



**Ein Netzwerk von heterodimerisierenden  
C/S1 AtbZIP-Transkriptionsfaktoren und  
seine Funktion in Seneszenz,  
Stressantwort und Samenentwicklung**

**Dissertation**

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

vorgelegt von  
Fridtjof Walter Engelbert Weltmeier  
aus Dortmund

Göttingen, 2005

D7

Referent:

PD Dr. Wolfgang Dröge-Laser

Korreferent:

Professorin Dr. Christiane Gatz

Tag der mündlichen Prüfung:

19. Januar 2006



# **INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
2.1	Transkriptionsfaktoren	3
2.2	bZIP-Transkriptionsfaktoren	4
2.3	Die Gruppen C und S der AtbZIP-Transkriptionsfaktoren	6
2.4	Zucker und Zucker-abhängige Signalwege	8
2.5	AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 in der Pollen- und Samenentwicklung	10
2.6	Abiotischer Stress und die Funktion von Prolin im Schutz vor Stress	12
2.7	Seneszenz und bZIP-Transkriptionsfaktoren	14
2.8	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	15
<b>3</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>17</b>
3.1	<b>Organismen</b>	<b>17</b>
3.1.1	Hefestämme ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	17
3.1.2	Bakterienstämme	17
3.1.3	Pflanzenmaterial: Ackerschmalwand ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	17
3.2	<b>Nukleinsäuren</b>	<b>18</b>
3.2.1	Plasmide	18
3.2.2	Primer	19
3.2.3	Hybridisierungssonden	21
3.3	<b>Nährmedien und Zusätze</b>	<b>22</b>
3.3.1	Hefemedien	22
3.3.2	Bakterienmedien	23
3.3.3	Pflanzenmedien	23
3.4	<b>Medienzusätze</b>	<b>25</b>
3.4.1	Aminosäuren und Purine	25
3.4.2	Antibiotika	25
3.4.3	Agar	25

<b>3.5</b>	<b>Lösungen und Puffer</b>	<b>25</b>
<b>3.6</b>	<b>Geräte</b>	<b>30</b>
<b>3.7</b>	<b>Verbrauchsmittel</b>	<b>31</b>
<b>3.8</b>	<b>Chemikalien</b>	<b>32</b>
<b>3.9</b>	<b>Enzyme</b>	<b>34</b>
<b>3.10</b>	<b>Antikörper</b>	<b>34</b>
<b>3.11</b>	<b>Kits</b>	<b>35</b>
<b>3.12</b>	<b>DNA-Marker</b>	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>METHODEN</b>	<b>36</b>
<hr/>		
<b>4.1</b>	<b>Anzucht und Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i></b>	<b>36</b>
4.1.1	Anzucht der Pflanzen	36
4.1.2	Floral-dip Transformation	36
4.1.3	Selektion auf Basta®-Resistenz	37
4.1.4	Selektion auf Kanamycin- / Hygromycin-Resistenz	37
<b>4.2</b>	<b>Anzucht und Lagerung von Bakterien und Hefen</b>	<b>37</b>
4.2.1	Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	37
4.2.2	Anzucht von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	38
4.2.3	Anzucht von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	38
4.2.4	Lagerung der Bakterien	38
4.2.5	Lagerung der Hefen	38
<b>4.3</b>	<b>Methoden zur Isolierung von genomischer DNA aus <i>Arabidopsis</i></b>	<b>38</b>
4.3.1	DNA-Extraktion aus <i>Arabidopsis thaliana</i> nach (Fulton <i>et al.</i> , 1995)	38
4.3.2	Schnelle Präparation von genomischer DNA	39
<b>4.4</b>	<b>RNA-Extraktion aus <i>Arabidopsis thaliana</i></b>	<b>39</b>
4.4.1	RNA-Extraktion aus <i>Arabidopsis thaliana</i> mit dem "Invisorb Spin Plant RNA Mini Kit"	39
4.4.2	RNA Extraktion aus <i>Arabidopsis thaliana</i> mit Trizol	39
<b>4.5</b>	<b>Gateway-Rekombination</b>	<b>39</b>
4.5.1	Aufreinigung von <i>attB</i> -PCR Produkten	40
4.5.2	BP-Reaktion	40
4.5.3	LR-Reaktion	40
<b>4.6</b>	<b>Isolation von Plasmiden aus <i>E. coli</i></b>	<b>41</b>
4.6.1	Alkalische Lyse	41
4.6.2	Plasmidpräparation für Sequenzierung	41
4.6.3	Schnellyse von <i>E.coli</i> Zellen für eine anschließende PCR	41
4.6.4	DNA-Elution aus Agarosegelen	41
<b>4.7</b>	<b>Phenol-Chloroform Extraktion</b>	<b>41</b>
<b>4.8</b>	<b>Ethanol-fällung von DNA aus wässrigen Lösungen</b>	<b>42</b>

<b>4.9</b>	<b>Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren</b>	<b>42</b>
<b>4.10</b>	<b>Restriktionsspaltung von DNA</b>	<b>42</b>
<b>4.11</b>	<b>Ligation</b>	<b>42</b>
<b>4.12</b>	<b>TA-Klonierung</b>	<b>43</b>
<b>4.13</b>	<b>Blau-Weiß-Selektion</b>	<b>43</b>
<b>4.14</b>	<b>Agarosegelelektrophorese von DNA-Molekülen</b>	<b>43</b>
<b>4.15</b>	<b>DNA Sequenzierung</b>	<b>44</b>
4.15.1	Aufreinigung der Sequenzierreaktion	45
<b>4.16</b>	<b>Polymerase-Kettenreaktion</b>	<b>45</b>
<b>4.17</b>	<b>Colony-Screen mittels PCR</b>	<b>46</b>
<b>4.18</b>	<b>Transformation von Mikroorganismen</b>	<b>46</b>
4.18.1	Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i>	46
4.18.2	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	46
4.18.3	Herstellung kompetenter Agrobakterien	46
4.18.4	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	47
4.18.5	Herstellung kompetenter Hefezellen	47
4.18.6	Transformation der kompetenten Hefezellen	47
<b>4.19</b>	<b>Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>-Protoplasten</b>	<b>48</b>
4.19.1	Protoplastengewinnung	48
4.19.2	Protoplasten- PEG- Transformation	48
4.19.3	Messung der $\beta$ -Glucuronidase (GUS)- Aktivität	48
<b>4.20</b>	<b>GUS-Färbung</b>	<b>49</b>
<b>4.21</b>	<b>Northernblot / Kapillarblot</b>	<b>50</b>
4.21.1	Denaturierende Agarosegelelektrophorese von RNA-Molekülen	50
4.21.2	Kapillarblot	50
4.21.3	Herstellen einer radioaktiv markierten DNA-Sonde	50
4.21.4	Hybridisierung der Northern Blot Membran	51
4.21.5	Rehybridisierung	51
<b>4.22</b>	<b>Transkriptomanalyse mit 'ARIZONA whole genome arrays'</b>	<b>51</b>
4.22.1	Amplifikation der eingesetzten RNA	52
4.22.2	Indirekte Markierung der mRNA	52
4.22.3	Hybridisierung der ARIZONA whole genome arrays	53
4.22.4	Auswertung der ARIZONA whole genome arrays	53
<b>4.23</b>	<b>Herstellung von Chloroform / Methanolextrakten zur Bestimmung des Zuckergehaltes</b>	<b>53</b>
<b>4.24</b>	<b>Nachweis der <math>\beta</math>-Galaktosidaseaktivität in Hefen durch oNPG-Tests</b>	<b>54</b>
<b>4.25</b>	<b>Chromatin-Immunopräzipitation</b>	<b>54</b>
4.25.1	Chromatinpräparation	54
4.25.2	Immunopräzipitation	55

<b>4.26</b>	<b>Herstellung denaturierender Gesamtzellextrakte aus Pflanzen</b>	<b>55</b>
<b>4.27</b>	<b>Western Blot Analyse</b>	<b>56</b>
4.27.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	56
4.27.2	Coomassie-Färbung	56
4.27.3	Proteintransfer auf PVDF-Membranen	56
4.27.4	Immunodetektion mit dem ECL+ System	57
<b>4.28</b>	<b>Verwendete Computerprogramme</b>	<b>57</b>
<b>4.29</b>	<b>Mathematische Formeln</b>	<b>58</b>
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE:</b>	<b>59</b>
<b>5.1</b>	<b>AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppe C interagieren mit AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppe S1</b>	<b>59</b>
5.1.1	AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 zeigen unterschiedliche Aktivierungseigenschaften	60
5.1.2	AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppe C heterodimerisieren in Hefe bevorzugt mit AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppe S1	61
<b>5.2</b>	<b>Promotor-GUS Fusionen zeigen eine Kolo-kalisation von AtbZIP Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1</b>	<b>66</b>
5.2.1	AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 zeigen überlappende gewebespezifische Expressionsmuster	66
<b>5.3</b>	<b>Erzeugung und Charakterisierung von Mutanten und ektopischen Überexpressionslinien der AtbZIP-Transkriptionsfaktoren 1, 53, 9 und 63</b>	<b>69</b>
5.3.1	Ektopische Expression von AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 unter Kontrolle des 35S-Promotors	69
5.3.2	Identifizierung und Charakterisierung von T-DNA Insertionsmutanten	73
<b>5.4</b>	<b><i>Prolin</i>dehydrogenase ist ein Zielgen von AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1</b>	<b>78</b>
5.4.1	<i>AtbZIP53</i> und <i>AtbZIP1</i> regulieren die Expression der <i>ProDH</i>	78
5.4.2	<i>AtbZIP1</i> , <i>53</i> , <i>9</i> , <i>63</i> und die <i>ProDH</i> werden durch Zuckermangel, <i>AtbZIP53</i> und die <i>ProDH</i> auch durch Hypoosmolarität induziert	79
5.4.3	Eine Dunkel-induzierte Expression von <i>ProDH</i> , <i>AtbZIP1</i> , <i>AtbZIP53</i> , <i>AtbZIP9</i> und <i>AtbZIP63</i> wird durch Zucker reprimiert.	81
5.4.4	Die Induktion von <i>AtbZIP53</i> durch Hypoosmolarität findet vorwiegend in Blättern statt	83
5.4.5	<i>AtbZIP53</i> wird durch Prolin induziert	83
5.4.6	Die <i>ProDH</i> ist ein direktes Zielgen von <i>AtbZIP53</i>	85
5.4.7	Heterodimere von <i>AtbZIP53</i> mit Gruppe C AtbZIP-Transkriptionsfaktoren führen zu einer synergistischen Aktivierung der <i>ProDH</i>	88
5.4.8	Einzelne AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 werden wie die <i>ProDH</i> stark in Pollen exprimiert	89
<b>5.5</b>	<b>Eine Regulation von AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C/S1 durch Zucker lässt sich durch Transkriptomanalyse-Daten und Promotor-GUS Fusionen bestätigen</b>	<b>92</b>



5.5.1	Transkriptionelle Regulation von AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 durch Saccharose	92
5.5.2	Transkriptionelle Regulation von AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 durch Glukose	93
5.5.3	Saccharose reprimiert die Translation von <i>AtbZIP1</i> und <i>AtbZIP53</i>	95
<b>5.6</b>	<b>Transkriptomanalyse einer <i>35S:AtbZIP53</i> Linie zur Identifizierung von Zielgenen</b>	<b>97</b>
5.6.1	Gene mit einer erhöhten Expression in der <i>35S:AtbZIP53</i> Linie zeigen gewebespezifische Expressionsmuster	102
5.6.2	Gene mit einer reduzierten Expression in der <i>35S:AtbZIP53</i> Linie zeigen keine einheitlichen Expressionsmuster	105
5.6.3	Die Analyse der Promotoren von in der <i>35S:AtbZIP53</i> Linie stärker exprimierten Genen zeigt ein gehäuftes Auftreten eines <i>ACGTGGC</i> -Motivs	108
5.6.4	Verifikation von einzelnen in dem Mikroarrayexperiment durch <i>AtbZIP53</i> induzierten Genen in Northern Analysen	111
5.6.5	<i>ASN1</i> ist ein direktes Zielgen von AtbZIP53	113
<b>5.7</b>	<b>AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 sind an der Antwort auf abiotischen Stress beteiligt</b>	<b>114</b>
5.7.1	<i>AtbZIP53</i> wird in Schließzellen exprimiert	114
5.7.2	Ektopische Expression von <i>AtbZIP53</i> vermittelt eine erhöhte Resistenz gegen Salzstress	115
5.7.3	AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 werden durch abiotischen Stress reguliert	117
5.7.4	Die wurzelspezifische Induktion eines <i>Trehalosephosphat-Phosphatase</i> -Gens nach Salzstress wird durch <i>AtbZIP1</i> und/oder <i>AtbZIP53</i> vermittelt	121
<b>5.8</b>	<b>AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 sind an der Samenentwicklung beteiligt</b>	<b>123</b>
5.8.1	AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppe S1 zeigen eine gegenläufige Expressionskinetik während der Samenentwicklung	123
5.8.2	<i>AtbZIP53</i> wird während der Samenreifung im Embryo und in der Aleuronschicht exprimiert	126
<b>5.9</b>	<b>AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 sind Regulatoren natürlicher und induzierter Seneszenz</b>	<b>127</b>
5.9.1	<i>AtbZIP1</i> , <i>AtbZIP53</i> , <i>AtbZIP9</i> , <i>AtbZIP25</i> und <i>AtbZIP63</i> werden durch Seneszenz induziert	127
5.9.2	<i>35S:AtbZIP1</i> Linien zeigen ein rascheres Eintreten in die Dunkel-induzierter Seneszenz	131
5.9.3	Transkriptionelle Regulation von AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 in Mikroarray-Experimenten zur Seneszenz	132
<b>5.10</b>	<b>Analyse der Transkriptome von <i>35S:AtbZIP1</i> und <i>atbzip1/atbzip53</i> Pflanzen</b>	<b>136</b>
5.10.1	Viele der Gene mit einer erhöhten Expression in der <i>35S:AtbZIP1</i> Linie werden durch Seneszenz induziert	138
5.10.2	Die Promotoren von in der <i>35S:AtbZIP1</i> Linie stärker exprimierten Genen zeigen ein gehäuftes Auftreten eines <i>ACGTTAC</i> -Motivs	144

5.10.3	Gene mit einer im Vergleich zum Wildtyp reduzierten Expression in der <i>atbzip1/atbzip53</i> Doppelmutante	146
5.10.4	Analyse der Promotoren von Genen mit einer reduzierten Expression in der <i>atbzip1/atbzip53</i> Doppelmutante	148

---

<b>6</b>	<b>DISKUSSION:</b>	<b>150</b>
----------	--------------------	------------

6.1	<b>AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 bilden ein Heterodimerisierungsnetzwerk</b>	<b>150</b>
6.2	<b>Bisher unbekannte Strukturmerkmale der Zipper-Domäne sind für die Spezifität von C/S1 Heterodimerisierungen verantwortlich</b>	<b>152</b>
6.3	<b>AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 unterscheiden sich in ihren Aktivierungseigenschaften</b>	<b>155</b>
6.4	<b>AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 sind Teil eines Zucker-abhängigen Signalweges</b>	<b>157</b>
6.5	<b>C/S1 Heterodimere vermitteln eine durch Zucker, Prolin und osmotische Signale regulierte Expression der <i>ProDH</i></b>	<b>160</b>
6.6	<b><i>AtbZIP53</i> ist möglicherweise Teil eines ABA-Signalweges</b>	<b>162</b>
6.7	<b>C/S1 Heterodimere regulieren die Expression von Samenspeicherprotein- und LEA-Genen.</b>	<b>166</b>
6.8	<b><i>AtbZIP1</i> und <i>AtbZIP53</i> regulieren die Umstellung des Metabolismus während Dunkel-induzierter Seneszenz</b>	<b>167</b>
6.9	<b>Ausblick</b>	<b>171</b>

---

<b>7</b>	<b>LITERATUR:</b>	<b>174</b>
----------	-------------------	------------

---

<b>8</b>	<b>ANHANG</b>	<b>192</b>
----------	---------------	------------

8.1	<b>Abkürzungen</b>	<b>192</b>
8.2	<b>Aminosäuren</b>	<b>193</b>
8.3	<b>Einheiten</b>	<b>194</b>
8.4	<b>Vorsätze zur Bezeichnung von dezimalen Vielfachen und Teilen</b>	<b>194</b>

