1797-809
- Li H.M. und Chiu C.C. (2010): Protein Transport into Chloroplasts. *Annu Rev Plant Biol.* 2010 Feb 4. [Epub ahead of print]
- Locatelli S., Piatti P., Motto M., Rossi V. (2009): Chromatin and DNA modifications in the Opaque2-mediated regulation of gene transcription during maize endosperm development. *Plant Cell.* **21**: 1410-27
- Ma J. und Ptashne M. (1987): Deletion analysis of GAL4 defines two transcriptional activating segments. *Cell.* **48**: 847-53
- Mitsuda N. und Ohme-Takagi M. (2009): Functional analysis of transcription factors in *Arabidopsis*. *Plant & Cell Physiology* **50**:1232-48
- Mosavi L.K., Minor D.L. Jr, Peng Z.Y. (2002): Consensus-derived structural determinants of the ankyrin repeat motif. *Proc Natl Acad Sci USA.* **99**: 16029-34
- Mou Z., Fan W.H., Dong, X.N. (2003): Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* **113**: 935-944
- Moulin M., McCormac A.C., Terry M.J., Smith A.G. (2008): Tetrapyrrole profiling in *Arabidopsis* seedlings reveals that retrograde plastid nuclear signaling is not due to Mg-protoporphyrin IX accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA.* **105**: 15178–15183
- Mullineaux P., Ball L., Escobar C., Karpinska B., Creissen G., Karpinski S. (2000): Are diverse signalling pathways integrated in the regulation of arabidopsis antioxidant defence gene expression in response to excess excitation energy? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci* **355**:1531–40

- Mullis K.B. und Faloona F.A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-350
- Murashige und Skoog. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473-497
- Muth J.R., Muller S., Lohmer S., Salamini F., Thompson R.D. (1996): The role of multiple binding sites in the activation of zein gene expression by Opaque-2. *Mol. Gen. Genet.* **252**: 723–732
- Nott A., Jung H.S., Koussevitzky S., Chory J. (2006): Plastid-to-nucleus retrograde signaling. *Annu Rev Plant Biol.* **57**: 739-59
- Oecking C. und Jaspert N. (2009): Plant 14-3-3 proteins catch up with their mammalian orthologs. *Curr Opin Plant Biol.* **12**: 760-5
- Oxborough K. (2004): Imaging of chlorophyll *a* fluorescence: theoretical and practical aspects of an emerging technique for the monitoring of photosynthetic performance. *J of Experimental Botany* **55**: 1195-1205
- Pawson T. und Nash P. (2003): Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science.* **300**: 445-452
- Peck S.C., Nühse T.S., Hess D., Iglesias A., Meins F., Boller T. (2001): Directed proteomics identifies a plant-specific protein rapidly phosphorylated in response to bacterial and fungal elicitors. *Plant Cell.* **13**: 1467-75
- Pérez-Rodríguez P., Riaño-Pachón D.M., Corrêa L.G., Rensing S.A., Kersten B., Mueller-Roeber B. (2010): PlnTFDB: updated content and new features of the plant transcription factor database. *Nucleic Acids Res.* **38**: D822-7
- Pesaresi P., Schneider A., Kleine T., Leister D. (2007): Interorganellar communication. *Curr Opin Plant Biol.* **10**: 600-6
- Pfannschmidt T., Schutze K., Brost M., Oelmüller R. (2001): A novel mechanism of nuclear photosynthesis gene regulation by redox signals from the chloroplast during photosystem stoichiometry adjustment. *J. Biol. Chem.* **276**: 36125–30
- Pirone R., Hartings H., Lauria M., Rossi V., Motto M. (2005): Genetic control of endosperm development and of storage products accumulation on maize seeds. *Maydica.* **50**: 515–530
- Poirier Y. und Bucher M. (2002): Phosphate Transport and Homeostasis in Arabidopsis. The Arabidopsis Book. Rockville, MD: American Society of Plant Biologists. doi: 10.1199/tab.0024
- Rechsteiner M. und Rogers S.W. (1996): PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 267-271
- Riechmann J.L., Heard J., Martin G., Reuber L., Jiang C., Keddie J., Adam L., Pineda O., Ratcliffe O.J., Samaha R.R., Creelman R., Pilgrim M., Broun P., Zhang

- J.Z., Ghandehari D., Sherman B.K., Yu G. (2000): Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* **290**: 2105-2110
- Rogers S.O. und Bendich A.J. (1988): Extraction of DNA from plant tissues. *Plant Mol Biol Manual* **A6**:1-10
- Rook F., Gerrits N., Kortstee A., van Kampen M., Borrias M., Weisbeek P., Smeeckens S. (1998a): Sucrose-specific signalling represses translation of the *Arabidopsis* ATB2 bZIP transcription factor gene. *Plant J.* **15**: 253-63
- Rook F., Weisbeek P., Smeeckens S. (1998b): The light-regulated *Arabidopsis* bZIP transcription factor gene ATB2 encodes a protein with an unusually long leucine zipper domain. *Plant Mol Biol.* **37**: 171-8
- Sanger F., Nickler S., Coulson A.R. (1977): DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* **74**: 5463-5467
- 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.
- Schäffer A.A., Aravind L., Madden T.L., Shavirin S., Spouge J.L., Wolf Y.I., Koonin E.V. and Altschul S.F. (2001): Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements. *Nucleic Acids Res.* **29**: 2994-3005
- Sedgwick S.G. und Smerdon S.J. (1999): The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends Biochem. Sci.* **24**: 311–316
- Shen G., Kuppu S., Venkataramani S., Wang J., Yan J., Qiu X., Zhang H. (2010): ANKYRIN REPEAT-CONTAINING PROTEIN 2A Is an Essential Molecular Chaperone for Peroxisomal Membrane-Bound ASCORBATE PEROXIDASE3 in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* Mar 9. [Epub ahead of print]
- Strand A., Asami T., Alonso J., Ecker J.R., Chory J. (2003): Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrinIX. *Nature.* **421**: 79–83
- Strathmann A., Kuhlmann M., Heinekamp T., Dröge-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
- Swarbreck D., Wilks C., Lamesch P., Berardini T.Z., Garcia-Hernandez M., Foerster H., Li D., Meyer T., Muller R., Ploetz L., Radenbaugh A., Singh S., Swing V., Tissier C., Zhang P., Huala E. (2008): The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): gene structure and function annotation. *Nucleic Acids Res.* **36**: D1009-14