# 1 Zusammenfassung

Transkriptionsfaktoren der bZIP (basic region – leucine zipper) Familie kommen in allen bisher analysierten eukaryotischen Organismen vor. Eine besondere Eigenschaft von Transkriptionsfaktoren dieser Gruppe ist, dass sie als Dimere an DNA binden, wobei einige bZIP-Transkriptionsfaktoren spezifische Heterodimere mit anderen bZIP-Transkriptionsfaktoren bilden können. Im Rahmen dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass in dem Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* die bZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppe C (AtbZIP9, 10, 25 und 63) mit den bZIP-Faktoren der Gruppe S1 (AtbZIP1, 2, 11, 44 und 53) spezifische Heterodimere formen. Um die Funktion dieses Heterodimerisierungsnetzwerkes zu verstehen, wurden die Expressionsmuster der AtbZIP-Transkriptionsfaktoren mit Hilfe von Promotor-GUS Fusion, Northern Analysen und Daten aus Mikroarray-Datenbanken analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Expression der AtbZIP-Gene vor allem durch die Zucker Glukose und Saccharose und durch Seneszenz, aber auch durch Stresse wie Osmolarität oder Salzstress reguliert wird. Zusätzlich fanden sich Gewebe-spezifische Expressionsmuster, z.B. in den Pollen oder Samen. Für die funktionelle Charakterisierung der bZIP-Transkriptionsfaktoren wurden Überexpressions-Pflanzen und T-DNA Insertionsmutanten erzeugt. Durch Transkriptomanalysen dieser Pflanzen mit Hilfe von Mikroarrays wurden mögliche Zielgene von *AtbZIP1* und *AtbZIP53* identifiziert. Ektopische Überexpression von *AtbZIP1* oder *AtbZIP53* (*35S:AtbZIP1* und *35S:AtbZIP53*) führte zur Aktivierung von Samenspeicherprotein-Genen, Pollen-spezifischen Genen sowie Seneszenz-assoziierten Genen. Unter diesen Genen waren vermehrt Gene des Aminosäure-Metabolismus, und für zwei von ihnen, ein *Prolin-Dehydrogenase* Gen (*ProDH*) und ein *Asparagin Synthetase* Gen (*ASN1*), wurde mittels Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) gezeigt, dass es sich um direkte Zielgene von *AtbZIP53* handelt. Für die *ProDH* konnte in transienten Protoplasten-Assays gezeigt werden, dass *AtbZIP53* alleine in der Lage ist den Promotor zu aktivieren, dass jedoch eine Koexpression mit Gruppe C Faktoren zu einer weiter verstärkten Aktivierung führt, was die Bedeutung der Heterodimerisierung in Pflanzen belegt. In einer phänotypischen Charakterisierung zeigten *35S:AtbZIP53* Pflanzen eine erhöhte Salzresistenz. Zudem konnte gezeigt werden, dass *AtbZIP53* die Expression von Genen der Samenreifung

vermittelt. Während dieser Phase bilden die Samen ihre Austrocknungstoleranz aus, ein Prozess der Parallelen zur Ausbildung von Salzresistenz zeigt. Für *35S:AtbZIP1* Pflanzen konnte ein früheres Eintreten in eine Dunkel-induzierte Seneszenz gezeigt werden, das sich wahrscheinlich auf die in diesen Pflanzen verstärkt exprimierten Seneszenz-assoziierten Gene zurückführen lässt. Die in dieser Arbeit gezeigte deutliche Repression von *AtbZIP1* durch Zucker hat wahrscheinlich die Funktion, das Einsetzen der Dunkel-induzierten Seneszenz zu verhindern, solange die Zellen noch über ausreichende Energie-Reserven verfügen.

Da *AtbZIP*-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 stark durch Zucker, aber auch durch Stresse und entwicklungsbiologische Signale reguliert werden, und die Mehrheit der identifizierten putativen Zielgene Enzyme des Metabolismus kodieren, wird die Hypothese aufgestellt, dass C/S1 Heterodimere eine komplexe, auf der einen Seite von der Verfügbarkeit von Zuckern, auf der anderen Seite von Stressen und entwicklungsbiologischen Signalen abhängige Regulation des Metabolismus vermitteln.

## 2 Einleitung

### 2.1 Transkriptionsfaktoren

Im Dezember 2000 wurde die vollständige Sequenz des Genoms von *Arabidopsis thaliana* mit seinen etwa 27.000 Genen veröffentlicht (Arabidopsis\_Genome\_Initiative, 2000). Viele dieser Gene haben spezielle Aufgaben und werden nur unter bestimmten Umweltbedingungen, in bestimmten Geweben oder Entwicklungsstadien exprimiert. Die dafür notwendige Regulierung der Genexpression kann auf verschiedenen Ebenen stattfinden, so können z.B. die Transkription, die Prozessierung der mRNA oder die Translation reguliert werden. Die Regulation der Transkription ist dabei die erste und wichtigste Kontrollebene, an deren Kontrolle eine große Gruppe von Proteinen beteiligt ist, die Transkriptionsfaktoren genannt werden. In *Arabidopsis thaliana* umfasst diese Gruppe mindestens 1533 Gene. Damit codieren über 5% aller Gene für Transkriptionsfaktoren, was ihre Bedeutung für die Pflanze deutlich macht (Riechmann *et al.*, 2000).

Transkriptionsfaktoren verfügen über eine DNA-Bindedomäne, die an regulatorische Sequenzen im Promotorbereich bindet, und über eine Aktivierungsdomäne, die über Wechselwirkungen mit der basalen Transkriptionsmaschinerie die für die Transkription notwendigen Proteine rekrutiert und so die Transkription einleitet (Ptashne und Gann, 1997). Diese beiden Domänen können auch auf verschiedene Proteine aufgeteilt sein (Brivanlou und Darnell, 2002).

In der Regel binden gleich mehrere verschiedene Transkriptionsfaktoren an den Promotor eines Gens, und die Integration der von diesen verschiedenen Transkriptionsfaktoren übermittelten Signale führt dann zu einer kontrollierten Aktivierung. Transkriptionsfaktoren können aufgrund ihrer unterschiedlichen DNA-bindenden Struktur motive in verschiedene Familien, wie z.B. bZIP-, Homeobox-, Helix-Loop-Helix-, oder Zinkfinger-Proteine eingeteilt werden (Luscombe *et al.*, 2000). Die in dieser Arbeit untersuchten Gene kodieren Transkriptionsfaktoren der bZIP-Familie.

## 2.2 bZIP-Transkriptionsfaktoren

Das bZIP-Motiv (basic leucine zipper) besteht aus einer basischen Domäne (b) und einem sich daran anschließenden Leucin-Zipper (ZIP), die zusammen eine  $\alpha$ -Helix bilden (Hurst, 1995). Der Leucin-Zipper besteht aus heptameren Wiederholungen von Leucin bzw. anderen hydrophoben Aminosäuren, wie Phenylalanin, Isoleucin, Valin oder Methionin. Die sieben Aminosäuren einer heptaden Wiederholung bilden zwei  $\alpha$ -helikale Umdrehungen der Helix (Abbildung 2.1 C), und werden in der Nomenklatur nach McLachlan und Steward (1975) a, b, c, d, e, f und g genannt. Die Position d in dieser Nomenklatur entspricht den heptameren Wiederholungen von Leucin bzw. anderen hydrophoben Aminosäuren. Diese hydrophoben Aminosäuren liegen alle auf einer Seite der  $\alpha$ -Helix und bilden eine hydrophobe Fläche, die als Kontaktstelle zwischen zwei bZIP-Proteinen dient und eine Homo- bzw. Heterodimerisierung von bZIP-Transkriptionsfaktoren ermöglicht (Landschulz *et al.*, 1988; O'Shea *et al.*, 1989). Die Dimerisierung der  $\alpha$ -Helices von zwei Leucin-Zippern führt zur Bildung einer coiled-coil Konformation (Baxevanis und Vinson, 1993; Lupas, 1996). Die amphiphatischen Eigenschaften der  $\alpha$ -Helix erlauben polaren oder geladenen Aminosäuren an Position e und g eines Leucin-Zippers, mit Aminosäuren an den korrespondierenden Positionen eines anderen Leucin-Zippers zu interagieren. Eine Dimerisierung wird verhindert, wenn sich die Aminosäuren an Position e und g abstoßen oder aus sterischen Gründen keine Interaktion möglich ist, und gefördert, wenn es zu elektrostatischen Anziehungen oder zur Bildung von Wasserstoffbrücken kommt. Auf diese Art und Weise kann eine Spezifität der Dimerisierung erreicht werden (zur Übersicht siehe Siberil *et al.*, 2001; Vinson *et al.*, 2002).

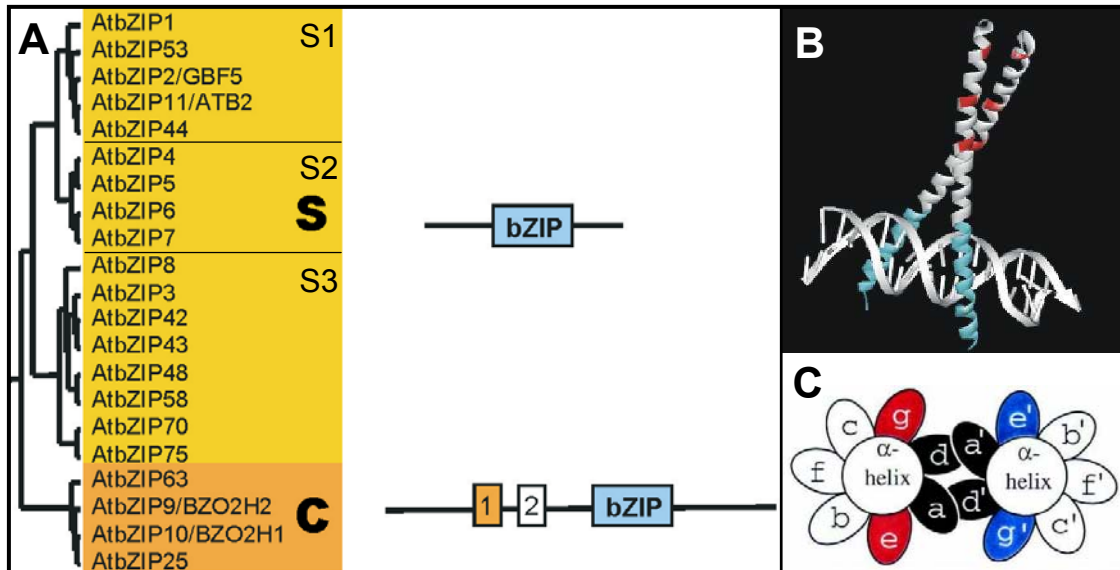
Die basische Domäne des bZIP-Motivs vermittelt die Bindung des Proteins an spezifische DNA *cis*-Elemente. Bei der Dimerisierung werden sie so ausgerichtet, dass sie in die große Furche der DNA-Doppelhelix reichen (Vinson *et al.*, 1989; Abbildung 2.1 B). Es wird angenommen, dass die Dimerisierung der bZIP-Proteine der Bindung an die DNA vorangeht. Metallo und Schepartz (1997) konnten jedoch zeigen, dass einige bZIP-Proteine auch als Monomer an die DNA binden und erst danach eine Dimerisierung erfolgt. Die basische Domäne vermittelt neben der DNA Bindung auch

die Kernlokalisierung, da sie eine Kernlokalisierungssequenz (NLS) umfasst (van der Krol und Chua, 1991; Varagona und Raikhel, 1994).

Bisher untersuchte bZIP-Transkriptionsfaktoren haben vielfältige Funktionen, z.B. bei der lichtregulierten Genexpression (Oyama *et al.*, 1997), bei der Pathogenabwehr (Zhou *et al.*, 2000), bei der Hormon-vermittelten Genexpression (Fukazawa *et al.*, 2000) und bei der Regulationen der Expression von Speicherproteinen im Samen (Schmidt *et al.*, 1992). Darüber hinaus wird ihnen eine Rolle bei der Genexpression als Antwort auf Abscisinsäure, Anaerobiosis, und bei der Verarbeitung von Entwicklungssignalen zugesprochen (Menkens *et al.*, 1995).

bZIP-Transkriptionsfaktoren binden in der Regel an *cis*-Elemente, die eine ACGT Konsensus-Sequenz enthalten (Schindler *et al.*, 1992), aber auch vom ACGT-Kernmotiv abgewandelte Sequenzen werden von einigen bZIP-Faktoren effektiv als DNA-Bindestellen erkannt (de Pater *et al.*, 1994). Für eine effiziente DNA-Bindung sind zusätzlich die Sequenzen von Bedeutung, die das Kernmotiv flankieren (Foster *et al.*, 1994). Im wesentlichen bevorzugen pflanzliche bZIP-Faktoren als Bindemotive palindromische Sequenzen wie die A-Box (TACGTA), die C-Box (GACGTC) oder die G-Box (CACGTG) (Izawa *et al.*, 1993). Es gibt allerdings auch Beispiele für Bindung an nicht palindromische Motive (Choi *et al.*, 2000; Fukazawa *et al.*, 2000). Niu und Guiltinan (1994) konnten zeigen, dass für die Spezifität der DNA-Bindung nicht nur die basische Domäne des Transkriptionsfaktors entscheidend ist, sondern dass unabhängig davon auch der kurze Bereich von circa fünf Aminosäuren zwischen basischer Domäne und Leucin-Zipper eine DNA-Bindenspezifität vermittelt.

Anhand der Struktur bekannter bZIP-Proteine wurden von Jakoby *et al.* (2002) im *Arabidopsis* Genom 75 putative AtbZIP-Transkriptionsfaktoren identifiziert, die mit AtbZIP1 bis AtbZIP75 benannt wurden. Anhand von Sequenzhomologien der basischen Domäne wurden die Proteine in Gruppen eingeteilt. Dazu wurden die AtbZIP-Transkriptionsfaktoren mit Hilfe des MEME Analyse-Programms (<http://meme.sdsc.edu/meme/website/meme.html>) nach sich wiederholenden Motiven außerhalb der bZIP-Domäne untersucht. Auf diese Weise konnten 10 Gruppen mit homologer basischer Domäne und gemeinsamen konservierten Sequenzmotiven gebildet werden.



**Abbildung 2.1:** A) Die Gruppen S und C der AtbZIP-Transkriptionsfaktoren. Links ist ein Stammbaum anhand von Sequenzähnlichkeiten der basischen Domäne wiedergegeben. Rechts ist die für die Gruppe kennzeichnende Domänenstruktur angegeben (Domäne 1: S[QA][SP]E[WL][AT][FL]; Domäne 2: Y[RTH]<sub>x2</sub>L[KR]<sub>x</sub>[KS]L). S1-S3: Untergruppen der Gruppe S. B) Dreidimensionale Struktur der GCN4 bZIP Domäne. Die α-Helices bilden eine doppelt gewundene Struktur (coiled coil). Die basische Domäne ist blau markiert, die Leucin Wiederholungen sind rot markiert (Ellenberger *et al.*, 1992). C) Heptamere Wiederholung in der Aufsicht. Die Reste der Aminosäuren in Position a oder d formen die hydrophobe Interaktionsfläche, während die Reste der Aminosäuren g und e über unterschiedliche Ladungen eine Spezifität der Interaktion vermitteln können.

### 2.3 Die Gruppen C und S der AtbZIP-Transkriptionsfaktoren

Die in dieser Arbeit analysierten AtbZIP-Transkriptionsfaktoren gehören zu den Gruppen C und S (Abbildung 2.1 A). Die Gruppe S umfasst kleine (small) Transkriptionsfaktoren mit einer Masse von 15-20 kDa. Sie bestehen hauptsächlich aus der basischen Domäne und einem langen Leucin-Zipper. Neben diesen Domänen sind nur kurze N- und C-terminale Bereiche vorhanden, weitere gemeinsame konservierte Domänen wurden nicht gefunden. Die Gene verfügen über keine Introns (Jakoby *et al.*, 2002). Zur Gruppe C gehören 4 Transkriptionsfaktoren mit einer Masse von 30-40 kDa. Sie verfügen über putative Phosphorylierungsstellen, die einen Einfluss auf DNA-Bindung und Kerntransport haben könnten (Jakoby *et al.*, 2002).

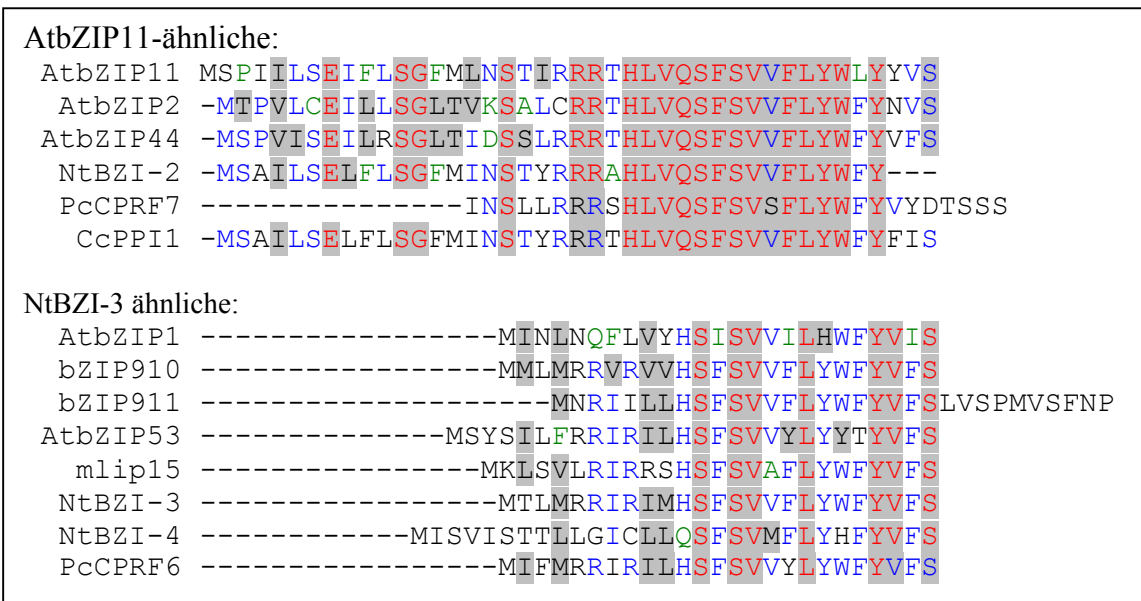
Für die zur Gruppe S gehörenden bZIP Transkriptionsfaktoren BZI-2, BZI-3 und BZI-4 aus *Nicotiana tabacum* wurde eine spezifische Heterodimerisierung mit dem bZIP Transkriptionsfaktor BZI-1 gezeigt. BZI-1 ist homolog zu der Gruppe C von bZIP



Transkriptionsfaktoren (Strathmann *et al.*, 2001). Vergleichbare Interaktionen zwischen bZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S wurden auch für Transkriptionsfaktoren aus *Petroselinum crispum* gefunden. CPRF2, der Namensgeber der Gruppe C, interagiert spezifisch mit den Gruppe S bZIP-Transkriptionsfaktoren CPRF6 und CPRF7 (Rugner *et al.*, 2001). Diese C/S Heterodimerisierungen scheinen konserviert zu sein, da für BZI-1 aus Tabak auch eine Heterodimerisierung mit CPRF6 und CPRF7 aus Petersilie gezeigt werden konnte (Strathmann, 2003). Ein gemeinsames Merkmal von AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S, das in Zusammenhang mit der Heterodimerisierung stehen könnte, ist ein ungewöhnlich langer Leucin-Zipper mit 8 heptameren Wiederholungen (Jakoby *et al.*, 2002).

Die durch die Fähigkeit Heterodimere zu bilden möglichen verschiedenen Kombinationen von bZIP-Proteinen können sich in ihrem DNA-Bindungsverhalten und ihren Aktivierungseigenschaften unterscheiden (Lamb und McKnight, 1991; Pysch *et al.*, 1993). Auf diese Weise kann eine begrenzte Zahl von bZIP-Transkriptionsfaktoren eine Vielzahl von regulatorischen Einflüssen ausüben. Die daraus entstehende Komplexität lässt sich vielleicht dadurch erklären, dass die Heterodimerisierung ein Mechanismus der Signalintegration ist, und macht heterodimerisierende AtbZIP-Transkriptionsfaktoren zu einem interessanten, aber auch schwierigen Forschungsthema.

Obwohl die Gruppe S die größte Gruppe von AtbZIP-Transkriptionsfaktoren in *Arabidopsis thaliana* ist, ist bisher lediglich ein Mitglied, AtbZIP11 ( ATB2 ), näher untersucht worden (Rook *et al.*, 1998b). AtbZIP11 wird in Sink-Gewebe bevorzugt im Leitgewebe exprimiert und ist durch Licht induzierbar. Des weiteren verfügt *AtbZIP11* über einen ungewöhnlich langen 5'-untranslatierten Bereich mit einem offenen Leserahmen (uORF), für den gezeigt werden konnte, dass er an einer Repression der Translation durch Saccharose beteiligt ist (Rook *et al.*, 1998a; Wiese *et al.*, 2004). Es ist bekannt, dass uORFs die Translation regulieren können (Geballe und Morris, 1994). Dieser uORF, dessen Aminosäuresequenz stark konserviert ist, findet sich in *Arabidopsis thaliana* in den 5' untranslatierten Bereichen von fünf Mitgliedern der Gruppe S (Abbildung 2.2), die aufgrund von Sequenzhomologien in eine Untergruppe, S1, eingeteilt werden. Für andere Mitglieder der Gruppe S1 konnte eine Saccharose-spezifische Repression der Translation ebenfalls gezeigt werden (Wiese *et al.*, 2005).



**Abbildung 2.2: Konservierte uORFs von Gruppe S1 bZIP-Transkriptionsfaktoren verschiedener Pflanzenspezies.** Anhand der Länge der uORFs lässt sich die Gruppe S1 in die Untergruppen der AtbZIP1-ähnlichen und der NtBZI-3 ähnlichen unterteilen. Rot auf Grau: identische Aminosäuren (AS); Blau: konservierte AS; Schwarz auf Grau: ähnliche AS; Grün: schwach ähnliche AS.

Die Gruppe S1 lässt sich in zwei weitere Untergruppen unterteilen. Die Untergruppe der AtbZIP11-ähnlichen Transkriptionsfaktoren, zu der AtbZIP2, AtbZIP11 und AtbZIP44 gehören, unterscheidet sich durch einen längeren uORF sowie das Vorhandensein einer kurzen, serinreichen N-terminalen Sequenz im eigentlichen Kodierbereich von der Untergruppe der NtBZI-3-ähnlichen Transkriptionsfaktoren, zu der AtbZIP1 und AtbZIP53 gehören (Strathmann *et al.*, 2001).

## 2.4 Zucker und Zucker-abhängige Signalwege

Pflanzen müssen wie andere Organismen ihre Entwicklung und ihren Metabolismus abhängig von der Verfügbarkeit der Energiequelle Zucker regulieren. Beispiel für solche Zucker-regulierten Prozesse sind Samenentwicklung (Borisjuk *et al.*, 2004), Pollenentwicklung (Zhang *et al.*, 2001) oder Seneszenz (Paul und Pellny, 2003). Für die Wahrnehmung verfügbarer Zucker haben Pflanzen verschiedene Zucker-abhängige Signalwege (zur Übersicht siehe Roland *et al.* (2002); Smeekens, (2000)). Zucker wie Glukose und Saccharose können wahrscheinlich direkt wahrgenommen werden. Der Nachweis einer Signalwirkung von Saccharose ist schwierig, da Saccharose von

Pflanzen schnell zu Hexosen hydrolysiert werden kann. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die Translation von Gruppe S1 AtbZIP-Transkriptionsfaktoren spezifisch durch Saccharose, nicht durch Glukose oder Fruktose reguliert wird (Rook *et al.*, 1998a; Wiese *et al.*, 2004). Für Zuckerrüben konnte eine Saccharose-spezifische Repression der Transkription eines Gens, das einen Saccharose-Transporter codiert, gezeigt werden (Chiou und Bush, 1998). Da Glukose und Fruktose von der Pflanze leicht in Saccharose umgewandelt werden können, wird vermutet, dass nicht die zelluläre Saccharosekonzentration wahrgenommen wird, sondern der Import von Saccharose durch die Zellmembran (Smeekens, 2000).

Für die Glukose-Wahrnehmung existieren wahrscheinlich mindestens zwei unabhängige Systeme. Am besten untersucht ist die Hexokinase-abhängige Signaltransduktion (Moore *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2000). Hexokinase katalysiert die Phosphorylierung von Glukose und ermöglicht so ihren Eintritt in die Glykolyse. Für die Hexokinase wird zudem eine von der Phosphorylierungsreaktion abhängige Wahrnehmung von Glukose und eine entsprechende Signalweiterleitung postuliert, da Substrate wie 2-Deoxyglukose, die wie Glukose phosphoryliert werden können, Hexokinase-abhängige Signalwege aktivieren können, andere Glukose-Analoga wie 6-Deoxyglukose, die zwar in die Zelle transportiert werden können, aber nicht phosphoryliert werden, jedoch nicht dazu in der Lage sind. Für 3-ortho-Methylglukose, die keine Hexokinase-abhängigen Signalwege aktivieren kann und lange als nicht phosphorylierbares Substrat galt, konnte gezeigt werden, dass sie durchaus phosphoryliert werden kann, nicht metabolisiert wird und in der Zelle akkumuliert (Cortes *et al.*, 2003). Jedoch ist die Kinetik dieser Phosphorylierungsreaktion deutlich niedriger als die von Glukose, so dass diese Ergebnisse nicht unbedingt der postulierten Signalfunktion der Hexokinase widersprechen. Neben der Hexokinase-abhängigen Signaltransduktion wird auch noch ein Hexokinase-unabhängiger Signalweg vermutet, da bestimmte Zucker-regulierte Gene wie *Pat(B33)* auch durch die nicht phosphorylierbaren Glukose-Analoga aktiviert werden können (Martin *et al.*, 1997).

Außerdem gibt es wahrscheinlich auch Signalwege, die nicht über die absoluten Zucker-Mengen reguliert werden, sondern zum Beispiel über das Kohlenstoff : Stickstoff Verhältnis (Coruzzi und Bush, 2001). Da Zucker Produkte der Photosynthese sind, überrascht es nicht, dass eine Vernetzung zwischen Zucker- und Lichtabhängigen Signalwegen existiert (Ellis *et al.*, 2002). Darüber hinaus gibt es aber auch eine Vernetzung mit verschiedenen Hormon-Signalwegen (Leon und Sheen, 2003). Ein

weiterer Faktor, der in Zusammenhang mit Zuckern berücksichtigt werden muss, ist, dass Änderungen von Zuckerkonzentrationen immer auch einen Einfluss auf das osmotische Potential in der Zelle haben.

## **2.5 AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 in der Pollen- und Samenentwicklung**

Zu den Zucker-regulierten Prozessen, für die eine Beteiligung von zu den Gruppen C und S1 gehörenden bZIP-Transkriptionsfaktoren vermutet wird, gehört die Pollen- und Samenentwicklung.

Die männliche Gametogenese, die Pollenentwicklung, findet in den Staubblättern statt. Staubblätter bestehen aus einem Filament (Stiel), das über das Konnektiv mit den Pollensäcken verbunden ist. Über das Konnektiv und ein an der Innenwand der Pollensäcke existierendes Nährgewebe, das Tapetum, werden die Pollen mit Nährstoffen versorgt (Goldberg *et al.*, 1993; Imlau *et al.*, 1999). In den Pollensäcken entstehen aus Pollenmutterzellen durch Meiose vier haploide Mikrosporen, die einkernigen, primären Pollen. Darauf folgen zwei Mitosen, die zur Bildung des zweikernigen und dreikernigen Pollen führen. Der dreikernige Pollen wird dann tolerant gegen Austrocknung und reift zum fertigen Pollen aus, der nur noch einen Wassergehalt von 15-30% hat (Crowe *et al.*, 1992; Heslop-Harrison, 1978).

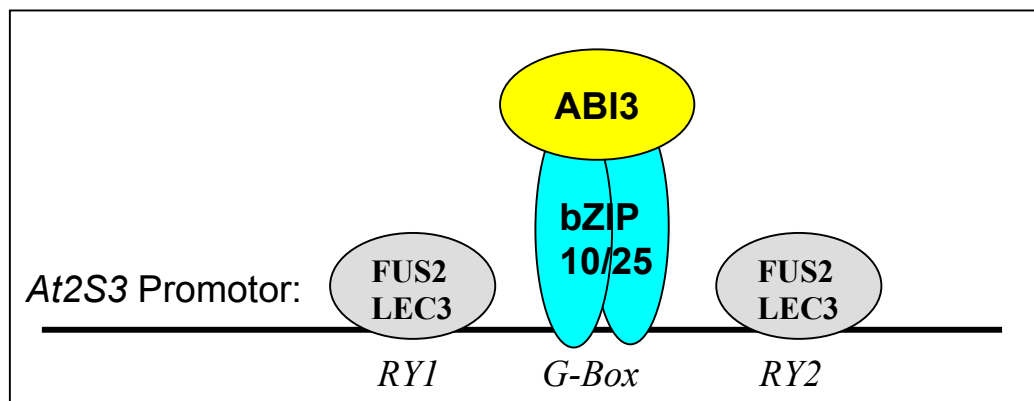
Für Tabak bZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 wird eine Rolle in der Pollenentwicklung diskutiert (Strathmann, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression eines dominant-negativen Deletionsderivates des Gruppe C bZIP-Transkriptionsfaktors BZI-1, BZI-1 $\Delta$ N, dem der N-Terminus mit der darin enthaltenen Aktivierungsdomäne fehlt, zu einer massiven Störung der Pollenentwicklung führt. Es werden weniger Pollen gebildet, und diese sind zum größten Teil degeneriert. Es konnte gezeigt werden, dass die Antheren-spezifische Invertase NIN88, für die eine Rolle in der Zuckerversorgung der Pollen angenommen wird, in diesen Pflanzen kaum exprimiert wird. Für Pflanzen, in denen die Expression der NIN88 über ein Antisense-Konstrukt unterdrückt wurde, wurde eine vergleichbare Störung der Pollenentwicklung gezeigt (Goetz *et al.*, 2001). Der Phänotyp der BZI-1 $\Delta$ N überexprimierenden Pflanzen ist also möglicherweise auf die gestörte Regulation der NIN88 zurückzuführen. Die Überexpression von BZI-4, einem S1 bZIP-Transkriptionsfaktor, der spezifische

Heterodimere mit BZI-1 bildet und vorwiegend in Staubblättern exprimiert wird, führt ebenfalls zu einer Repression der NIN88. Für BZI-4 konnte außerdem in Gel-Retardationsanalysen die Bindung an eine *G-Box* im *NIN-88* Promotor gezeigt werden. Es wird daher vermutet, dass Tabak C/S1 Heterodimere die Invertase NIN88 und damit die Zuckerversorgung der Pollen regulieren.

In *Arabidopsis* wurde für den S1 Faktor AtbZIP11 mit Hilfe von Promotor-GUS Fusionen eine spezifische Expression im Konnektiv gezeigt. Da Überexpression von AtbZIP11 zu einer verstärkten Expression von Zellwand Invertasen führt, wird für AtbZIP11 ebenfalls eine Rolle in der Zuckerverteilung diskutiert (Rook *et al.*, 1998a). Für die S1 Faktoren bZIP910 und bZIP911 aus *Antirrhinum majus* wurde in *in situ* Hybridisierungen eine Expression im Tapetum gezeigt, wo auch sie an der Regulation der Nährstoffversorgung der Pollen beteiligt sein könnten (Martinez-Garcia *et al.*, 1998).

Parallel zur Pollenentwicklung findet im Fruchtknoten die weibliche Gametogenese statt, die zur Bildung der Eizelle und eines Embryosackes führt. Zur Befruchtung wächst aus dem Pollenkorn ein Polenschlauch, und es kommt zur für die Angiospermen typischen doppelten Befruchtung: Ein Pollenkern verschmilzt mit der Eizelle, die sich zum Embryo entwickelt, und ein anderer mit dem Embryosackkern, aus dem sich das Endosperm, ein Nährgewebe, bildet. Während der Samenreifeung akkumulieren Samen verschiedene Speicherstoffe, bei *Arabidopsis thaliana* vorwiegend Lipide und 2S und 12 S Samen-Speicherproteine (SSPs) (Guerche *et al.*, 1990; Mansfield und Briarty, 1992; Pang *et al.*, 1988).