- Thomma B.P., Eggermont K., Penninckx I.A., Mauch-Mani B., Vogelsang R., Cammue B.P., Broekaert W.F. (1998): Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**: 15107-11
- Thomma B.P., Tierens K.F., Penninckx I.A., Mauch-Mani B., Broekaert W.F., Cammue B.P. (2001): Different micro-organisms differentially induce Arabidopsis disease response pathways. *Plant Physiol Biochem.* **39**: 673-680
- Thomma B.P., Cammue B.P., Thevissen K. (2002): Plant defensins. *Planta.* **216**: 193-202
- Tu S.L., Chen L.J., Smith M.D., Su Y.S., Schnell D.J., Li H.M. (2004): Import pathways of chloroplast interior proteins and the outer-membrane protein OEP14 converge at Toc75. *Plant Cell.* **16**: 2078-88
- Van Heusden G.P. (2009): 14-3-3 Proteins: insights from genome-wide studies in yeast. *Genomics.* **94**: 287-93
- Van Kan J.A. (2006): Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends Plant Sci.* **11**: 247-53
- Verma I. M. und Stevenson J. (1997): IkappaB kinase: beginning, not the end. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**: 11758–11760
- Vidal, M. (1997): The Reverse Two-Hybrid System in The Two-Hybrid System. Oxford University Press, New York, 109
- Walter M., Chaban C., Schütze K., Batistic O., Weckermann K., Näke C., Blazevic D., Grefen C., Schumacher K., Oecking C., Harter K., Kudla J. (2004): Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J.* **40**: 428-38
- Wei L. und Li Y. (2009): Distribution of an ankyrin-repeat protein on the endoplasmic reticulum in Arabidopsis. *J Integr Plant Biol.* **51**: 140-6
- Weltmeier F. (2005): Ein Netzwerk von heterodimerisierenden C/S1 AtbZIP-Transkriptionsfaktoren und seine Funktion in Seneszenz, Stressantwort und Samenentwicklung. Dissertation, Universität Göttingen
- Weltmeier F., Ehlert A., Mayer C.S., Dietrich K., Wang X., Schütze K., Alonso R., Harter K., Vicente-Carbajosa J., Dröge-Laser W. (2006): Combinatorial control of Arabidopsis proline dehydrogenase transcription by specific heterodimerisation of bZIP transcription factors. *EMBO J.* **25**: 3133-43
- Weltmeier F., Rahmani F., Ehlert A., Dietrich K., Schütze K., Wang X., Chaban C., Hanson J., Teige M., Harter K., Vicente-Carbajosa J., Smeekens S., Dröge-Laser W. (2009): Expression patterns within the Arabidopsis C/S1 bZIP transcription factor network: availability of heterodimerization partners controls

- gene expression during stress response and development. *Plant Mol Biol.* **69**: 107-19
- Wessel D. und Flügge U.I. (1984): A Method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical Biochemistry* **138**: 141-143
- White J., Chang S.Y., Bibb M.J. (1990): A cassette containing the bar gene of *Streptomyces hygrosopicus*: a selectable marker for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* **18**: 1062
- Wiese A., Elzinga N., Wobbes B., Smeekens S. (2004): A conserved upstream open reading frame mediates sucrose-induced repression of translation. *Plant Cell.* **16**: 1717–1729
- Wirdnam C., Motoyama A., Arn-Boulidoires E., van Eeden S., Iglesias A., Meins F. Jr. (2004): Altered expression of an ankyrin-repeat protein results in leaf abnormalities, necrotic lesions, and the elaboration of a systemic signal. *Plant Mol Biol.* **56**: 717-30
- Woodcock D.M., Crowther P.J., Doherty J., Jefferson S., Decruz E., Noyer Weidner M., Smith S.S., Michael M.Z., Graham M.W. (1989): Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in the plasmid and phage recombinants. *Nucl Acids Res.* **17**: 3469-3478
- Xu X., Chen C., Fan B., Chen Z. (2006): Physical and functional interactions between pathogen-induced Arabidopsis WRKY18, WRKY40, and WRKY60 transcription factors. *Plant Cell.* **18**: 1310-26
- Yan J., Wang J., Zhang H. (2002): An ankyrin repeat-containing protein plays a role in both disease resistance and antioxidation metabolism. *Plant J.* **29**: 193-202
- Zhang D.P. (2007): Plant science. Signaling to the nucleus with a loaded GUN. *Science.* **316**: 700-1
- Zhou X. und Su Z. (2007): EasyGO: Gene Ontology-based annotation and functional enrichment analysis tool for agronomical species. *BMC Genomics.* **8**: 246
- Zimmermann P., Hirsch-Hoffmann M., Hennig L., Gruissem W. (2004): GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol.* **136**: 2621-32

8 Anhang

8.1 Daten

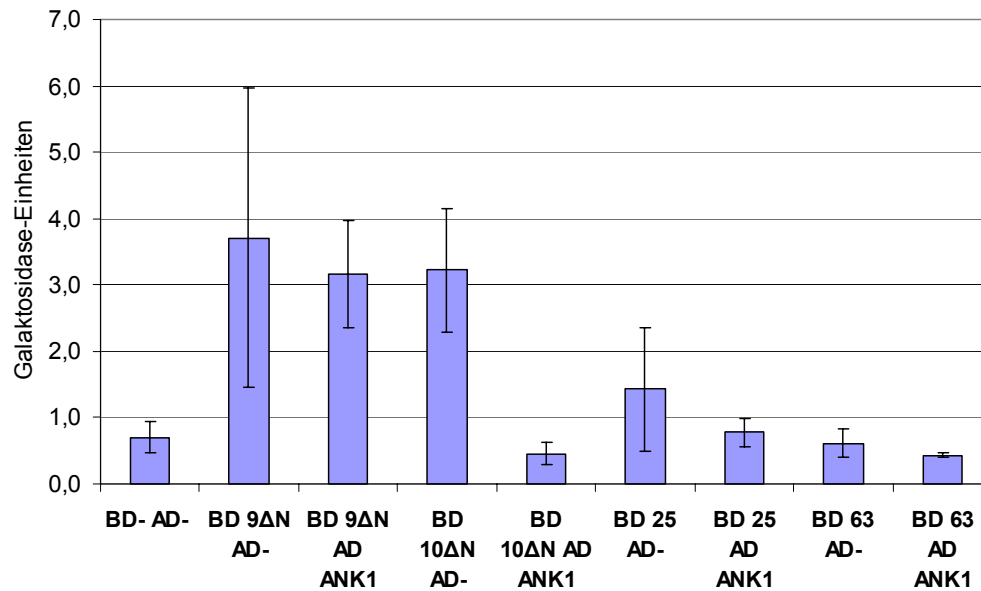


Abbildung 33: oNPG-Test verschiedener Protein-Protein-Interaktionen im Y2H-System. Gal4-Bindedomäne (BD)- und Gal4-Aktivierungsdomäne (AD)-Fusionen wurden verwendet, mit pDEST22 (AD) und pDEST32 (BD) als Ausgangsvektoren. -: Leervektoren als Kontrollen, ANK1: Protein aus Tabak, 9ΔN, 10ΔN, 25, 63: bZIP-Faktoren aus Arabidopsis. Der Mittelwert wurde jeweils aus den Ergebnissen von 3 unabhängigen Kolonien gebildet.