Wichtige *cis*-Elemente in einem *SSP* Promotor aus *Brassica napus*, der zu *SSP*-Promotoren aus *Arabidopsis thaliana* sehr ähnlich ist, sind eine B-box aus einem *DistB* (GCCACTTGTC) und einem *ProxB* (CAAACACC) Element, zwei *RY* (CATGCA) Elemente und eine *G-box* (CACGTG). Mutationen in jedem dieser Elemente führen zu einem starken Rückgang der Promotoraktivität in Samen (Ellerstrom *et al.*, 1996; Ezcurra *et al.*, 1999). In *Arabidopsis thaliana* binden die B3-Transkriptionsfaktoren FUS3 und LEC2 an die *RY*-Elemente, und die Gruppe C AtbZIP-Transkriptionsfaktoren 10 und 25 an die *G-box*, und aktivieren die Expression der *SSP*-Gene. Des Weiteren interagieren AtbZIP10 und AtbZIP25 mit ABI3, einem weiteren B3-Transkriptionsfaktor, der wahrscheinlich als Koaktivator an der Regulation von *SSP*-Genen beteiligt ist (Kroj *et al.*, 2003; Lara *et al.*, 2003; Abbildung 2.3).



**Abbildung 2.3: Modell der SSP-Promotorregulation am Beispiel des *At2S3*-Promotors.** Nach Kroj *et al.*, (2003). FUS3 und LEC2 binden direkt an *RY*-Elemente in *SSP*-Promotoren und aktivieren die Transkription, während ABI3 wahrscheinlich über AtbZIP10 oder AtbZIP25 an *G-Box* Elemente bindet und die Transkription aktiviert.

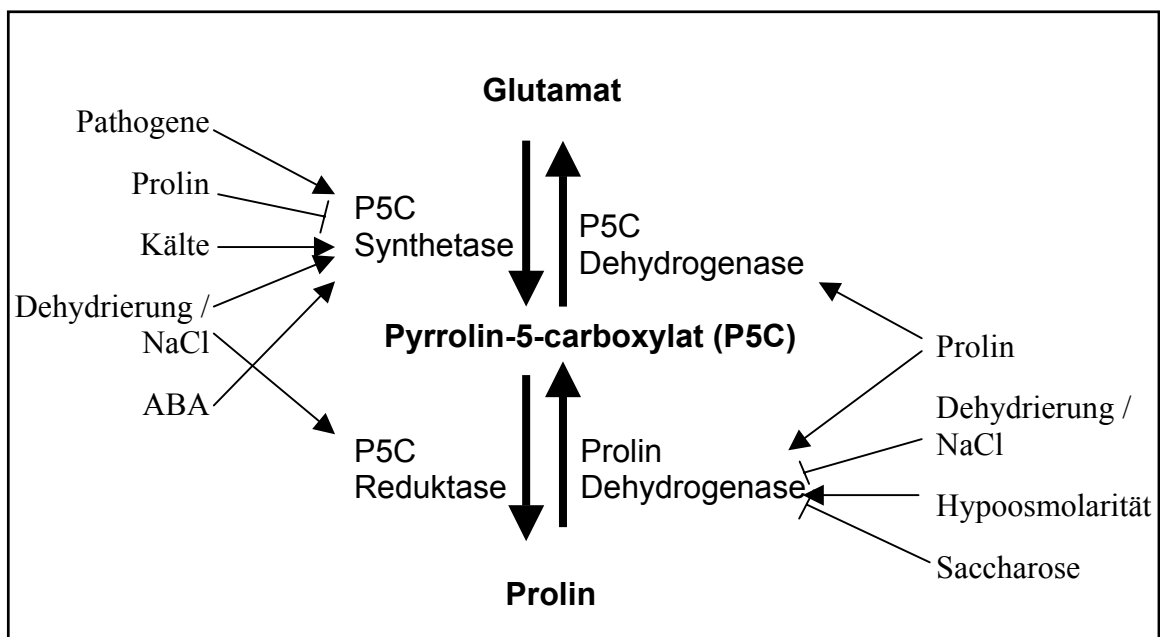
Transkripte von AtbZIP10 und AtbZIP25 konnten in *in situ* Hybridisierungen im Embryo und schwächer auch im Endosperm nachgewiesen werden, während die Transkripte der anderen beiden *Arabidopsis* Gruppe C Faktoren dort nicht nachzuweisen waren. Jedoch wurde für beide Faktoren auch eine deutliche Expression in anderen Geweben, wie Blatt oder Wurzel, gezeigt, sodass sie neben der Samenentwicklung wahrscheinlich auch andere Funktionen haben.

## 2.6 Abiotischer Stress und die Funktion von Prolin im Schutz vor Stress

Kälte, Hitze, Salz oder Trockenheit sind Stresse, an die sich die Pflanze anpassen muss, da sie keine Möglichkeit hat ihnen auszuweichen. Eine wichtige Rolle dabei spielt das Phytohormon Abscisinsäure, das außerdem auch an der späten Phase der Samenentwicklung, in der die Austrocknungstoleranz der Samen ausgeprägt wird, beteiligt ist (Bray, 1993; McCarty, 1995).

Für Homologe der Gruppe S1 aus verschiedenen Spezies, Rdlip, Lip19, tbz17 und mlip15, wurde eine Induktion durch Kältestress gezeigt (Aguan *et al.*, 1993; Ito *et al.*, 1999; Kusano *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2001), für mlip15 außerdem eine Induktion durch Salzstress (Kusano *et al.*, 1995). Des weiteren konnte gezeigt werden, dass in

*Craterostigma plantagineum* ein zur Gruppe S1 gehörender bZIP-Transkriptionsfaktor an ein für die Trockenstress-Induktion essentielles, ABA-induzierbares Element aus dem Promotor des LEA-Gens C2, das in hohem Maße bei Trockenstress induziert wird, bindet (Ditzer, 2003). LEA (late embryogenesis abundant) Gene werden durch ihre Expression in der späten Phase der Samenentwicklung definiert, wo sie, wie unter Trockenstress, an der Ausbildung einer Austrocknungstoleranz beteiligt sein können. Als Reaktion auf Kälte, Salz oder Trocken-Stress akkumulieren viele Pflanzen Prolin (Delauney und Verma, 1993). Unter Stress-Bedingungen fungiert Prolin als kompatibler Osmolyt (Handa *et al.*, 1986), als Schutz vor freien Radikalen (Smirnow und Cumbes, 1989) und als Puffer des zellulären Redox-Potentials (Hare *et al.*, 1998). Für Tabak-Pflanzen mit gesteigerter Prolin-Biosynthese wurde eine gesteigerte Salztoleranz gezeigt, was auf eine direkte Schutzfunktion von Prolin hindeutet (Kavi Kishor *et al.*, 1995). Andererseits führen auch biotische und abiotische Stresse ohne osmolare Komponente, wie etwa UV-Bestrahlung (Pardha Saradhi *et al.*, 1995) oder Stickstoffmangel (Vaucheret *et al.*, 1992) zu einer Prolin-Akkumulation, was eher für eine andere als die biophysikalische Funktion von Prolin unter Stress spricht. Daher wird von (Hare und Cress, 1997) ein anderer möglicher Mechanismus für die Schutzfunktion von Prolin favorisiert: Prolin ist ein sehr guter Energieträger, die Prolin Biosynthese verbraucht viele Reduktionsäquivalente, und könnte unter Stress an der



**Abbildung 2.4: Übersicht über die Regulation der Biosynthese und Degradation von Prolin.** Nach (Abraham *et al.*, 2003; Chiang and Dandekar, 1995; Deuschle *et al.*, 2004; Deuschle *et al.*, 2001; Hellmann *et al.*, 2000; Peng *et al.*, 1996; Satoh *et al.*, 2002).

Wiederherstellung der terminalen Elektronenrezeptoren der Photosynthese beteiligt sein. Nach Ende des Stresses stellt der Abbau von Prolin diese Energie wieder zur Verfügung, die dann für die Regeneration der Pflanze zur Verfügung steht.

Während der Erholung von abiotischem Stress kommt es zur Induktion einer Prolindehydrogenase, die den ersten Schritt des Prolin-Abbaus katalysiert (Kiyosue *et al.*, 1996; Peng *et al.*, 1996; Verbruggen *et al.*, 1996; Abbildung 2.4). Satoh *et al.*, (2002) konnten ein *cis*-Element identifizieren, das für die Induktion der ProDH bei Erholung von osmotischem Stress verantwortlich ist. In Protoplasten-Assays konnte gezeigt werden, dass die vier S1 AtbZIP-Transkriptionsfaktoren AtbZIP2, 11, 44 und 53 über dieses *cis*-Element die Transkription eines Reportergens aktivieren können (Satoh *et al.*, 2004). Es gibt also Hinweise für eine Beteiligung von S1 bZIP-Transkriptionsfaktoren sowohl in der Anpassung an als auch in der Erholung von abiotischem Stress.

## 2.7 Seneszenz und bZIP-Transkriptionsfaktoren

Die Seneszenz von Blättern ist eine Abfolge von degradativen Prozessen, die zum Abbau von Zellbestandteilen und zu der Mobilisierung der darin enthaltenen Nährstoffe, und letztlich zum Tod des Blattes führen. Die Seneszenz wird von der Pflanze streng reguliert, unter anderem über Zucker- oder ABA-abhängige Signalwege (Fujiki *et al.*, 2001; Pourtau *et al.*, 2004). Sie beinhaltet den Stop der Photosynthese, den Abbau von Proteinen, Membranen, RNA und DNA, sowie die Hydrolyse von Polysacchariden und die Oxidation von Fettsäuren (Smart, 1994). Viele verschiedene Seneszenz-assoziierte Gene wurden identifiziert, darunter Proteasen, RNasen, Glutamin Synthetase, Metallothionine, Lipasen, Enzyme des Glyoxylat-Zyklus, Katalasen, Endoxyloglucan Transferasen, PR-Proteine, Glutathione *S*-transferase, Cyt P450 und Polyubiquitin (Buchanan-Wollaston und Ainsworth, 1997; Weaver *et al.*, 1998).

Während die natürliche Seneszenz vom Blattalter und der reproduktiven Phase der Pflanze abhängt, gibt es viele Faktoren wie Trockenstress, Licht- bzw. Zuckermangel oder Pathogenbefall, die eine vorzeitige Seneszenz auslösen können (Smart, 1994). Transkriptomanalysen von dunkelinduzierter und natürlicher Seneszenz haben gezeigt, dass es neben deutlichen Gemeinsamkeiten auch klare Unterschiede zwischen diesen



beiden Formen von Seneszenz gibt (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005). Dunkelinduzierte Seneszenz ist wahrscheinlich auf Zucker-Mangel zurückzuführen, und das Transkriptom von durch andauernde Dunkelheit seneszenten Pflanzen zeigt deutliche Parallelen zu dem von einer durch Zucker-Verarmung in die Seneszenz getriebenen Zellkultur.

Die Transkription des Gruppe S1 bZIP-Transkriptionsfaktors *BZI-3/TBZF* wird durch Seneszenz hochreguliert, und findet vor allem in den Nebenzellen des Spaltöffnungsapparates seneszenten Blätter statt (Yang *et al.*, 2001). Die Transkriptmenge von *mlip15*, eines weiteren Gruppe S1 bZIP-Transkriptionsfaktors, steigt ebenfalls während der Seneszenz (Berberich *et al.*, 1999).

## 2.8 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

In Tabak und Petersilie wurde eine spezifische Heterodimerisierung zwischen bZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S beschrieben. Über die Funktion dieser Faktoren ist jedoch wenig bekannt, und die biologische Bedeutung der Heterodimerisierung ist bisher nicht untersucht worden.

Erstes Ziel der Arbeit ist, die Heterodimerisierung zwischen *Arabidopsis thaliana* bZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S auf genomischer Basis zu zeigen. Können spezifische Heterodimerisierungen gezeigt werden, so soll im folgenden die biologische Funktion der einzelnen Heterodimerisierungspartner sowie die funktionelle Bedeutung der Heterodimerisierung untersucht werden. Dafür werden zunächst für die heterodimerisierenden Faktoren die Expressionsmuster untersucht. Mit Hilfe von Promotor-GUS Fusionen kann die für die Heterodimerisierung notwendige gewebespezifische Kolo-kalisation analysiert werden. Durch Northern-Analysen und Daten aus Mikroarraydatenbanken wird außerdem die stressabhängige Regulation der AtbZIP-Transkriptionsfaktoren untersucht. Anhand dieser Daten können Vorhersagen getroffen werden, welche Heterodimere unter bestimmten Bedingungen in bestimmten Geweben entstehen können, und wo ihre biologische Funktion liegen könnte.

Transgene Pflanzen mit einer konstitutiven ektopischen Expression der AtbZIP-Transkriptionsfaktoren, die im Rahmen der Dissertation erzeugt werden, können durch den Vergleich der Transkriptome dieser Pflanzen mit dem Wildtyp-Transkriptom helfen

mögliche Zielgene zu identifizieren. Neben den Überexpressionslinien werden auch T-DNA Insertionsmutanten der AtbZIP-Transkriptionsfaktoren charakterisiert, um mit diesen Pflanzen ebenfalls Transkriptomanalysen durchzuführen und den Einfluss der fehlenden Expression der bZIP-Faktoren auf mögliche Zielgene zu untersuchen. Direkte Zielgene sollen mittels Chromatin-Immunopräzipitation bestätigt werden. Um die Bedeutung der untersuchten AtbZIP-Transkriptionsfaktoren für bestimmte biologische Funktionen zu analysieren, werden die Überexpressions- und Knock Out Pflanzen phänotypisch charakterisiert. Modellhaft soll für ein direktes Zielgen der Einfluss der Heterodimerisierung auf dessen Transkription in Protoplasten-Assays untersucht werden. Die so gesammelten Daten dienen als Basis für Aussagen über die biologische Funktion der einzelnen AtbZIP-Transkriptionsfaktoren, sowie die biologische Funktion der Heterodimerisierung.