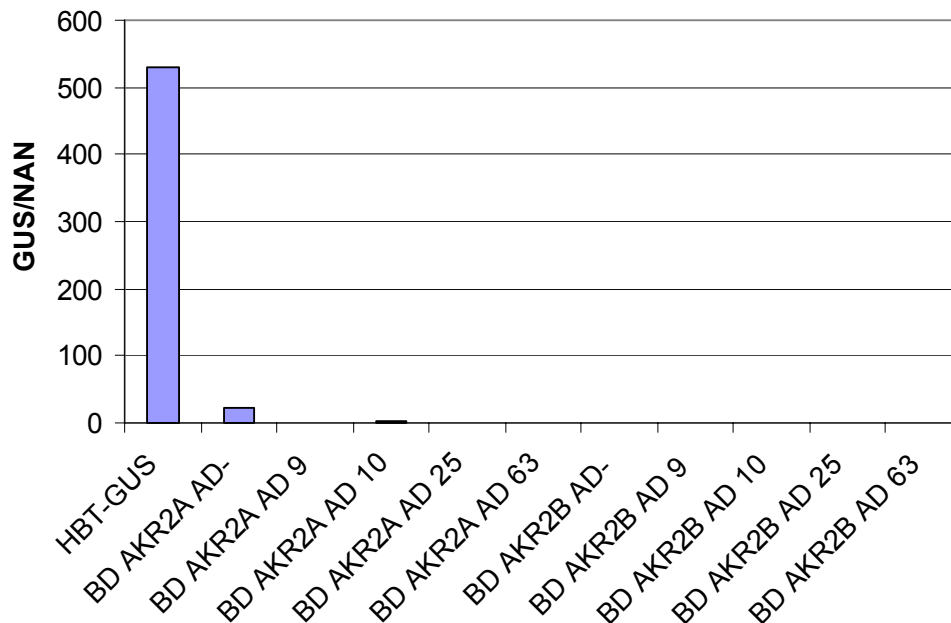


Abbildung 34: Analyse der Protein-Protein-Interaktionen von AKR2A/B und *Arabidopsis* Gruppe C bZIP-Faktoren in *Arabidopsis* Protoplasten. In allen Ansätzen wurden 9 µg GAL4-UAS4:GUS und 3 µg Pro35S:NAN als Reporterplasmide sowie 14 µg des jeweiligen Effektorplasmids transformiert. Gal4-Bindedomäne (BD)- und Gal4-Aktivierungsdomäne (AD)-Fusionen wurden verwendet. HBT-GUS: Positivkontrolle, -: Leervektoren als Kontrollen, 9, 10, 25, 63: bZIP-Faktoren aus Arabidopsis. Der Versuch wurde zwei mal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

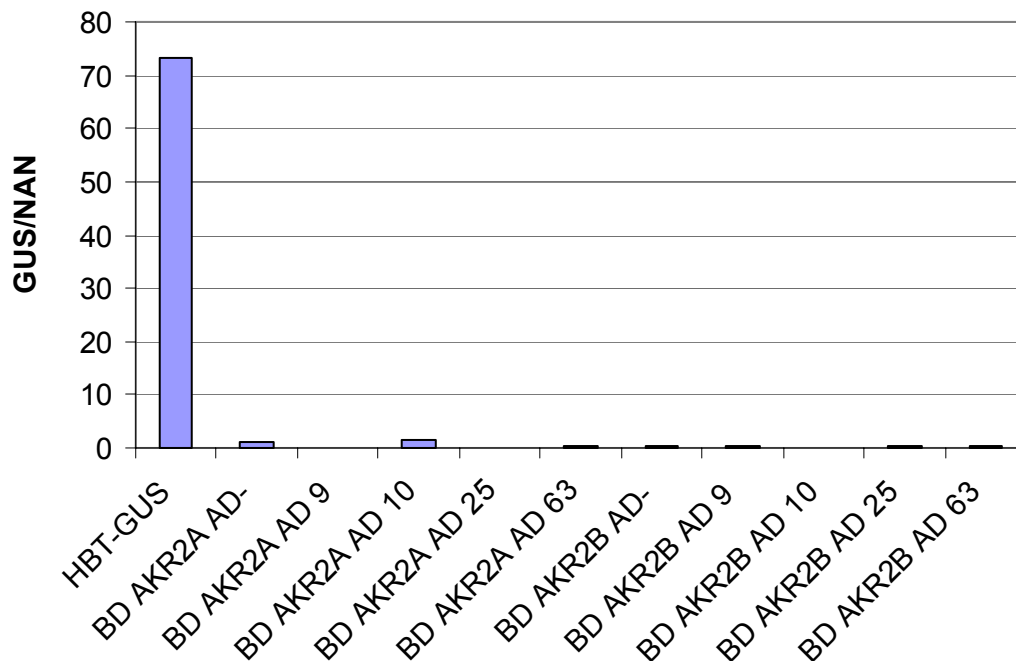


Abbildung 35: Analyse der Protein-Protein-Interaktionen von AKR2A/B und *Arabidopsis* Gruppe C bZIP-Faktoren in Tabak Protoplasten. In allen Ansätzen wurden 9 µg GAL4-UAS4:GUS und 3 µg Pro35S:NAN als Reporterplasmide sowie 14 µg des jeweiligen Effektorplasmids transformiert. Gal4-Bindedomäne (BD)- und Gal4-Aktivierungsdomäne (AD)-Fusionen wurden verwendet. HBT-GUS: Positivkontrolle, -: Leervektoren als Kontrollen, 9, 10, 25, 63: bZIP-Faktoren aus *Arabidopsis*. Der Versuch wurde zwei mal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

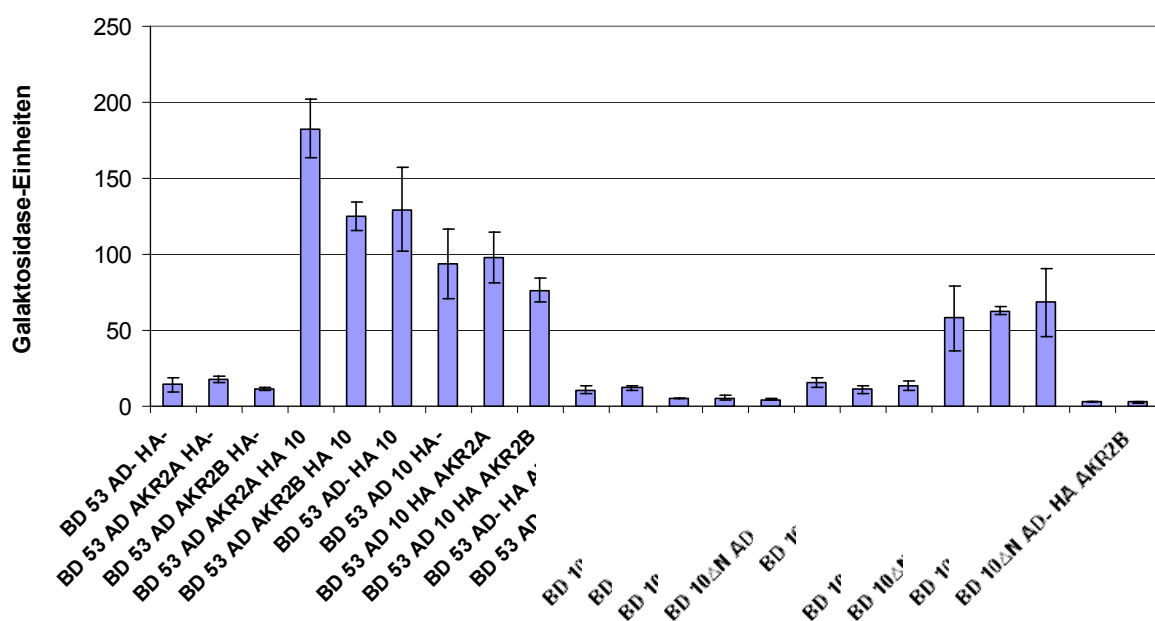


Abbildung 36: oNPG-Test zur Analyse eines putativen trimeren Komplexes der *Arabidopsis* Proteine bZIP10 (10), bZIP53 (53) und AKR2A/B in Hefe. Gal4-Bindedomäne (BD)-, Gal4-Aktivierungsdomäne (AD) und HA-Fusionen wurden verwendet, mit pDEST22 (AD) und pDEST32 (BD) als Ausgangsvektoren. -: Leervektoren als Kontrollen. Der Mittelwert wurde jeweils aus den Ergebnissen von 3 unabhängigen Kolonien gebildet. Die Interaktion zwischen bZIP10 und bZIP53 ist zu sehen, kann jedoch nicht durch Zugabe von AKR2A/B gesteigert werden.

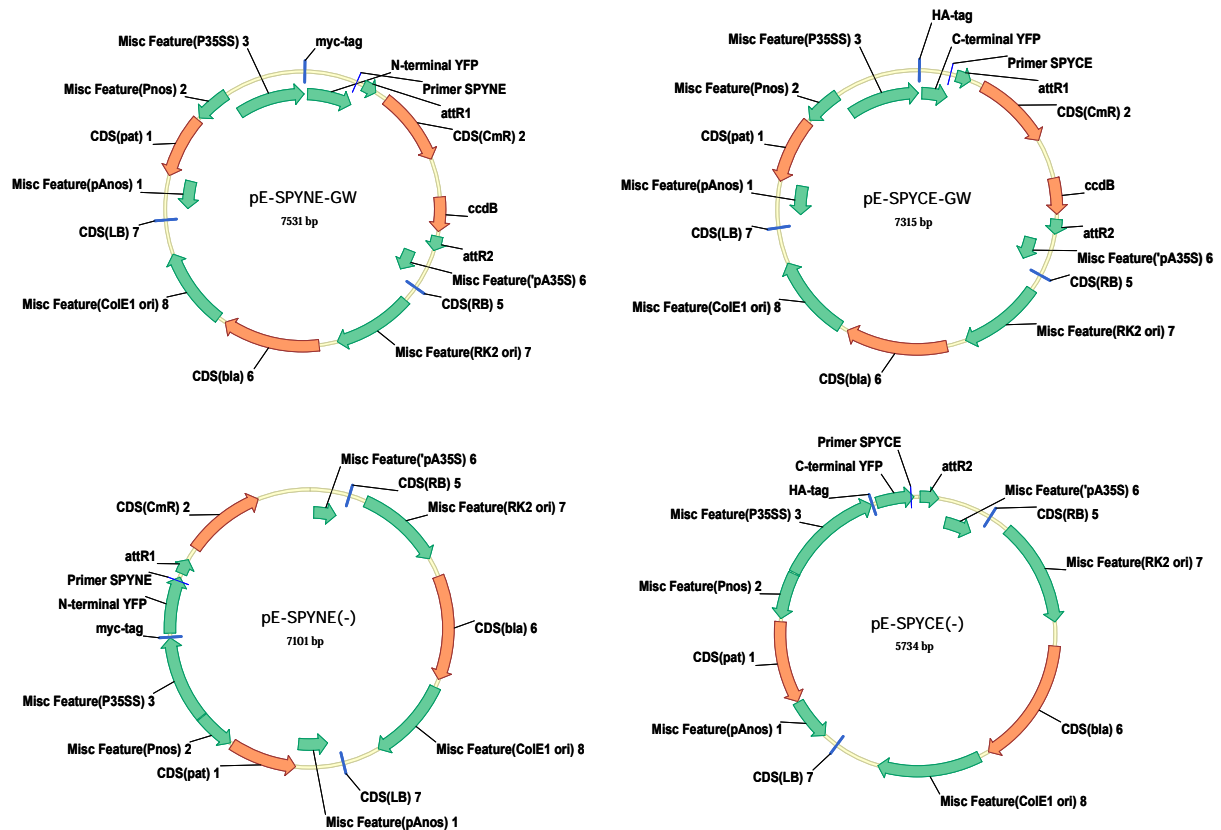


Abbildung 37: Die Gateway-kompatiblen BiFC-Vektoren, die in dieser Arbeit erstellt wurden. Grundlage war pE, ein binärer Gateway-Pflanzenvektor mit Ampicillin-Resistenz (bla). Vor der Gateway-„site“ wurden die N- bzw. C-terminalen Teile des *YFP*-Gens inseriert, die dann unter Kontrolle des 35S-Promotors exprimiert werden können. Für die Negativkontrollen wurden Teile des *ccdB*-Gens deletiert, damit die Vektoren pE-SPYNE/CE(-) leichter vermehrt werden können.

Tabelle 25: Die komplette Liste der Gene, die laut Microarray in den AKR2-RNAi Pflanzen stärker, bzw. schwächer exprimiert wurden als im Wildtyp. Ein negatives Vorzeichen bedeutet schwächere Expression in der transgenen Pflanze, je kleiner der P-Wert, desto signifikanter sind die Expressionsdaten. Die Schwellenwerte betragen: log (RNAi/WT): 3, P-Wert: 0,02

Gen AGI	log (RNAi/WT)	P-Wert	Annotation
At1g75830	10.8	0.00317	plant defensin-fusion protein, (PDF1.1)
At5g44420	10.6	0.00333	plant defensin protein, (PDF1.2a)
At5g59320	10.6	0.00557	lipid transfer protein 3 (LTP3)
At5g59310	10.4	0.00852	lipid transfer protein 4 (LTP4)
At5g44430	8.5	0.00328	plant defensin-fusion protein, (PDF1.2c)
At2g26020	7.3	0.00681	plant defensin-fusion protein, (PDF1.2b)
At1g80840	6.5	0.00246	WRKY40
At4g22690	6.5	0.00247	CYP706A1, cytochrome P450 family protein flavonoid 3',5'-hydroxylase Hf1
At4g24570	6.4	0.00232	mitochondrial substrate carrier family protein
At2g41100	6.2	0.00275	touch-responsive protein / calmodulin-related protein 3, touch-induced (TCH3)
At5g08680	5.9	0.00297	ATP synthase beta chain, mitochondrial, putative
At3g55980	5.8	0.00547	zinc finger (CCCH-type) family protein, contains Pfam domains: Zinc finger C-x8-C-x5-C-x3-H type; and Ankyrin repeat
At2g26010	5.7	0.00415	plant defensin-fusion protein, putative (PDF1.3)
At4g30270	5.6	0.00264	endo-xyloglucan transferase /xyloglucan endo-1,4-beta-D-glucanase MERI-5(B) (SEN4)
At5g67480	5.4	0.00254	TAZ zinc finger family protein / BTB/POZ domain-containing protein (BT4)
At2g18193	5.4	0.00232	AAA-type ATPase family protein
At1g24260	5.4	0.00315	MADS-box protein (AGL9) (SEP3)
At4g23600	5.3	0.00477	coronatine-responsive tyrosine aminotransferase / tyrosine transaminase (CORI3, JR2)
At2g28630	5.2	0.00204	beta-ketoacyl-CoA synthase family protein (Very-long-chain fatty acid condensing enzyme 12)
At5g33355	5.0	0.00216	defensin-like (DEFL) family protein
At2g04050	5.0	0.00322	MATE efflux family protein
At2g04040	4.9	0.005	MATE efflux family protein (AtDTX1): detoxifying efflux carrier for plant-derived antibiotics and other toxic compounds, including CD2+
At2g19800	4.9	0.00257	myo-inositol oxygenase family gene (MIOX2)
At3g13470	4.7	0.00244	chaperonin, putative
At3g59930	4.7	0.00264	defensin-like (DEFL) family protein
At1g61340	4.5	0.00417	F-box family protein
At3g49620	4.5	0.00233	2-oxoacid-dependent oxidase, putative (DIN11)
At1g07940	4.5	0.00232	elongation factor 1-alpha/ EF-1-alpha
At4g25100	4.4	0.00232	Fe-superoxide dismutase (FSD1)
At3g48360	4.4	0.00232	BTB and TAZ domain protein 2 (BT2), component of the TAC1-mediated telomerase activation pathway
At1g56240	4.3	0.00983	PP2-B13 (Phloem protein 2-B13)
At2g15620	4.3	0.00246	ferredoxin--nitrite reductase, putative (NIR1)
At1g57990	4.3	0.00248	purine permease-related (AtPUP18)
At5g63160	4.2	0.00232	BTB and TAZ domain protein 1 (BT1)
At5g46710	4.1	0.00274	zinc-binding family protein
At5g61160	4.1	0.00276	anthocyanin 5-aromatic acyltransferase 1 (AACT1)
At3g15356	4.1	0.00341	legume lectin family protein