## 3 Material

### 3.1 Organismen

#### 3.1.1 Hefestämme (*Saccharomyces cerevisiae*)

Stamm	Eigenschaften	Referenz
MaV203	MAT $\alpha$ , leu2-3,112, trp1-901, his3 $\Delta$ 200, ade2-101, gal4 $\Delta$ , gal80 $\Delta$ , SPAL10:: URA3, GAL1:: lacZ, HIS3UAS GAL1 ::HIS3@ LYS2, can1 <sup>r</sup> , cyh2 <sup>r</sup>	(Vidal, 1997)

#### 3.1.2 Bakterienstämme

Stamm	Eigenschaften	Referenz
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101	pMP90RK Rif <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup>	(Koncz und Schell, 1986)
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	<i>recA1 relA1 thi-1 <math>\Delta</math>lacU169 <math>\phi</math>80</i> ( <i>lacZ <math>\Delta</math>M15</i> ) <i>hsdR17</i> (r <sub>k</sub> -m <sub>k</sub> +)	(Hanahan, 1983)
<i>Escherichia coli</i> DB3.1	F <sup>-</sup> <i>gyrA462 endA1 D( sr1- recA) mcrB</i> <i>mrr hsdS20</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> , m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>supE44 ara-14</i> <i>galK2 lacY1 proA2 rpsL20</i> (Sm <sup>r</sup> ) <i>xyl-5</i> $\lambda$ <sup>-</sup> <i>leu mtl-1</i> .	(Bernard <i>et al.</i> , 1993)

#### 3.1.3 Pflanzenmaterial: Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*)

Kultivar	Eigenschaften	Herkunft
Columbia Col-o N1092	Wildtyp	Kultursorte
Garlic_195_E05.b.1a.Lb3Fa	AtbZIP53 Knock down Linie	Syngenta
SALK_059343	AtbZIP1 Knock out Linie	NASC stock center
SALK_069489	AtbZIP1 Knock out Linie	NASC stock center
SALK_093416	AtbZIP9 Knock out Linie	NASC stock center
SALK_069883	AtbZIP53 Knock down Linie	NASC stock center
SALK_066531	AtbZIP63 Knock out Linie	NASC stock center
prom <sub>AtbZIP1</sub> :GUS	Promotor-GUS Fusion	(Weltmeier, 2002)
prom <sub>AtbZIP53</sub> :GUS	Promotor-GUS Fusion	(Weltmeier, 2002)
prom <sub>AtbZIP9</sub> :GUS	Promotor-GUS Fusion	Xuan Wang

prom <sub>AtbZIP11</sub> :GUS	Promotor-GUS Fusion	(Rook <i>et al.</i> , 1998b)
prom <sub>AtbZIP44</sub> :GUS	Promotor-GUS Fusion	(Wobbes, 2004)
prom <sub>AtbZIP2</sub> :GUS	Promotor-GUS Fusion	(Wobbes, 2004)
prom <sub>AtbZIP10</sub> :GUS	Promotor-GUS Fusion	Klaus Harter
prom <sub>AtbZIP25</sub> :GUS	Promotor-GUS Fusion	Jesus Vincente-Carbajosa
prom <sub>AtbZIP63</sub> :GUS	Promotor-GUS Fusion	Jesus Vincente-Carbajosa

## 3.2 Nukleinsäuren

### 3.2.1 Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pDEST22	GAL4 <sub>(768-881)</sub> AD, TRP1, ARS4/CEN6, pUC ori, Amp <sup>r</sup> , attR1, Cm <sup>r</sup> , ccdB, attR2	Invitrogen, 2001
pDEST32	GAL4 <sub>(1-147)</sub> DB, LEU1, ARS4/CEN6, pUC ori, CYH2 <sup>S</sup> , Gm <sup>r</sup> , attR1, Cm <sup>r</sup> , ccdB, attR2	Invitrogen, 2001
pDONR201	pUC ori, Km <sup>r</sup> , attL1, Cm <sup>r</sup> , ccdB, attL2	Invitrogen, 2001
pDON201-AtbZIP1	pUC ori, Gm <sup>r</sup> , attL1, AtbZIP1, attL2	(Weltmeier, 2002)
pDON201-AtbZIP2	pUC ori, Km <sup>r</sup> , attL1, AtbZIP2, attL2	Sjef Smeekens, REGIA Projekt
pDON201-AtbZIP11	pUC ori, Km <sup>r</sup> , attL1, AtbZIP11, attL2	Sjef Smeekens, REGIA Projekt
pDON201-AtbZIP44	pUC ori, Km <sup>r</sup> , attL1, AtbZIP44, attL2	Sjef Smeekens, REGIA Projekt
pDON201-AtbZIP53	pUC ori, Gm <sup>r</sup> , attL1, AtbZIP53, attL2	(Weltmeier, 2002)
pDON207-AtbZIP9	pUC ori, Gm <sup>r</sup> , attL1, AtbZIP9, attL2	(Weltmeier, 2002)
pDON201-AtbZIP10	pUC ori, Gm <sup>r</sup> , attL1, AtbZIP10, attL2	Jesus Vincente-Carbajosa, REGIA Projekt
pDON201-AtbZIP25	pUC ori, Gm <sup>r</sup> , attL1, AtbZIP25, attL2	Jesus Vincente-Carbajosa, REGIA Projekt
pDON201-AtbZIP63	pUC ori, Gm <sup>r</sup> , attL1, AtbZIP63, attL2	Jesus Vincente-Carbajosa, REGIA Projekt
pGEM-T	f1 ori, colE1 ori, lacZ, MCS, Amp <sup>r</sup> , SP6 und T-Promotor	Promega, 1999

pAlligator2	2S1:GFP, T-DNA Border Sequenzen, 2x35S-Promotor, 3x HA-tag (N-terminal), <i>attR1</i> , <i>Cm<sup>r</sup></i> , <i>ccdB</i> , <i>attR2</i>	Parcy, F. ; <a href="http://www.isv.cnrs-gif.fr/JG/alligator/intro.html">http://www.isv.cnrs-gif.fr/JG/alligator/intro.html</a>
pBT10-2xProDH-GUS	3x G/C- Element, pUC ori, 35S-Minimalpromotor, <i>GUS</i> - Reporter gen, <i>Amp<sup>R</sup></i> ,	(Ehlert, 2004)
pHBTL- HAGW	3x HA- tag, pUC ori, <i>Amp<sup>R</sup></i> , <i>attR1</i> , <i>ccdB</i> , <i>Cm<sup>R</sup></i> , <i>attR2</i>	(Ehlert, 2004)

### 3.2.2 Primer

Name	Länge (bp)	Sequenz (5'→3')
2S1 chip F	19	GACCGGTGACCTGCGTGTA
2S1 chip R	21	GACTTGCATGGAGTTCACGTG
35S1	23	ATTGATGTGATATCTCCACTGAC
5'-GUS	24	GGTTTCTACAGGACGTAACATAAG
Actin8 3'-anti	20	AGGTCTCCATCTCTTGCTCG
Actin8 5'-sense	20	GCTGGATTGCTGGAGATGA
ASN1antisense	20	CGAAATGCTCACAGTCATCG
ASN1chip rev	21	GACCAGCTGTTTCCACGTGTT
ASN1chip for	21	CACGTGTACGGCTCTAAAGCA
ASN1sense	21	GTGGAATACTTGCCGTGTTAG
AtcwINV1gstFOR	21	TTCAAAGCCCGTCAAAACAGC
AtcwINV1gstREV	21	GCTCTTCCCTTTCCACCGAAA
AtcwINV2gstFOR	18	GAAGGGTTGGGCCGGAAT
AtcwINV2gstREV	20	TTGCGAAGCTTTCGTCAAAC
AtcwINV3for2	22	GACGAGGATTAGCGATTCTTTA
AtcwINV3gstFOR	20	TGATCACTCGATAGTGGAGA
AtcwINV3gstREV	22	CAAAACTGATGATTAGGTGAGC
AtcwINV4gstFOR	21	ACGGTGCTCCTTGATTCAAGC
AtcwINV4gstREV	21	GCGAGTAAACCCGTGTCTTGC
AtcwINV5gstFOR	25	CCTAGGAAAGTATGGCTTGATGAAT
AtcwINV5gstREV	25	GAAGAAAACCTCCACATCTGCTTGT
AtcwINV6gstFOR	25	GAAGTGACTTTTAATCTGCCTTTCC
AtcwINV6gstREV	19	TCTTCTCGCTGCTGCACAT
BD-GWkasFOR	36	AGGTACCAACAATGAAGCTACTGTCTTCTATCGAAC
bzip11rev	20	GGTTCGAACACATGCCCATG
bZIP1pGUSf	26	GTCGACCTTGAATTATCCTACGAGTG
bZIP1pGUSf2	26	GTCGACACCACAATTTGGAACATAA
bZIP1pGUSf3	26	GTCGACATCATTTTCAGATAAGACCCA
bZIP1pGUSr	26	GAATTCTCAAGAGATAACGTAAAACC
bZIP1pGUSr2	20	ACGCTTAACATGGTTGACAA
bZIP1TF#1	20	GGCAAACGCAGAGAAGACAA
bZIP1TF#2	20	GGACGCCATTGGTTGTAGAG
bzip2rev	20	CAAAACCACAGCCGTCGATC
bzip44cDNA#1	22	ATGGGATCTTCCACAAGTGGAA

bzip44cDNA#2	22	CCTGCTGCGATGATTAGTCTCA
bzip44rev	19	GCCGTGGAATAATCCACCG
bzip53cDNA#1	22	ATGGGGTCGTTGCAAATGCAAA
bzip53cDNA#2	23	TCAGCAATCAAACATATCAGCCA
bZIP53pGUSf	26	CTGCAGCTTAGGACAGCTCATACCA
bZIP53pGUSf2	26	CTGCAGAAGTCCAGGTCAAGTTTGTT
bZIP53pGUSf3	26	GGATCCATGTTTCAGATTCTGCGCTTA
bZIP53pGUSr	26	GTCGACCTCGTTGACTTTTTGACTTC
bZIP53pGUSr2	20	AAAGGCCAAACGAAAGAAGG
bZIP53pp antisense	30	GCGTTATCATTCTTGGGAAGAGTGACTTCG
bZIP53pp sense	30	CGAAGTCACTCTTCCCAAGAATGATAACGC
bZIP53TF#1	25	GTGCTTGAGATGGTTGAAGAAATTA
bZIP53TF#2	25	CATACAAAGACACGAACAAATTGAA
bzip9cDNA#1	23	ATGGATAATCACACAGCTAAAGA
bzip9cDNA#2	23	AGAGTCATGGCCAGATGTCTGAG
bZIP9TF#1	20	CGCAACACAACAGTTTCGTA
bZIP9TF#2	20	GCCAGATGTCTGAGACGCAG
c63fgw	51	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGCGTGTGGT GTTTCCGTCTC
c63rev2	20	TCTCCGTCGTCTGCAGCGGC
c63rgw	50	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTACTGATCC CCAACGCTTC
cambia-GUS	24	TCGCGATCCAGACTGAATGCCAC
cAtbZIP1FORGW	60	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCAAAC GCAGAGAAGACAAGTTCAGG
cATBZIP1FORGW	60	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCAAAC GCAGAGAAGACAAGTTCAGG
cAtbZIP1REVGW	59	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCATGTCTTAA AGGACGCCATTGGTTGTAG
cATBZIP1REVGW	59	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCATGTCTTAA AGGACGCCATTGGTTGTAG
cAtbZIP53FORGW	60	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGGGTCCG TTGCAAATGCAAACAAGTCC
cATBZIP53FORGW	60	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGGGTCCG TTGCAAATGCAAACAAGTCC
cAtbZIP53REVGW	58	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCAGCAATCAA ACATATCAGCAGAAGCTC
cATBZIP53REVGW	58	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCAGCAATCAA ACATATCAGCAGAAGCTC
CHSA back	24	CACTTACTTACACTTGCCTTGAG
CHSA front	24	CCAATTAAGATAAAACGTTGAATG
CRU3 chip F	21	TGACATATGCGGAGAGTGAGC
CRU3 chip R	20	CAACGAGGAGATTGCTGAGC
Gal4AD	20	TACCACTACTACAATGGATG
Gal4BD	21	TCATCGGAAGAGAGTAGTAAC
GolS2sense	22	CTTGGACGGTGACATACAAGTG
GolS2antisense	20	TGACATACTGAAGCGCACCG
GW32kassettefor	33	CATCAATTGACAAGTTTGTACAAAAAAGCTGAA

GW32kassetterev	33	CATCTCGAGAACCACTTTGTACAAGAAAGCTGA
GWkassetteREV	31	AGGTACCACCACTTTGTACAAGAAAGCTGAA
HA forw	20	GCGGCCGCATCTTTTACCCA
HA.GWkassetteFOR	34	AGGTACCAACAATGGCATACCCATACGACGTTCC
LBa1	22	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG
LBb1	22	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT
LPbZIP1	25	GCAACCTAAAACGAACAACCTTCTCC
mutZIP53A72Pantis	44	CCATTTCAATGTATTTCTTTGATGGTTCATCAACCTGCTCAG TG
mutZIP53A72Psense	44	CACTGAGCAGGTTGATGAACCATCAAAGAAATACATTGAAA TGG
oligo dT	20	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
p63f	22	CGTAGCTCGGTCATTGTGTCCG
pBD2	21	TCATCGGAAGAGAGTAGTAAC
pBD2	21	TCATCGGAAGAGAGTAGTAAC
PDHpromfor	21	CAAGTCCAGGTCCACATGTTG
PDHpromrev	19	CAAGGCCCTGACCATAGGA
PEPCKsense	20	ATGGCGGGAACGGAACGA
PEPCKantisense	20	TCGTACAACCTCGGCGGAGA
proDH for	20	ATGGCAACCCGTCTTCTCCG
proDH rev	20	TGGTCGGTCTTTGTGTCAGCAT
REGIA Primer attB1	52	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCCAATTCCAG CTGACCACCATG
REGIA Primer attB2	51	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCGATCCCCG GGAATTGCCATG
rev24	24	TTCACACAGGAAACAGCTATGACC
SEQL1 pDONR	25	TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC
SEQL2 pDONR	24	GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC
shortbzip1cDNA#1	27	ATGGCAAACGCAGAGAAGACAAGTTCA
shortbzip1cDNA#2	27	TCATGTCTTAAAGGACGCCATTGGTTG
T6PPAT4G22590s	21	CTTGGATCATCCTTCCCTTCA
T6PPAT4G22590as	19	TGGCCAGTCCTTCTCGTCA
TUP1RD	20	AGCCGTCCTAATCTGGTTGG
uni24	24	ACGACGTTGTAACGACGGCCAG

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

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

$T_m$  = Schmelztemperatur,  $n$  = Anzahl der Basen.

### 3.2.3 Hybridisierungssonden

Sonde	Eigenschaften	Referenz
AtbZIP1	Mit den Primern bZIP1TF#1 und bZIP1TF#2 auf cDNA erhaltenes PCR-Produkt	Diese Arbeit
AtbZIP53	Mit den Primern bZIP53TF#1 und bZIP53TF#2 auf cDNA erhaltenes PCR-Produkt	Diese Arbeit

AtbZIP9	Mit den Primern bZIP9TF#1 und bZIP9TF#2 auf cDNA erhaltenes PCR-Produkt	Diese Arbeit
AtbZIP63	Mit den Primern bZIP63TF#1 und bZIP63TF#2 auf cDNA erhaltenes PCR-Produkt	Diese Arbeit
AtbZIP10	Mit den Primern bZIP10TF#1 und bZIP10TF#2 auf cDNA erhaltenes PCR-Produkt	Diese Arbeit
AtbZIP25	1024 bp <i>Bsp1407I</i> -Fragment aus pHBTL-HAGW	Diese Arbeit
ProDH	Mit den Primern proDH for und proDH rev auf cDNA erhaltenes PCR-Produkt	Diese Arbeit
At4g22590 (T6PP)	Mit den Primern T6PPAT4G22590s und T6PPA T4G22590as auf cDNA erhaltenes PCR-Produkt	Diese Arbeit
GolS2	Mit den Primern GolS2sense und GolS2 antisense auf cDNA erhaltenes PCR-Produkt	Diese Arbeit
PEP-CK	Mit den Primern PEPCKsense und PEPCK antisense auf cDNA erhaltenes PCR-Produkt	Diese Arbeit
2S Albumin 1	~500 bp <i>EcoRI</i> -Fragment aus pGEM-2S1	Vincente-Carbajosa
CRU3	~500 bp <i>EcoRI</i> -Fragment aus pGEM-CRU3	Vincente-Carbajosa
ASN1	Mit den Primern ASN1antisense und ASN1 antisense auf cDNA erhaltenes PCR-Produkt	Diese Arbeit
PR-1	~500 bp <i>EcoRI</i> -Fragment aus pSK-AtPR1	Brenner, 2002
LEA76-like	Mit den Primern auf cDNA erhaltenes PCR-Produkt	Diese Arbeit

### 3.3 Nährmedien und Zusätze

#### 3.3.1 Hefemedien

<u>SD-Medium</u>	6,7 g / l	Nitrogen base without amino acids
(Clontech, 1996)	0,61 g / l	Complete Supplement Mixture (CSM)
	20 g / l	Glucose
		pH 5,8
		nach dem Autoklavieren steril hinzufügen:
	25 ml / l	Aminosäure- / Adenin-Stammlösungen (40 x Stocks)
<u>YPD-Medium</u>	20 g / l	Difco Pepton
(Clontech, 1996)	10 g / l	Hefeextrakt
	20 g / l	Glucose
		pH 5,8
		autoklavieren



**3.3.2 Bakterienmedien**

<u>LB-Medium</u> (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	10 g / l	Trypton
	5 g / l	Hefeextrakt
	5 g / l	NaCl
		pH 7,4 autoklavieren
<u>SOC-Medium</u> (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	20 g / l	Trypton
	5 g / l	Hefeextrakt
	10 ml	1 M NaCl
	2,5 ml	1 M KCl
		pH 7,0 nach dem Autoklavieren steril hinzufügen:
	10 ml	1 M MgCl <sub>2</sub>
	10 ml	1 M MgSO <sub>4</sub>
	10 ml 2 M Glucose	
<u>Transformationsmedium</u>	50 g/l	Saccharose
	500 µl/l	Silwet L-77
<u>YEB-Medium</u>	10 g/l	Fleischextrakt (Lab lemco powder)
	2 g/l	Hefe-Extrakt
	5 g/l	Pepton
	5 g/l	Saccharose
	0,5 g/l	MgSO <sub>4</sub>
		pH 7 einstellen autoklavieren

**3.3.3 Pflanzenmedien**

<u>2MS-Medium</u> (Murashige und Skoog, 1962)	4,59 g/l	Murashige und Skoog Medium
	20 g/l	Saccharose pH 5,8 mit KOH einstellen
	10 g/l	Select Agar

Antibiotika nach dem Autoklavieren steril hinzugeben

Medium für Hydroponische Kultur

## Stammlösungen:

Spurenelemente Lösung	50 mM	KCl
	50 mM	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
	10 mM	MnSO <sub>4</sub>
	2 mM	ZnSO <sub>4</sub>
	1,5 mM	CuSO <sub>4</sub>
1:1000 NaSiO <sub>3</sub> Stammlsg.	0,1 M	NaSiO <sub>3</sub>
1:1000 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Stammlsg.	0,5 M	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1:10000 Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,75 mM	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>
KNO <sub>3</sub> Lsg.	1 M	KNO <sub>3</sub>
MgSO <sub>4</sub> Lsg.	1 M	MgSO <sub>4</sub>
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Lsg.	1 M	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Eisen-EDTA:	72 mM	FeCl <sub>3</sub>
	72 mM	EDTA unter Rühren aufkochen
hydroponische Lsg.:		4 l destilliertes H <sub>2</sub> O vorlegen
(für 12 l = einen Kanister)	12 ml	Spurenelemente Lsg.
	12 ml	NaSiO <sub>3</sub> Stammlsg.
	12 ml	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Stammlsg.
	12 ml	Eisen-EDTA
	1,2 ml	Na <sub>2</sub> MO <sub>4</sub> Stammlsg.
	15 ml	KNO <sub>3</sub> Lsg.
	9 ml	MgSO <sub>4</sub> Lsg.
	18 ml	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>

auf 12 l mit destilliertem H<sub>2</sub>O auffüllen

Die Vorlage von Wasser verhindert das Ausfallen der Salze. Auf das Autoklavieren wird verzichtet.