At4g15210	4.1	0.0143	beta-amylase (BMY1)/1,4-alpha-D-glucan maltohydrolase
At5g17170	4.0	0.00257	rubredoxin family protein
At4g34150	4.0	0.00239	C2 domain-containing protein; calcium/lipid-binding region, calcium dependent membrane targeting
At3g50480	4.0	0.00233	broad-spectrum mildew resistance RPW8 family protein (HR4)
At1g77120	4.0	0.00269	alcohol dehydrogenase (ADH1)
At1g73540	3.9	0.00331	Nudix hydrolase 21, chloroplast precursor (NUDT21)
At5g61440	3.9	0.00295	thioredoxin family protein
At4g08390	3.9	0.00243	L-ascorbate peroxidase, stromal (sAPX)
At4g37610	3.9	0.00232	BTB and TAZ domain protein 5 (BT5)
At3g30775	3.9	0.00301	proline dehydrogenase (PRODH) (ERD5)
At1g76600	3.9	0.00248	expressed protein
At4g19420	3.8	0.00234	pectinacetyltransferase family protein
At5g44130	3.8	0.00204	Fasciclin-like arabinogalactan protein 13 precursor (FLA13)
At1g04040	3.8	0.00162	acid phosphatase class B family protein
At3g16530	3.8	0.00249	legume lectin family protein
At4g33720	3.7	0.00275	pathogenesis-related protein, putative; similar to PR-1
At4g13250	3.7	0.00339	short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family
At4g31700	3.7	0.00204	40S ribosomal protein S6 (RPS6)
At3g06650	3.6	0.00206	ACLB-1, One of the two genes encoding subunit B of the trimeric enzyme ATP Citrate lyase
At4g27654	3.6	0.00276	expressed protein
At3g59080	3.6	0.00246	aspartyl protease family protein
At5g16980	3.6	0.00268	NADP-dependent oxidoreductase, similar to 2-alkenal reductase
At2g38470	3.6	0.00626	WRKY33
At1g07135	3.5	0.00293	glycine-rich protein
At5g17350	3.5	0.00746	expressed protein
At1g72940	3.5	0.00518	disease resistance protein (TIR-NBS class), putative
At1g07930	3.5	0.00226	elongation factor 1-alpha / EF-1-alpha (A4)
At4g10270	3.5	0.00333	wound-responsive family protein
At2g16060	3.5	0.00232	non-symbiotic hemoglobin 1 (HB1) (GLB1)
At2g30970	3.5	0.0026	aspartate aminotransferase 1 (ASP1)
At3g51860	3.5	0.00228	Vacuolar cation/proton exchanger 3 (Ca(2+)/H(+)) antiporter) (CAX3)
At5g06320	3.5	0.0032	harpin-induced (HIN1, NDR1) family protein (NHL3)
At4g02520	3.4	0.00221	glutathione S-transferase (GST2)
At3g26200	3.4	0.00243	putative cytochrome P450 (CYP71B22)
At2g37770	3.4	0.00584	aldo/keto reductase family protein
At1g55450	3.4	0.00204	embryo-abundant protein-related
At1g60950	3.3	0.00469	ferredoxin (AtFD2) (FED A)
At2g22880	3.3	0.00248	VQ motif-containing protein
At2g40140	3.3	0.00526	zinc finger (CCCH-type) family protein (CZF1/ZFAR1)
At4g08950	3.3	0.00217	phosphate-responsive protein, putative (EXO)
At4g02380	3.3	0.00264	LEA5; senescence associated (SAG21)
At1g72910	3.3	0.0035	disease resistance protein (TIR-NBS class), putative
At4g23100	3.3	0.00232	gamma-glutamylcysteine synthetase (GSH1) (RM1) (CAD2) Required for cell proliferation at the root tip.
At5g55070	3.3	0.00232	2-oxoacid dehydrogenase family protein
At3g14620	3.3	0.00221	cytochrome P450, putative (CYP72A8)
At2g45180	3.2	0.00377	protease inhibitor/seed storage/LTP family protein

At3g15510	3.2	0.00926	no apical meristem (NAM) family protein (NAC2)
At1g72900	3.2	0.00521	disease resistance protein (TIR-NBS class), putative
At3g18130	3.2	0.00221	guanine nucleotide-binding family protein / activated protein kinase C receptor (RACK1)
At1g27730	3.2	0.00434	zinc finger (C2H2 type) family protein (ZAT10) / salt-tolerance zinc finger protein (STZ)
At5g14120	3.2	0.00295	nodulin family protein
At5g49460	3.2	0.016	One of the two genes encoding subunit B of the cytosolic enzyme ATP Citrate Lyase (ACLB-2)
At1g29660	3.2	0.00297	GDSL-motif lipase/hydrolase family protein
At5g01600	3.2	0.00232	ferritin 1 (FER1)
At2g06850	3.2	0.00288	endoxyloglucan transferase (EXGT-A1)
At1g54270	3.2	0.00264	eukaryotic translation initiation factor 4A-2 (eIF-4A-2)
At4g32060	3.2	0.00232	calcium-binding EF hand family protein
At2g15090	3.2	0.00232	3-ketoacyl-CoA synthase 8 (Very-long-chain fatty acid condensing enzyme 8) (KCS8)
At4g10265	3.2	0.00349	wound-responsive protein, putative
At4g22470	3.2	0.0151	protease inhibitor/seed storage/LTP family protein
At1g68530	3.2	0.00232	very-long-chain fatty acid condensing enzyme (CUT1)
At1g13260	3.2	0.00255	AP2/B3 domain transcription factor (RAV1)
At5g35735	3.2	0.00532	auxin-responsive family protein
At3g02550	3.2	0.00415	lateral organ boundaries domain protein (LBD41)
At2g22500	3.1	0.00204	mitochondrial substrate carrier family protein
At3g51600	3.1	0.0036	nonspecific lipid transfer protein 5 (LTP5)
At5g62470	3.1	0.00308	myb family transcription factor (MYB96) Expression is strongly induced by abscisic acid
At1g20620	3.1	0.00232	catalase 3 (CAT3) (SEN2)
At1g07920	3.1	0.00226	elongation factor 1-alpha (eEF-1A) (A4)
At3g08580	3.1	0.00278	ADP/ATP carrier protein 1 (AAC1)
At3g45640	3.1	0.0026	mitogen-activated protein kinase, putative (MPK3)
At5g56680	3.0	0.00232	asparaginyl-tRNA synthetase 1, cytoplasmic (SYNC1)
At1g28370	3.0	0.00232	ERF11, subfamily B-1 protein
At3g03470	3.0	0.00232	cytochrome P450, putative (CYP89A9)
At1g48570	3.0	0.00233	zinc finger (Ran-binding) family protein
At3g54470	3.0	0.00231	bi-functional orotate phosphoribosyltransferase/ orotidine-5'-phosphate decarboxylase
At3g23620	3.0	0.00204	brix domain-containing protein
At4g14060	-3.0	0.00232	major latex protein-related / MLP-related
At3g56240	-3.0	0.00248	copper homeostasis factor / copper chaperone (CCH)
At3g49780	-3.0	0.0028	phytosulfokine 4 precursor (PSK4)
At5g13900	-3.1	0.00426	protease inhibitor/seed storage/LTP family
At2g44940	-3.1	0.00208	DREB subfamily A-4 of ERF/AP2 transcription factor family
At4g23700	-3.1	0.00641	cation/hydrogen exchanger, putative (CHX17)
At2g46750	-3.1	0.00303	FAD-binding domain-containing protein
At5g59520	-3.1	0.00232	zinc transporter (ZIP2)
At4g38080	-3.1	0.00204	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein
At4g33010	-3.1	0.00276	glycine dehydrogenase (decarboxylating), putative (GLDP1)
At3g56230	-3.2	0.0034	speckle-type POZ protein-related
At5g15230	-3.2	0.00254	gibberellin-regulated protein 4 (GASA4)
At4g12510	-3.2	0.00276	protease inhib./seed storage/LTP family
At4g15610	-3.2	0.00264	integral membrane family protein
At4g14010	-3.2	0.00252	rapid alkalization factor family protein (RALFL32)

At3g06390	-3.2	0.00232	integral membrane family protein
At4g20390	-3.3	0.00292	integral membrane family protein
At4g31940	-3.3	0.00324	cytochrome P450, putative (CYP82C4)
At2g47130	-3.3	0.00326	short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family
At4g13235	-3.3	0.00305	defensin-like family protein, embryo sac development arrest (EDA21)
At5g09480	-3.3	0.00458	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein
At5g18060	-3.3	0.00206	auxin-responsive protein, putative
At1g76790	-3.3	0.00162	O-methyltransferase family 2 protein
At5g63190	-3.3	0.00232	MA3 domain-containing protein
At2g02130	-3.3	0.00277	plant defensin-fusion protein, putative (PDF2.3)
At2g05440	-3.3	0.00377	glycine-rich protein
At2g42530	-3.3	0.00236	cold-responsive protein (cor15b)
At5g18080	-3.4	0.00226	auxin-responsive protein, putative
At2g35380	-3.4	0.00315	peroxidase 20 (PER20) (P20)
At4g22610	-3.4	0.00311	protease inhibitor/seed storage/LTP family protein
At4g12520	-3.4	0.00264	protease inhibitor/seed storage/LTP family protein
At5g53250	-3.4	0.00232	arabinogalactan-protein 22 (AGP22)
At1g74670	-3.4	0.00234	gibberellin-responsive protein, putative
At1g78340	-3.4	0.00232	glutathione S-transferase, tau class of GST (GSTU22)
At2g40610	-3.4	0.00232	alpha-expansin, putative (EXPA8)
At3g14990	-3.4	0.00387	4-methyl-5(b-hydroxyethyl)-thiazole monophosphate biosynthesis protein, putative
At4g14130	-3.4	0.00257	xyloglucan endotransglycosylase 7 (XTR7)
At3g54010	-3.5	0.00421	Immunophilin-like protein similar to the p59 FK506-binding protein (FKBP52) / Pasticcino 1 (PAS1)
At2g32870	-3.5	0.00204	mepirin and TRAF homology domain-containing protein / MATH domain-containing protein
At4g22490	-3.5	0.00255	protease inhibitor/seed storage/LTP family protein
At5g37990	-3.5	0.00318	S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase
At1g52060	-3.6	0.00268	jacalin lectin family protein
At4g30450	-3.6	0.00295	glycine-rich protein
At1g52070	-3.6	0.00234	jacalin lectin family protein
At5g15970	-3.6	0.00204	stress-responsive protein (KIN2) / cold-responsive protein (COR6.6)
At5g02780	-3.6	0.0038	In2-1 protein, putative
At5g42180	-3.7	0.00226	peroxidase 64 (PER64) (P64) (PRXR4)
At2g43590	-3.7	0.00264	chitinase, putative
At5g47990	-3.7	0.00268	cytochrome P450 family protein (CYP705A5)
At2g42540	-3.8	0.00232	cold-responsive protein (cor15a)
At5g46890	-3.8	0.00727	protease inhibitor/seed storage/LTP family protein
At1g77940	-3.8	0.00317	60S ribosomal protein L30 (RPL30B)
At2g01530	-3.8	0.00342	major latex protein-related (MLP329)
At4g19170	-3.8	0.00442	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, putative (NCED4)
At3g25190	-3.8	0.00232	nodulin, putative
At5g09530	-3.8	0.00276	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein
At3g23430	-3.8	0.00231	phosphate transporter, putative (PHO1)
At3g28345	-3.9	0.00295	ABC transporter family protein, Multidrug resistance protein 13 (MDR13)
At5g50760	-3.9	0.00241	auxin-responsive family protein
At5g24780	-3.9	0.00416	vegetative storage protein 1 (VSP1)
At2g33830	-3.9	0.00231	dormancy/auxin associated family protein
At3g50970	-4.0	0.00248	dehydrin xero2 (XERO2) / low-temperature-induced protein (LTI30)