<u>DNA-Extraktionspuffer</u>	0,35 M	Sorbitol
	0,1 M	Tris
	5 mM	EDTA
		pH 7,5
<u>Extraktionspuffer (Kerne)</u>	500 mM	Hexylenglycol
	50 mM	PIPES-KOH pH7,2
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>
	5 mM	β-Mercaptoethanol
<u>DNA-Präparationspuffer</u>	5 ml	DNA-Extraktionspuffer
	5 ml	Kernlysepuffer
	1 ml	5% Sarkosyl
	30-50 mg	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>
<u>FAA</u>	50 %	Ethanol
	10 %	Eisessig
	5 %	Formaldehyd
<u>Fällungspuffer</u>	1,2 M	NaCl
	0,8 M	tri-Natrium-Citrat
<u>Gradientenpuffer</u>	500 mM	Hexylenglycol
	50 mM	PIPES-KOH pH7,2
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>
	1 %	Triton X-100
	5 mM	β-Mercaptoethanol
<u>GUS-Färbe-Puffer</u>	50 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> / NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,2)
	0,2 %	Triton X-100
	0,5 mM	K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>
	0,5 mM	K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>
<u>Hybridisierlösung</u>	0,5 M	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> / NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,2)
	1 mM	EDTA
	7 %	SDS

<u>Heringssperma-DNA</u>	10 mg/ml	in TE durch Rühren (1h) lösen falls nötig: Ultraschallbehandeln bei -20 °C lagern vor Verwendung 20 Minuten kochen
<u>Kernlysepuffer</u>	0,2 M	Tris
	0,05 M	EDTA
	2 M	NaCl
	2 %	CTAB
<u>10x Lithium-Acetat</u>	1 M	Lithiumacetat pH 7,5 mit Essigsäure einstellen
<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 <sub>2</sub> O auf 1 l auffüllen
	2,5 mg/ml	Lyticase pH 7,4, bei -20°C lagern
<u>10 x MEN-Puffer</u>	200 mM	MOPS
	50 mM	NaAc
	10 mM	EDTA
		pH 7,0 einstellen mit 1M NaOH, autoklavieren
<u>Na-Acetat-Puffer</u>	3 M	Na-Acetat

pH 5,2 (Essigsäure)

<u>oNPG-Lösung</u>	4 mg/ml	oNPG, gelöst in Z-Puffer
<u>PCI-Mix</u>	250 ml	Phenol
	250 ml	Chloroform
	10,4 ml	Isoamylalkohol
		1 Stunden auf dem Magnetrührer mischen
<u>PEG/LiAc</u>	8 ml	50 % PEG 3350
	1 ml	10x TE
	1 ml	10x LiAc
<u>35% Percoll</u>	35 %	Percoll
	500 mM	Hexylenglycol
	50 mM	PIPES-KOH pH7,2
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>
	1 %	Triton X-100
	5 mM	β-Mercaptoethanol
<u>75% Percoll</u>	75 %	Percoll
	500 mM	Hexylenglycol
	50 mM	PIPES-KOH pH7,2
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>
	1 %	Triton X-100
	5 mM	β-Mercaptoethanol
<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>RNA-Denaturierungspuffer</u>	600 µl	Formamid

	180 µl	Formaldehyd
	150 µl	10 x MEN
	150 µl	BPB-Auftragspuffer
	6 µl	Ethidiumbromid
<u>20 x SSC-Puffer</u>	3 M	NaCl
	0,3 M	NaCitrat
<u>20 x TAE</u>	0,8 M	Tris-HCl
	0,2 M	NaAc
	20 mM	EDTA
		pH 7,8 mit Essigsäure einstellen
<u>10x Taq DNA-Polymerase-Puffer (MBI)</u>	100 mM	Tris-HCl pH 8,3; 20 °C
	500 mM	KCl
	0,8 %	Nonidet P40
<u>10 x TE-Puffer</u>	100 mM	Tris-HCl
	10 mM	EDTA
		pH 7,5
<u>Triazolpuffer</u>	380 ml/l	Phenol mit 0,1 M Citrat-Puffer gesättigt
	0,8 M	Guanidiniumthiocyanat
	0,4 M	Ammoniumthiocyanat
	33,4 ml/l	NaAcetat (aus Stammlösung)
	5 %	Glycerin
<u>Z-Puffer</u>	16.1 g/l	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O
	5.50 g/l	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> • H <sub>2</sub> O
	0.75 g/l	KCl
	0.246 g/l	MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O
		pH 7,0 mit NaOH, autoklavieren
<u>X-Gal Stock</u>	20 mg/ml	X-Gal in DMF
<u>X-Gluc Stock</u>	100 mM	X-Gluc in DMF

<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

### 3.6 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	3870 ELV	Tuttnauer
Automatische Pipetten	2, 20, 200,1000	Gilson
Bioimager (Phosphoimager)	BAS-1000	Fuji
Digitalkamera	Coolpix	Nikon
Elektroporationsgerät	Gene Pulser	Bio Rad
Eismaschine	AF-20	Scotman
Gefriertruhe -80 °C	C54285	New Brunswick Scientific
Geldokumentationsanlage	RS1	Kaiser, Deutschland
Gelelektrophoresekammer (Agarose)		Werkstatt der Universität Göttingen
Gelelektrophoresekammer (PAGE)	I V 15-17	GIBCO BRL
Gelelektrophoresekammer (PAGE)	II Joey™ #JGC-4 AGS	GIBCO BRL
Hybridisierungsschrank	Hy-St-1	Bachofer
Hybridisierungswasserbad	Belly Dancer	Sorvall
Heizblock		Boekel Scientific
Heizrührer	RCT basic	IKA Labortechnik
Inkubationsschrank	WTC Binder	Memmert
Kühlschränke		Liebherr
Kühlzentrifuge	Sorvall RC 5B Plus	DuPont
Netzgeräte	E 323	Benedikt Heinemann
Netzgeräte	EC 105	EC Apparatus Corporation
PCR-Gerät, MiniCycler™	PTC-150	MJ Research, USA
pH-Meter	HI 9321	Hanna Instruments



Photometer	Unikon 720 LC	Kontron
Polyacrylamid-Gelkammer		AGS
RNA-/DNA-Calculator	GeneQuant II	Pharmacia
Scanner		Epson
Schüttler	3005	GFL
Semi-Dry-Blot-Apparatur		Werkstatt der Universität Bielefeld
Sequenziergerät	ABI PRISM 310	Perkin-Elmer Corporation
Spektralphotometer für Microtiterplatten	MRX	Dynex
Sterilbank	Microflow	Nunc
Tischzentrifuge	Biofuge pico	Heraeus Christ
Tischzentrifuge, gekühlt	5403	Eppendorf
Ultraschallgerät	Soniprep 150	Scientific Instruments
Ultrazentrifuge	Centrikon T-1065	Kontron
Rotoren f. Ultrazentrifuge	TFT 30.58; TFT 65.13	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

### 3.7 Verbrauchsmittel

Produkt	Hersteller
Alufolie	Roth
Elektroporationsküvetten	BioRad
Fließpapier	Whatman
Glasmaterialien: Flaschen, Pasteurpipetten, Erlenmeyerkolben usw.	Brand, Schott
Glasperlen ( 425-600 µm )	Sigma
Haushaltsfolie	Tip
Hybond <sup>TM</sup> -N / -N <sup>+</sup>	Amersham
Immobilon-P, PVDF-Transfer Membranen	Millipore

Kunststoff-Einwegmaterial: Spitzen, Pipetten, Reaktionsgefäße, Spritzen, Petrischalen usw.	Eppendorf, Brand, Greiner, Sarstedt
Microtiterplatten	Nunc
Miraclloth	Calbiochem
Nylon-Membran Nytran® N+	Schleicher und Schuell
Parafilm N	American National Can™
Polyacrylamid (PAA)-Mix: 30 %	Roth
PVDF-Membran Immobilon-P	Millipore
Röntgenfilme Cronex	DuPont
Rundfilter ø70 mm	Schleicher & Schuell
Sephadex G50	Pharmacia

### 3.8 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller/Lieferant
Agar Bacteriological	GIBCO BRL Life technologies
Agarose SeaKem LE	Biozym
Aminosäuren	Sigma
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Biometra
Ampicillin	Sigma
BASTA	Hoechst
Bovine-Serum-Albumin (BSA)	Serva
Bromphenolblau-Natriumsalz	Roth
Chloroform	Merck
Coomassie Brilliant Blue G-250	Bio-Rad
Complete Supplement Mixture (CSM)	Bio 101
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P] dATP, 800 Ci/mmol	Hartmann Analytic
Difco Pepton	Difco
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
dNTPs	MBI; Roth
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
Leupeptin	Sigma
Lithiumacetat	Sigma
Lyticase	Sigma
Magermilchpulver	Glücksklee
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	AppliChem
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O)	AppliChem
Methylumbelliferyl-β-D-Glucoronid (MUG)	Duchefa
Murashige & Skoog Medium	Duchefa
N,N-Dimethylformamid	J.T. Baker Chemicals B. V.
NaOH	Merck
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumhypochlorid	Roth
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth
Oligonucleotide, synthetisch	MWG, Invitrogen
o-Nitrophenyl β-D-Galactopyranosid (oNPG )	Sigma
Orange G	Sigma
Pepton	Roth
Percoll	Pharmacia
Phenol	AppliChem
Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid (PMSF)	Sigma
Polyethylenglycol (PEG) 4000	Fluka
Ponceau rot	Sigma
Rifampicin	Duchefa

Saccharose	Roth
Salzsäure	Merck
Select Agar	Life Technologies
Select Yeast Extract	Life Technologies
Silwet L77	Lehle Seeds
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamidin)	Roth
Thiamin-HCl	Sigma
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Roth
Triton X-100	Roth
Trypton	Oxoid
Tween	Sigma
X-Gal	BioTech Trade
X-Gluc	Roth
Xylencyanol	Roth
Yeast nitrogen base without amino acids	Difco
$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth

### 3.9 Enzyme

Enzym	Hersteller
Cellulase Onozuka R-10	Serva
Klenow Polymerase	Promega
Macerocym R-10	Serva
Pfu DNA Polymerase	Promega
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas
RNase A (DNase-frei)	Sigma; Qiagen
T4 DNA-Ligase	MBI Fermentas
Taq DNA Polymerase	Verschiedene Hersteller

### 3.10 Antikörper

Antikörper	Hersteller
$\alpha$ -HA IgG, monoklonal	Santa Cruz
$\alpha$ -HA IgG, polyklonal	Santa Cruz
$\alpha$ -rabbit IgG polyklonal, Peroxidase gekoppelt	Amersham

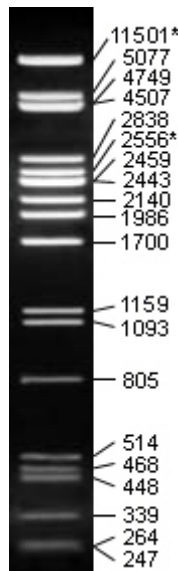
$\alpha$ - mouse IgG polyklonal, Peroxidase gekoppelt	Amersham
---	----------

### 3.11 Kits

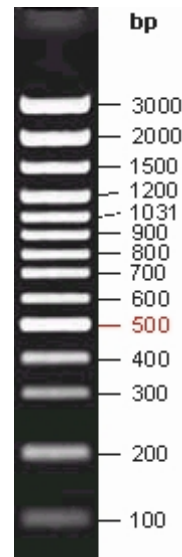
Kit	Hersteller
BigDye™ Terminator Ready Reaction Kit	Perkin-Elmer Corporation
Enhanced Chemiluminescence™ Plus Kit (ECL+)	AmershamPharmacia
Gateway Cloning Kit	Invitrogen
Invisorb® Spin Plant RNA Mini Kit	Invitek
Megaprime™ DNA Labelling Systems	AmershamPharmacia
pGEM®-T Vector Systems	Promega
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen

### 3.12 DNA-Marker

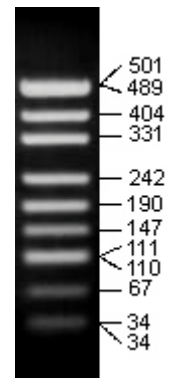
$\lambda$ /*Pst*I  
( $\lambda$ -DNA gespalten mit *Pst*I)  
Größenangaben in bp:



MBI GeneRuler  
100bp DNA ladder plus  
Größenangaben in bp:



pUC19/*Hpa*II  
(pUC19 gespalten mit *Hpa*II)  
Größenangaben in bp:



## 4 Methoden

### 4.1 Anzucht und Transformation von *Arabidopsis thaliana*

#### 4.1.1 Anzucht der Pflanzen

Die Pflanzen werden auf Erde angezogen. Vor der Aussaat wird die Erde zweimal im Abstand von zwei Tagen für 30 Minuten bei 80°C autoklaviert. Die Samen werden zwei Tage im Dunkeln bei 4°C stratifiziert, um eine gleichmäßigere und bessere Keimung zu erreichen.

Die Kultivierung der Pflanzen findet in einer Klimakammer unter Langtag-Bedingungen (16 Stunden Licht, 8 Stunden Dunkel) statt.

#### 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. *Agrobacterium tumefaciens* ist so zu einem hervorragenden Hilfsmittel geworden, um Pflanzen gezielt zu transformieren.

Für die Agrobakterien-vermittelte Transformation von *Arabidopsis thaliana* wurde eine sehr einfache Methode entwickelt (Clough und Bent, 1998). Pflanzen, die gerade begonnen haben zu blühen, werden in Medium mit den entsprechenden Agrobakterien und einem Benetzungsmittel getaucht. Dabei scheinen sich entwickelnde Eizellen das bevorzugte Ziel produktiver Transformationen zu sein (Bent, 2000). Aus diesen Zellen entstehen hemizygote Samen. Für die Transformation werden pro Topf (Ø 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 25ml Vorkultur 400 ml YEB + entsprechende Antibiotika animpfen und bis zu einer OD<sub>600</sub> von ~ 2.0 wachsen lassen
- 2) Die Agrobakterien 10 min. bei 1000xg abzentrifugieren und bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> 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 getrockneten 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 Struktur analogon des L-Glutamat und inhibiert dadurch die Glutaminsynthetase. Die Pflanzen können bei Behandlung mit Basta Glutamat nicht mehr in Glutamin umwandeln. Dadurch häuft sich Ammonium zu einer letalen Konzentration in der Pflanze an und führt zusammen mit dem Glutaminmangel zum raschen Absterben der behandelten Pflanzen. Pflanzen, die als Resistenzmarker das bar-Gen tragen, sind unempfindlich gegenüber Phosphinothricin (White *et al.*, 1990). Nach 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.

#### **4.1.4 Selektion auf Kanamycin- / Hygromycin-Resistenz**

Transgene Samen, die Antibiotika-Resistenzgene als Selektionsmarker enthalten, werden steril auf 2MS-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angezogen. Die dafür notwendige Oberflächensterilisation findet mit Chlorgas statt (Clough und Bent, 1998). Die Samen werden in einem unverschlossenen Eppendorfgefäß in den Exsikkator gestellt. Außerdem werden 100 ml 12 % Hypochlorit-Lösung in einem Becherglas in einen Exsikkator gestellt und 3 ml 37 % HCl zu der Hypochlorit-Lösung gegeben. Dabei werden die Lösungen mit der Glaspipette vorsichtig gemischt. Der Exsikkator wird möglichst schnell geschlossen und etwas Luft wird mit einer Vakuumpumpe abgesaugt, um einen luftdichten Verschluss des Exsikkators sicherzustellen. Nach 8-16 Stunden wird der Exsikkator unter der Sterilbank geöffnet und die Samen vorsichtig herausgenommen. Der Exsikkator wird so schnell wie möglich wieder geschlossen und anschließend unter dem Abzug ausgelüftet. Die Samen werden zusammen mit 1 ml 0,1% Agar auf 2MS-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum gebracht und dort mit einer sterilen Pipette verteilt.

## **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 *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.

#### 4.2.4 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

#### 4.2.5 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 Isolierung von genomischer DNA aus *Arabidopsis*

#### 4.3.1 DNA-Extraktion aus *Arabidopsis thaliana* nach (Fulton *et al.*, 1995)

100 mg Pflanzenmaterial werden in 200 µl Präparationspuffer aufgenommen und mit der Bohrmaschine zerkleinert. Anschließend werden weitere 550 µl Präparationspuffer dazugegeben. Die Suspension wird gut durchmischt und 30-120 Minuten bei 65 °C inkubiert. Danach werden 700 µl Chloroform / Isoamylalkohol (24:1) dazugegeben und die Lösung gut durchmischt. Nach der Zentrifugation bei 10000 rpm für 5 Minuten wird die wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt, und 2 / 3 bis 1 Volumen kaltes Isopropanol werden dazugegeben. Es folgt wieder eine Zentrifugation von 5 Minuten bei 10000 rpm. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 70 % Ethanol



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

### **4.3.2 Schnelle Präparation von genomischer DNA**

Die erhaltene DNA ist sehr unrein und lässt sich nur für PCR einsetzen. 10-100mg Blattmaterial werden in 400 µl Extraktionspuffer mit einer Bohrmaschine aufgeschlossen. Die Suspension wird bei maximaler Geschwindigkeit für 5 Minuten zentrifugiert. 300 µl des Überstandes werden in ein neues Reaktionsgefäß gegeben, in dem 300 µl Isopropanol vorgelegt sind. Die Lösung wird bei maximaler Geschwindigkeit für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und verworfen. Das Pellet wird mit 70 % Ethanol gewaschen. Die Lösung wird bei maximaler Geschwindigkeit für 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wird getrocknet und in 100 µl TE aufgenommen. 1 µl wird für die PCR eingesetzt.

## **4.4 RNA-Extraktion aus *Arabidopsis thaliana***

### **4.4.1 RNA-Extraktion aus *Arabidopsis thaliana* mit dem "Invisorb® Spin Plant RNA Mini Kit"**

RNA Präparationen mit dem "Invisorb Spin Plant RNA Mini Kit" werden nach Angaben des Herstellerprotokolls durchgeführt.

### **4.4.2 RNA Extraktion aus *Arabidopsis thaliana* mit Trizol**

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).

0,5 g Blattmaterial wird in N<sub>2</sub> aufgemörsert und in ein Zentrifugationsgefäß überführt (Sarstedt 13ml 101x16,5mmPP60.540.500). 5 ml Trizolpuffer werden hinzugeben und das Gefäß wird auf dem Vortexer fixiert und 5 Minuten geschüttelt. Dann wird 1ml 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 1,25ml Fällungspuffer und 1,25ml 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 in 70% EtOH resuspendiert, 10 Minuten bei 4°C/10.000g abzentrifugiert, 5 Minuten luftgetrocknet und in 100 µl H<sub>2</sub>O gelöst (Inkubation 2 Stunden bei 4°C).

## **4.5 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.

#### 4.5.1 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 MgCl<sub>2</sub> zugeben
- 3) gründlich vortexen und sofort 15 Minuten bei 10.000xg und RT abzentrifugieren
- 4) Pellet in TE aufnehmen

#### 4.5.2 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 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.

## **4.6 Isolation von Plasmiden aus *E. coli***

### **4.6.1 Alkalische Lyse**

Zur schnellen Präparation von Plasmid-DNA zu analytischen Zwecken wird eine modifizierte alkalische Lyse der Bakterien (Le Gouill *et al.*, 1994) vorgenommen. 1,5 ml einer stationären *E. coli*-Kultur werden pelletiert (3 min, 5000 rpm) und die Zellen nach Dekantieren des Überstandes in 100 µl P1 resuspendiert. Die Lyse der Bakterien erfolgt im alkalischen Milieu durch Zugabe von 200 µl P2 und 150 µl Chloroform. Nach 1 Minuten Inkubation wird zur Neutralisation 150 µl P3 zugegeben, der Ansatz gemischt und die Präzipitate durch Zentrifugation (2 min, 15000 rpm, 4 °C) sedimentiert. Die obere, wässrige Phase wird zur Fällung der DNA mit 2,5 Volumen Ethanol (-20 °C) gemischt und 2 min, 15000 rpm, 4 °C zentrifugiert. Die pelletierte DNA wird mit 70 % Ethanol gewaschen und für 10 Minuten bei 37 °C getrocknet. Die gewonnene DNA wird in 20 µl EB oder H<sub>2</sub>O gelöst und kann zur Restriktionsanalyse eingesetzt werden.

### **4.6.2 Plasmidpräparation für Sequenzierung**

Für Sequenzierreaktionen wird hochreine DNA mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep-Kits isoliert. Das Prinzip entspricht der alkalischen Lyse, die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

### **4.6.3 Schnellyse von *E.coli* Zellen für eine anschließende PCR**

Die einzelnen Kolonien werden in 20 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und für 5 Minuten bei 95°C erhitzt und anschließend für eine PCR eingesetzt.

### **4.6.4 DNA-Elution aus Agarosegelen**

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

## **4.7 Phenol-Chloroform Extraktion**

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

## 4.8 Ethanolfällung von DNA aus wässrigen Lösungen

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

## 4.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA oder RNA wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm mit dem Spektrometer GeneQuant II ermittelt. Ein Aliquot der Probe wird mit TE-Puffer 1:100 verdünnt und gegen TE-Puffer gemessen. Eine OD<sub>260</sub> von 1,0 entspricht einer Nukleinsäurekonzentration von 50 µg / ml dsDNA bzw. 40 µg / ml RNA oder ssDNA. Kontaminationen mit Proteinen werden über die Absorption bei  $\lambda = 280$  nm erfasst. Salzurückstände werden durch positive Werte bei  $\lambda = 320$  nm angezeigt. Der Quotient OD<sub>260</sub>:OD<sub>280</sub> gibt zusätzlich Aufschluß über Verunreinigungen. Idealerweise liegt dieser Wert zwischen 1,8 für DNA und 2,0 für RNA. Alternativ kann die DNA-Konzentration nach Auftrennung in einem Agarosegel und Anfärbung mit Ethidiumbromid im Vergleich mit DNA bekannter Konzentration abgeschätzt werden.

## 4.10 Restriktionsspaltung von DNA

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

Die Kontrolle der Spaltung erfolgt durch Agarosegelelektrophorese mit einem Aliquot des Ansatzes. Restriktionsspaltungen können zur Klonanalyse eingesetzt werden. Außerdem sind sie die Grundlage der Klonierungen (Cohen *et al.*, 1973).

## 4.11 Ligation

Das Enzym T4-DNA-Ligase katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-OH-Gruppe am Ende eines DNA-Stranges und der 5'-Phosphatgruppe am Ende eines anderen. Bei Anwesenheit von ATP erfolgt zunächst eine Aktivierung

des Enzyms durch eine Adenylierung unter Abspaltung von Pyrophosphat gefolgt von einer Übertragung der AMP-Einheit auf das 5'-Ende des einen Stranges, wodurch eine Aktivierung des 5'-Phosphoratoms erfolgt. So kann ein nucleophiler Angriff der 3'-OH-Gruppe auf dieses aktivierte Phosphoratom erfolgen, wobei der Strang geschlossen und AMP freigesetzt wird. Die Ligation wird in T4-DNA-Ligasepuffer mit 2 u T4-DNA-Ligase über Nacht bei 15°C in einem Gesamtvolumen von 20-30 µl durchgeführt.

#### 4.12 TA-Klonierung

Die *Taq*-Polymerase produziert keine Fragmente mit glatten Enden, sondern schafft einen Überhang von einer Base, wobei es sich in den meisten Fällen um ein Adenosin handelt (Clark, 1988). Daher lassen sich *Taq*-amplifizierte PCR-Produkte gut in Vektoren mit Thymin-Überhang klonieren. Ein solcher Vektor ist pGEM<sup>®</sup>-T von Promega.

- 1) 5 µl 2x rapid ligation buffer in ein 1,5ml Eppendorfgefäß geben
- 2) 1 µl (50 ng) pGEM<sup>®</sup>-T Vektor zugeben
- 3) PCR-Produkt zugeben (das Verhältnis Insert:Vektor sollte etwa 5:1 betragen)
- 4) Mit H<sub>2</sub>O auf 9 µl auffüllen
- 5) 1 µl T4 DNA Ligase (4 Weiss units/µl) zugeben
- 6) 2 Stunden bei RT inkubieren (für maximale Effizienz ü. N. bei 4°C)

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

#### 4.13 Blau-Weiß-Selektion

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

Die Platten, auf denen eine Blau-Weiß-Selektion durchgeführt wird, werden mit 60 µl X-Gal-Lösung (20 mg / ml) und 60 µl 0,1 M IPTG-Lösung beschichtet, Animpfen und Inkubation finden wie gewohnt statt.

#### 4.14 Agarosegelelektrophorese von DNA-Molekülen

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese werden DNA-Moleküle nach ihrer Größe aufgetrennt (McDonnell *et al.*, 1977; Southern, 1979). DNA ist aufgrund des Zucker-Phosphat-Rückgrats negativ geladen. Im elektrischen Feld wandert sie somit zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist um so größer, je kleiner die DNA-Moleküle sind. Als Gelmatrix dient Agarose, ein gelierfähiges Polysaccharid, welches aus sich abwechselnden Einheiten von β-1,3-verknüpfter D-Galaktopyranose und α-1,4-verknüpfter 3,6-Anhydro-L-Galaktopyranose besteht. Der Trennbereich ist abhängig

von der Agarosekonzentration, da sie die Porengröße beeinflusst. Je höher die Agarosekonzentration, desto kleiner die Poren, desto besser werden kleine Moleküle aufgetrennt. Die Zugabe von Hydroxyethylcellulose (HEC) kann hohe Agarosekonzentrationen ersetzen. Zur Auftrennung großer Fragmente wird ein 0,7 prozentiges Gel benutzt. Kleine Fragmente, wie PCR-Produkte, werden in Gelen aufgetrennt, die 1 % Agarose und 0,7 % HEC enthalten.

Ethidiumbromid (3,8-Diamino-6-ethyl-5-phenylphenantridiumbromid) dient zum Anfärben der DNA. Es bindet an die DNA, indem es zwischen die Basenpaare interkaliert. Der Komplex aus DNA und Ethidiumbromid fluoresziert unter UV-Licht und wird damit auf dem Transilluminator sichtbar.

### 4.15 DNA Sequenzierung

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

Cycle Sequencing und Aufreinigung der DNA erfolgen mit dem ABI PRISM™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit. Die eingesetzte DNA wird mit dem Qiaprep Spin Miniprep-Kit isoliert.

In ein PCR-Gefäß werden pipettiert:

- 2 µl ET-Mix
- etwa 800 ng DNA
- 5 pmol Primer
- H<sub>2</sub>O ad 10 µl

Im Thermocycler wird folgendes Programm benutzt:

1. 96 °C	15 Sekunden	
2. 55 °C	20 Sekunden	
3. 60 °C	60 Sekunden	25 Zyklen 1-3

#### 4.15.1 Aufreinigung der Sequenzierreaktion

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

- 1) 1 µl Ammoniumacetat (7 M) in 1,5 ml Eppendorfgefäße geben
- 2) Reaktionsansatz zugeben
- 3) 41 µl 95 % Ethanol zugeben
- 4) vortexen
- 5) Inkubation: 1 Stunde auf Eis
- 6) Zentrifugation: 15 Minuten / 13.000 rpm / RT
- 7) Überstand vollständig abnehmen
- 8) Pellet mit 100 µl 70 %igem Ethanol waschen
- 9) Zentrifugation: 15 Minuten / 13000 rpm / RT
- 10) Überstand sauber abnehmen
- 11) Pellet 1 Minuten bei 95 °C trocknen
- 12) Pellet in 20 µl Template Suppression Reagent aufnehmen
- 13) denaturieren der DNA: 2 Minuten / 95 °C, danach sofort auf Eis überführen
- 14) luftblasenfrei in spezielle Sequenziergefäße des Sequenziergerätes umfüllen

#### 4.16 Polymerase-Kettenreaktion

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

Beispiel für einen Reaktionsansatz:

- 2,5 µl 10 x PCR-Puffer + MgCl<sub>2</sub> (MBI)
- 0,5 µl dNTPs (je 10 mM)
- 1,25 µl Primer 1 (10 µM)
- 1,25 µl Primer 2 (10 µM)
- DNA-Template
- H<sub>2</sub>O ad 49,5 µl
- 0,5 µl *Taq* DNA-Polymerase

Das verwendete PCR-Programm hängt von den Primern und dem verwendeten Template ab und muss für jede PCR individuell erstellt werden.

#### 4.17 Colony-Screen mittels PCR

Wird die Plasmid-DNA benötigt, um Klone in einer PCR zu testen, kann eine Schnelllyse mittels Kochen durchgeführt werden.

- 1) 11  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  in ein PCR-Cup geben
- 2) Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher picken
- 3) auf eine Masterplatte überimpfen
- 4) den restlichen Teil der am Zahnstocher befindlichen Zellen in den 11  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  resuspendieren
- 5) 10 Minuten /  $95^\circ\text{C}$  (Zellen lysieren, DNasen denaturieren)
- 6) auf Eis lagern
- 7) entsprechenden Mastermix zugeben

#### 4.18 Transformation von Mikroorganismen

##### 4.18.1 Herstellung kompetenter *Escherichia coli*

Für die Herstellung kompetenter Zellen nach einer modifizierten Methode von (Inoue *et al.*, 1990) werden Bakterien des *E. coli*-Stammes DH5 $\alpha$  verwendet. 0,8 ml einer Übernachtskultur werden in 40 ml LB-Medium überimpft. Die Anzucht der Kultur erfolgte bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5. Jeweils 10 ml der Kultur werden in Greiner-Röhrchen überführt und abzentrifugiert (5 Minuten, 6000 x g,  $4^\circ\text{C}$ ). Das Pellet wird in 5ml 50mM  $\text{CaCl}_2$  ( $4^\circ\text{C}$ ) resuspendiert, für 30 Minuten auf Eis inkubiert und abzentrifugiert (5 min, 6000 x g,  $4^\circ\text{C}$ ). Die Zellen werden in 2ml 50mM  $\text{CaCl}_2$  ( $4^\circ\text{C}$ ) und 0,4 ml 87% Glycerin aufgenommen und nach aliquotieren (je 200 $\mu\text{l}$ ) in Eppendorfgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aufbewahrung erfolgt bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^\circ\text{C}$ .