At2g02100	-4.0	0.00206	plant defensin-fusion protein, putative (PDF2.2)
At1g48750	-4.0	0.00276	protease inhibitor/seed storage/LTP family protein
At5g62920	-4.0	0.00232	response regulator 6 (ARR6)
At2g47270	-4.1	0.00435	transcription factor/ transcription regulator
At1g67870	-4.1	0.00246	glycine-rich protein
At1g18100	-4.1	0.00301	E12A11 protein
At4g29270	-4.1	0.00278	acid phosphatase class B family protein
At4g17340	-4.1	0.00204	probable aquaporin (tonoplast intrinsic protein 2.2) (TIP2.2) (DELTA-TIP2)
At5g05960	-4.1	0.00254	protease inhibitor/seed storage/LTP family protein
At4g12550	-4.1	0.00231	auxin-induced in root cultures (AIR1)
At1g49570	-4.2	0.00953	Peroxidase 10 precursor (ATP5a) (PER10)
At2g01520	-4.3	0.00341	major latex protein-related (MLP328)
At5g18030	-4.3	0.00257	auxin-responsive protein, putative
At5g62340	-4.3	0.00242	invertase/pectin methylesterase inhibitor family
At1g70880	-4.4	0.00231	Bet v I allergen family protein
At5g10180	-4.4	0.00204	sulfate transporter 2.1 (AST68)
At1g23730	-4.4	0.00454	carbonic anhydrase, putative / carbonate dehydratase, putative
At1g73330	-4.5	0.00259	protease inhibitor, putative (DR4)
At5g18020	-4.5	0.00232	auxin-responsive protein, putative
At4g37410	-4.7	0.00293	cytochrome P450, putative (CYP81F4)
At4g38860	-4.8	0.00233	auxin-responsive protein, putative
At4g12545	-4.8	0.00258	protease inhibitor/seed storage/LTP family protein
At2g39800	-4.8	0.00232	P5CS1
At4g26530	-4.8	0.00264	fructose-bisphosphate aldolase, cytoplasmic
At3g22600	-4.9	0.00221	protease inhibitor/seed storage/LTP family protein
At4g19690	-5.1	0.00232	Fe(II) transport protein (IRT1)
At1g32080	-5.2	0.00246	membrane protein, putative
At5g48000	-5.3	0.00301	cytochrome P450 family protein, CYP708A2
At2g05510	-5.3	0.00276	glycine-rich protein
At2g33790	-5.8	0.00226	pollen Ole e 1 allergen protein containing 14.6% proline residues
At3g25830	-6.3	0.00424	monoterpene 1,8-cineole synthase, atTPS-Cin
At4g11320	-6.5	0.00232	cysteine proteinase, putative
At3g25820	-6.6	0.00276	monoterpene 1,8-cineole synthase, atTPS-Cin
At2g14610	-6.7	0.00427	PR1
At2g02120	-6.8	0.00226	plant defensin-fusion protein, putative (PDF2.1)
At5g47450	-7.2	0.00232	Tonoplast intrinsic protein (TIP2;3) (DELTA-TIP3)
At4g33550	-7.4	0.00248	protease inhibitor/seed storage/LTP family protein
At3g53980	-8.2	0.00252	protease inhibitor/seed storage/LTP family protein
At4g35450	-10.6	0.0161	AKR2A
At2g17390	-10.6	0.00204	AKR2B

Tabelle 26: Die komplette Liste der Gene, die laut Microarray in den Pro_{35S}:AKR2A Pflanzen stärker, bzw. schwächer exprimiert wurden als im Wildtyp. Ein negatives Vorzeichen bedeutet schwächere Expression in der transgenen Pflanze, je kleiner der P-Wert, desto signifikanter sind die Expressionsdaten. Die Schwellenwerte betragen: $\log(\text{Pro}_{35S}/\text{WT})$: 3, P-Wert: 0,02

Gen AGI	$\log(\text{Pro}_{35S}/\text{WT})$	P-Wert	Annotation
At5g59320	14.9	0.00561	lipid transfer protein 3 (LTP3)
At5g59310	14.9	0.0065	lipid transfer protein 4 (LTP4)
At1g75830	9.0	0.00636	plant defensin-fusion protein, (PDF1.1)
At4g23600	8.0	0.00518	coronatine-responsive tyrosine aminotransferase / tyrosine transaminase (CORI3, JR2)
At4g15210	7.9	0.00621	beta-amylase (BMY1)/1,4-alpha-D-glucan maltohydrolase
At5g44420	7.7	0.00773	plant defensin protein, (PDF1.2a)
At4g35295	6.7	0.00737	homoserine kinase, putative / HSK
At5g44430	6.5	0.00731	plant defensin-fusion protein, (PDF1.2c)
At4g35610	6.2	0.00651	zinc finger (C2H2 type) family protein
At4g24570	5.9	0.00476	mitochondrial substrate carrier family protein
At2g26020	5.5	0.0157	plant defensin-fusion protein, putative (PDF1.2b)
At1g80840	4.4	0.00578	WRKY40
At5g51190	4.4	0.0055	ERF protein subfamily B-3 of ERF/AP2
At1g72910	4.3	0.00515	disease resistance protein (TIR-NBS class), putative
At2g37770	4.3	0.00625	aldo/keto reductase family protein
At1g66100	4.2	0.00476	probable thionin-2.4 precursor
At1g27730	4.1	0.0055	zinc finger (C2H2 type) family protein (ZAT10) / salt-tolerance zinc finger protein (STZ)
At2g26010	4.1	0.01	plant defensin-fusion protein, putative (PDF1.3)
At3g28290	4.1	0.00515	integrin-related protein 14a
At3g55980	4.1	0.0142	zinc finger (CCCH-type) family protein, contains Pfam domains: Zinc finger C-x8-C-x5-C-x3-H type; and Ankyrin repeat
At4g11280	3.9	0.0105	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 6 / ACC synthase 6 (ACS6)
At3g28300	3.9	0.0116	integrin-related protein 14a (At14a)
At2g16660	3.8	0.00767	nodulin family protein
At1g72900	3.7	0.00631	disease resistance protein (TIR-NBS class)
At1g72940	3.7	0.00711	disease resistance protein (TIR-NBS class)
At5g17350	3.7	0.00928	expressed protein
At5g25630	3.6	0.00431	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein
At1g76600	3.6	0.00515	expressed protein
At2g41100	3.5	0.00856	touch-responsive protein / calmodulin-related protein 3, touch-induced (TCH3)
At3g44260	3.4	0.00518	CCR4-NOT transcription complex protein
At4g17490	3.3	0.00476	AtERF6
At1g24260	3.3	0.00939	MADS-box protein (AGL9) (SEP3)
At2g34430	3.3	0.0055	chlorophyll A-B binding protein (LHCB1.4) (LHB1B1)
At5g25610	3.3	0.00617	dehydration-responsive protein (RD22)
At5g61600	3.3	0.00431	ERF protein subfamily B-3 of ERF/AP2
At4g27280	3.3	0.00515	calcium-binding EF hand family protein
At5g47230	3.2	0.00515	ethylene-responsive element-binding factor 5 (ERF5)
At1g07135	3.1	0.0058	glycine-rich protein
At4g15760	3.1	0.00518	monooxygenase, putative (MO1)
At2g40140	3.1	0.00824	zinc finger (CCCH-type) family protein (CZF1/ZFAR1)
At4g34950	3.1	0.0055	nodulin family protein

At5g06320	3.0	0.00621	harpin-induced (HIN1, NDR1) family protein (NHL3)
At1g75900	3.0	0.0128	family II extracellular lipase 3 (EXL3)
At3g57520	3.0	0.00598	hydrolase; seed imbibition 2 (SIP2)
At3g21720	3.0	0.00577	isocitrate lyase, putative (ICL)
At5g57240	-3.0	0.0113	oxysterol-binding family protein
At1g18400	-3.0	0.00476	BR enhanced expression 1 (BEE1)
At5g39110	-3.0	0.00513	germin-like protein, putative
At5g48485	-3.1	0.00611	protease inhibitor/seed storage/LTP family protein; DIR1: DEFECTIVE IN INDUCED RESISTANCE 1
At3g56980	-3.1	0.00518	OBP3-responsive gene 3 (ORG3) (BHLH039)
At2g05510	-3.2	0.00837	glycine-rich protein
At3g05950	-3.6	0.0065	Germin-like protein subfamily 1 member 7 precursor
At3g56970	-3.6	0.00511	OBP3-responsive gene 2 (ORG2) (BHLH038)
At1g65960	-3.9	0.00515	glutamate decarboxylase 2 (GAD 2)
At3g25830	-4.0	0.0128	monoterpene 1,8-cineole synthase, atTPS-Cin
At3g25820	-4.2	0.00756	monoterpene 1,8-cineole synthase, atTPS-Cin
At2g47270	-4.6	0.00601	transcription factor/ transcription regulator
At1g49570	-5.0	0.00862	Peroxidase 10 precursor (PER10)
At1g23730	-5.8	0.0055	carbonic anhydrase/carbonate dehydratase, putative
At5g19890	-6.4	0.00515	peroxidase, putative
At4g33720	-6.9	0.00431	pathogenesis-related protein, putative
At2g14610	-7.0	0.00627	PR1

8.2 Abkürzungsverzeichnis

8.2.1 Abkürzungen

4-MU	4-Methylumbelliferyl
4-MUG	4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid
A	Adenin
Abb.	Abbildung
<i>A.t.</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Acker-Schmalwand)
AD	Aktivierungsdomäne
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
APX	Ascorbat Peroxidase
ARF	“auxin responsive factor”
ARR	“ <i>Arabidopsis</i> response regulator”
ATP	Adenosintriphosphat
BD	Bindedomäne
bidest.	bidestilliert
BiFC	“bimolecular fluorescence complementation”
bp	Basenpaar(e)

BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
bZIP	basischer Leucinzipper
bzw.	beziehungsweise
C	Cytidin
ca.	circa
CaMV	cauliflour mosaic virus
cDNA	komplementäre DNA
CE	C-terminales Fragment von YFP
CIAP	Calf Intestine Alkaline Phosphatase
CSM	Complete Supplement Mixture
ddNTPs	Didesoxyribonucleotide
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTPs	Desoxyribonucleotide
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ET	Ethylen
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i>)
EtBr	Ethidiumbromid
<i>etc.</i>	und so weiter (<i>et cetera</i>)
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
G	Guanin
Gal4-AD	Gal4-Aktivierungsdomäne
Gal4-BD	Gal4-DNA-Bindedomäne
GFP	“green fluorescent protein”
Gm	Gentamycin
GO	“Gene Ontology”
GUS	β-Glucuronidase

H ₂ O	Wasser
HA	Influenza Hämagglutinin-Protein
HCl	Salzsäure
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
His	Histidin
HR	Hypersensitive Reaktion ("hypersensitive response")
HSP	Heringsperma-DNA
IPTG	Isopropylthiogalactosid
JA	Jasmonsäure
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
LB	"left border"
LB-Medium	Luria-Bertani Broth-Medium
Leu	Leucin
LHC	"light harvesting complex"
LMB	Leptomycin B
mcs	Multiple Cloning Site
MES	β-Morpholino-ethansulfonsäure Hydrat
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
<i>N.t.</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
n.t.	not tested
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NAN	Neuraminidase
NE	N-terminales Fragment von YFP
NLS	Kernlokalisierungssignal ("nuclear localisation signal")
O2	Opaque2
OD	optische Dichte

OEP	Protein der äußeren Chloroplastenmembran (“outer envelope protein”)
oNPG	o-Nitrophenyl D-Galactopyranosid
ORF	offener Leserahmen (“open reading frame”)
P2H	Protoplasten-Two-Hybrid
PAA	Polyacrylamidgel
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAMP	“pathogen associated molecular pattern”
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (“polymerase chain reaction”)
PDF	pflanzliches Defensin
PEG	Polyethylenglycol
pH	negativ dekadischer Logarithmus der
PIPES	1,4-Piperazin-bis-(ethansulfonsäure)
PVDF	Polyvinylidene Fluorid
RB	“right border”
RFP	“red fluorescent protein”
RNA	Ribonucleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute (“rotations per minute”)
RT	Raumtemperatur
SA	Salizylsäure
SD	Synthetic dropout
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss	einzelsträngig („single stranded“)
SSC	Natriumcitrat
t	Reaktionszeit
T	Thymin
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	DNA-Polymerase <i>Thermus aquaticus</i> DNA-Polymerase
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris buffered saline
T-DNA	Transfer-DNA
TE	Tris EDTA-Puffer

TEMED	N, N, N', N'-Tetraethylethylendiamin
T _m	Schmelztemperatur
TMV	Tabak Mosaik Virus
Toc	„translocase of the outer chloroplast membrane“
Tom	„translocase of the outer mitochondrial membrane“
TPI	Trypsin Protease Inhibitor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan
U	definierte Enzymeinheit (unit)
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
UAS	Upstream Activating Sequence
uORF	offener Leserahmen im 5`-UTR (“upstream open reading frame”)
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolettes Licht
v/v	Volumenprozent (volume per volume)
Vol.	Volumen
w/v	Gewichtsprozent (weight per volume)
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
Y2H	Yeast-two-Hybrid“
YFP	“yellow fluorescent protein”
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
λ	Bakteriophage Lambda

8.2.2 Einbuchstabenkürzel für Aminosäuren

A	Alanin	G	Glycin	M	Methionin
S	Serin	C	Cystein	H	Histidin
N	Asparagin	T	Threonin	D	Asparaginsäure
I	Isoleucin	P	Prolin	V	Valin

E	Glutaminsäure	K	Lysin	Q	Glutamin
W	Tryptophan	F	Phenylalanin	L	Leucin
R	Arginin	Y	Tyrosin		

8.2.3 Einheiten

°C	Grad Celsius	(Temperatur)
D	Dalton	(Molekulargewicht)
g	Gramm	(Masse)
h	Stunde	(Zeit)
l	Liter	(Volumen)
M	mol / l	(Molarität)
min	Minute	(Zeit)
mol	mol	(Stoffmenge)
s	Sekunde	(Zeit)
V	Volt	(Spannung)
Ω	Ohm	(Widerstand)

8.2.4 Vorsätze zur Bezeichnung von dezimalen Vielfachen und Teilen von Einheiten

k	kilo-	(10 ³)
c	centi-	(10 ⁻²)
m	milli-	(10 ⁻³)
μ	mikro	(10 ⁻⁶)
n	nano-	(10 ⁻⁹)
p	pico-	(10 ⁻¹²)

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Caroline Sophia Carsjens, geb. Mayer
Geburtsdatum: 30.10.1978
Geburtsort: Essen
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1984-1988 Hirschkampgrundschule, Oberhausen
1988-1994 Freiherr vom Stein Gymnasium, Oberhausen
1994-1995 Smithsburg High School, Maryland, USA
1995-1997 Freiherr vom Stein Gymnasium, Oberhausen; Abschluss: Abitur

Studium:

1997-1998 Studium der Mathematik an der Georg-August Universität Göttingen
1998-2001 Studium der Biologie an der Georg-August Universität Göttingen
2001-2002 Studium der Biologie an der Universität Bergen, Norwegen
2002-2004 Studium der Biologie an der Georg-August Universität Göttingen
Anfertigung der Diplomarbeit in der Abteilung „Biochemie der Pflanze“ bei Prof. Dr. I. Feußner mit dem Thema: „Isolation und Analyse einer neuen Genfamilie von Glykolat-Oxidasen aus *Arabidopsis thaliana*“
2004-2010 Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl für „Allgemeine und Entwicklungsphysiologie der Pflanze“ des Albrecht-von-Haller Instituts für Pflanzenwissenschaften der Georg-August-Universität zu Göttingen bei PD Dr. W. Dröge-Laser.