##### 4.18.2 Transformation von *Escherichia coli*

Kompetente *E. coli*-Zellen sind in der Lage, DNA aus dem Umgebungsmedium aufzunehmen. Mit Hilfe der nachfolgenden Methode werden *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA transformiert (Hanahan, 1983). Die kompetenten Zellen werden auf Eis aufgetaut, dann erfolgt die Zugabe der Plasmid-DNA und Inkubation für 10 Minuten auf Eis (Anheftung der DNA an die Zellen). Durch einen Hitzeschock der Zellen für 2 Minuten bei  $42^\circ\text{C}$  erfolgt die Aufnahme der DNA. Eine Regeneration der Zellen schließt sich nach Zugabe von 0,8 ml LB-Medium für 40 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  an. Danach wird der Transformationsansatz auf LB-Selektionsmedium ausplattiert.

##### 4.18.3 Herstellung kompetenter Agrobakterien

Für die Herstellung kompetenter Zellen werden Agrobakterien des Stammes LBA 4404 verwendet. 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 N<sub>2</sub> eingefroren.

#### 4.18.4 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.

#### 4.18.5 Herstellung kompetenter Hefezellen

Die Kompetenz von Hefezellen zur DNA-Aufnahme läßt sich durch das Alkalimetallion Li<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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 OD<sub>600</sub> von etwa 1,5
- 3) ü.N.-Kultur in 300 ml YPD überimpfen, die OD<sub>600</sub> sollte etwa 0,2 betragen
- 4) Hefen bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,6 anziehen
- 5) Zentrifugation: 5 Minuten / 1000 x g / RT
- 6) Überstand verwerfen
- 7) Pellet in 40 ml H<sub>2</sub>O resuspendieren
- 8) Zentrifugation: 5 Minuten / 1000 x g / RT
- 9) 1 x TE / LiAc-Lösung aus den 10 x Stocklösungen frisch ansetzen
- 10) Überstand verwerfen
- 11) Pellet in 1,5 ml 1 x TE / LiAc-Lösung resuspendieren
- 12) Inkubation: mindestens 5 Minuten / RT

#### 4.18.6 Transformation der kompetenten Hefezellen

- 1) PEG-LiAc-Lösung aus den Stocklösungen frisch ansetzen
- 2) Heringssperma-DNA (HSP) für 20 Minuten abkochen, dann auf Eis
- 3) jeweils ca. 0,25 µg der jeweiligen Plasmid DNA, 100 µg HSP sowie 100 µl kompetenter Zellen mischen
- 4) 400µl PEG-LiAc-Lösung zufügen
- 5) vortexen

- 6) Inkubation: 30 Minuten / 30 °C, unter Schütteln (200 rpm)
- 7) DMSO zufügen (Endkonzentration 10 %)
- 8) Hitzeschock bei 42 °C für 15 min
- 9) kurz auf Eis abkühlen lassen
- 10) 1 x TE-Puffer aus dem 10 x Stock herstellen
- 11) Zentrifugation der Zellen: 5 s / 13000 rpm / RT
- 12) Zellen in 500 µl TE-Puffer resuspendieren
- 13) 100 µl davon auf dem entsprechenden SD-Medium ausplattieren

## 4.19 Transformation von *Arabidopsis thaliana*-Protoplasten

### 4.19.1 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 100g für 1min (RT) zentrifugiert. Das Protoplastenpellet wird vorsichtig durch leichtes Schwenken in 2ml kalte W5- Lösung resuspendiert und für 6- 15h auf Eis inkubieren (max. 24h).

### 4.19.2 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 100g für 1min (RT) wird das Pellet in 1-2 ml MMg- Lösung je  $10^5$  Zellen vorsichtig durch Schwenken resuspendieren.

In 2ml Eppendorfgefäße mit rundem Boden werden 20µl DNA (20- 40µg) vorgelegt und 200µl Protoplasten vorsichtig mit einer abgeschnittenen blauen Spitze hinzugefügt. Nach vorsichtigem mischen werden 220µl PEG- Lösung hinzugefügt und erneut vorsichtig gemischt. Dann folgte eine Inkubation für 30 Minuten bei RT. Es werden 800µl W5- Lösung hinzugefügt und nach vorsichtigem mischen folgt eine Zentrifugation bei 100g für 1min (RT). Mit einer blauen Spitze werden vorsichtig ca. 800µl vom Überstand abgenommen. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 100g für 1min (RT) werden mit einer gelben Spitze vorsichtig ca. 300µl vom Überstand abgenommen. Der restliche Überstand wird nach einer weiteren Zentrifugation bei 100g für 1min (RT) mit einer Insulin-Spritze abgenommen. 500µl WI- Lösung werden vorsichtig hinzugefügt und dabei wird das Protoplastenpellet resuspendiert. Nach Inkubation für 8-16h bei RT werden 450µl des Überstandes mit einer gelben Spitze entfernt. Nach Zentrifugation bei 100g für 1min (RT) wird der restliche Überstand mit einer Insulinspritze vorsichtig entfernt.

### 4.19.3 Messung der $\beta$ -Glucuronidase (GUS)- Aktivität

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

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

Die transformierten Protoplasten werden in 150 $\mu$ l GUS-Extraktionspuffer mit  $\beta$ -Mercaptoethanol aufgenommen und 100 $\mu$ l der Proteinsuspension in ein Well einer Mikrotiterplatte überführt. 100 $\mu$ l MUG-Gebrauchslösung werden zugeben. Nach mischen wird 10min bei 37°C inkubiert. 100 $\mu$ l des Reaktionsansatzes in ein neues Well überführen und die Reaktion durch Zugabe von 100 $\mu$ l GUS-Stop-Puffer abgestopt ( $t_0$ ). Weitere 100 $\mu$ l des Reaktionsansatzes werden für 60min 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.

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

$\Delta F$  = Differenz der Fluoreszenz  $t_{60} - t_0$

10 Fluoreszenzeinheiten entsprechen 1pmol MUG-Umsatz.

$t = 60\text{min}$

mg = eingesetzte Gesamtproteinmenge in mg

## 4.20 GUS-Färbung

Promotoren werden oft durch transkriptionale Fusionen mit Reportergenen untersucht. Eines der Weitverbreitesten Reportergene ist das *uidA*-Gen aus *E.coli*, welches das GUS-Enzym kodiert (Jefferson *et al.*, 1987). Die GUS-Aktivität kann durch Färbung mit dem chromogenen Substrat X-Gluc nachgewiesen werden. Dieses Substrat kann in das Pflanzengewebe hinein diffundieren, das aktive Enzym spaltet den Glucuronsäure-Rest ab, und nach Oxidation durch das im Färbepuffer enthaltene  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 / \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  entsteht ein blauer Indolfarbstoff, der ausfällt. Höhere  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 / \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ -Konzentrationen führen zu einem schnelleren Ausfallen des Indol-Farbstoffes und damit zu präziser abgegrenzten Färbungen, hemmen aber die Enzymaktivität, sodass die Intensität der Färbung abnimmt.

- 1) Gewebe-Proben (z.B. Blätter, Blüten) sammeln und sofort in 1,5 ml Eppendorfgefäße mit eiskaltem 90 % Aceton geben. Auf Eis lagern bis alle Proben gesammelt sind.
- 2) 20 Minuten bei RT inkubieren. In der Zwischenzeit die benötigten Lösungen frisch ansetzen und auf Eis lagern
- 3) Aceton von den Proben entfernen, mit GUS-Färbepuffer waschen (auf Eis)
- 4) Färbelösung durch Zugabe von 2mM (Endkonzentration) X-Gluc in GUS-Färbepuffer ansetzen
- 5) GUS-Färbepuffer von den Proben entfernen, Färbelösung zugeben
- 6) Proben 15-20 Minuten im Vakuum mit der Färbelösung infiltrieren. Vakuum langsam ablassen.
- 7) Übernacht bei 37°C inkubieren (kann bis zu 2 Tagen verlängert werden)
- 8) Färbelösung entfernen, der Reihe nach je 30 Minuten mit 20% , 35% und 50% Ethanol bei RT waschen
- 9) Mindestens 30 Minuten in FAA fixieren

- 10) FAA entfernen, 70% Ethanol zugeben. Bei 4 °C können die Proben länger gelagert werden

## 4.21 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.

### 4.21.1 Denaturierende Agarosegelelektrophorese von RNA-Molekülen

Um die elektrophoretische Grössenauftrennung 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 8 µg der RNA-Proben werden auf das gleiche Volumen abgeglichen und mit 2,5 x Probenpuffer (2,5 x MEN, 5,55 % (v / v) Formaldehyd, 48 % deionisiertes Formamid, 10,44 % (v / v) Glycerin, 0,5 % EtBr, 0,001 % (v / v) BPBLösung) 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 UV-Transilluminator mit Hilfe der Geldokumentationsanlage.

### 4.21.2 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.

### 4.21.3 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.

#### **4.21.4 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, 1mM 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 2 x SSC (20x SSC: 2 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat) / 0,1% SDS und einmal mit 1x SSC / 0,1% SDS und optional mit 0,5x SSC / 0,1% SDS für 15 – 30 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.

#### **4.21.5 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 kochendheißer 0,1%iger SDS-Lösung für 1 Stunde bei 65 °C gewaschen. Danach war der Filter für eine erneute Hybridisierung einsetzbar.

#### **4.22 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 Glaträger erstellt. Die für die Hybridisierung dieser Microarrays verwendete RNA werden zunächst mit Ambions 'Amino Allyl

MessageAmp™ II aRNA Amplification Kit' zu aRNA amplifiziert und dabei indirekt Fluoreszenzmarkiert.

#### 4.22.1 Amplifikation der eingesetzten RNA

Die Amplifikation der RNA wird mit dem Kit der Firma Ambion im wesentlichen nach Herstellerangaben, jedoch mit kleineren Ansätzen durchgeführt. 2,75µl RNA (454 ng/µl) wird mit 0,25µl 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 (0,5µl 10x First strand buffer / 1µl dNTP Mix / 0,25µl RNase Inhibitor / 0,25 µl Arrayscrip Polymerase pro Ansatz) angesetzt, davon jeweils 2µl zu den RNA-Proben gegeben, durch Pipettieren gemischt und 2h bei 42°C inkubiert.

Für die Zweitstrang Synthese wird ein Mastermix (15,75µl RNase-freies Wasser / 2,5µl 10x Second strand buffer / 1µl dNTP mix / 0,5 µl DNA Polymerase / 0,25µl RNase H pro Ansatz) angesetzt, davon jeweils 20µl zu den Proben geben, durch Pipettieren gemischt und 2h bei 16°C inkubiert. Die Proben werden mit 75µl 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 10µl auf 55°C vorgewärmtem Wasser statt, und die eluierte cDNA wird in der Vakuumzentrifuge auf ein Volumen von 3,75µl eingeengt.

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

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

#### 4.22.2 Indirekte Markierung der aRNA

Während der folgenden Arbeitsschritte werden die Proben vor Licht geschützt um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu verhindern. Für die indirekte Markierung werden je 7,5µg der Aminoallyl-aRNA auf ein Volumen von 14µl gebracht und mit 2µl 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH9) und 4µl Cy5 bzw. Cy3 für 1 Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Kopplungsreaktion wird dann durch Zugabe von 35µl 100mM Natriumacetat (pH5,2) gestoppt. Die Proben werden mit 45µl 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 50µl auf 60°C vorgewärmtem 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 hybridisierte Proben beide gleichviel picomol Fluoreszenzfarbstoff enthielten. Die für einen Array verwendeten Volumen Cy3 und Cy5 markierter aRNA werden vereinigt, 1µl polyA (20µg/µl) und 1µl tRNA (20µg/µl) zugegeben, und das ganze wird in einer Vakuumzentrifuge zur Trockne eingeengt.

### 4.22.3 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 Glaträgers gebunden. Danach werden die Arrays 4 Minuten mit 0,1% SDS, dreimal 2 Minuten mit H<sub>2</sub>O (demin) und dann 30 Sekunden in 100% Ethanol gewaschen und anschließend durch Abzentrifugieren oder Abpusten getrocknet.

Die Vorhybridisierungslösung besteht aus 300µl 20x SSC, 575µl H<sub>2</sub>O, 100µl 10% BSA und 25µl 20% SDS. Zur Vorhybridisierung werden 80µl 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 1h bei 42°C inkubiert.

In der Zwischenzeit werden die getrocknete aRNA in 9µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und 1µl 10x fragmentation buffer wird zugegeben. Dann wird 15min bei 70°C inkubiert und 1µl fragmentation stop zugegeben. Zu jeder Probe werden 56,4µl einer Hybridisierungslösung (350µl Formamid, 210µl 20x SSC, 70µl 50X Denhardts, 17,5µl 20% SDS und 52,5µl H<sub>2</sub>O) gegeben, das ganze gevortext, 5 Minuten auf 95°C erhitzt und 5 Minuten bei 10.000g abzentrifugiert.

Die vorhybridisierten Glaträger werden mit H<sub>2</sub>O gewaschen, und die in der Hybridisierungslösung aufgenommene aRNA wird zwischen den Glaträger und einen darauf platzierten Liftslip laufengelassen. Der Glaträger mit Probe wird in wasserdichte Hybridisierungsgefäße eingeschlossen und anschließend über Nacht bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wird der Glaträger 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.

Anschließend werden die Fluoreszenzsignale mit einem GenePix 4000B Microarray Scanner eingelesen.

### 4.22.4 Auswertung der ARIZONA whole genome arrays

Die Auswertung erfolgt mit der GenePix Pro 4.0 Software von Axon Instruments. Die richtige Platzierung der Felder für das Auslesen der Signalstärken der einzelnen Spots wird von Hand überprüft und gegebenenfalls korrigiert. Nach dem Auslesen der Fluoreszenzsignale werden die mit den 3 biologischen Replikaten erhaltenen Datensätze mit der Software S.O.L.A.R. integriert.

## 4.23 Herstellung von Chloroform / Methanolextrakten zur Bestimmung des Zuckergehaltes

300 mg Pflanzenmaterial werden unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver aufgemörsert. Das Pulver wird in ein 12 ml Greinerröhrchen mit 5 ml Chloroform/Methanol (1,5 : 3,5) gegeben. Nach gründlichem Schütteln erfolgte für 30 Minuten eine Inkubation auf Eis. Danach werden 4 ml steriles Millipore-Wasser zugegeben, 2 Minuten geschüttelt und 5 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase wird mit einer Transferpipette in einen auf Eis gekühlten Rotationskolben gegeben. Die organische Phase wird nochmals mit 3 ml sterilem

Millipore-Wasser ausgeschüttelt, wieder zentrifugiert und die abgetrennte wässrige Phase wieder in den Rotationskolben überführt. Die Probe wird am Rotationsverdampfer bei 34°C im Wasserbad bis zur Trocknung eingengt. Die getrockneten Proben werden mit 1 ml HPLC Wasser gelöst, über eine Nitrocellulosemembran gefiltert und in einem Eppendorfgefäß aufgefangen. Nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff erfolgt die Lagerung bei -80°C. Die Messung erfolgte durch G. Lohaus (Universität Göttingen).

#### 4.24 Nachweis der $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in Hefen mit einem oNPG-Test

Der oNPG-Test erlaubt eine quantitative Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität. Die  $\beta$ -Galaktosidase ist ein hydrolytisches Enzym, welches das Disaccharid Lactose in Glucose und Galaktose spaltet. Die  $\beta$ -Galactosidase kann auch chromogene Substratanaloga wie X-Gal oder oNPG umsetzen und ist somit ein geeignetes Reporterenzym. Der oNPG-Test erlaubt eine qualitative und quantitative Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität. Er beruht auf der Hydrolyse des Substrates oNPG unter Freisetzung des Farbstoffes o-Nitrophenol, der eine gelbe Färbung aufweist. Die Anzucht der Hefe erfolgt über Nacht in 3ml SD Medium bei 30°C. Am nächsten Morgen wird die OD600 bestimmt. 2ml der Kultur werden pelletiert und in 665 $\mu$ l H-Puffer (100mM HEPES / KOH, pH 7,0; 150mM NaCl; 2mM MgCl<sub>2</sub>, 1 % BSA) resuspendiert. Eine Nullkontrolle wird parallel behandelt. Durch Zugabe von 55 $\mu$ l Chloroform und 55  $\mu$ l SDS und nach einer Minute vortexen sind die Zellen lysiert. Dann wird als Substrat 125 $\mu$ l oNPG-Lösung (4mg/ml oNPG gelöst in H-Puffer) zugegeben. Die Reaktion läuft für 30 Minuten bei 37°C ab. Zum Abstoppen der Reaktion werden 400 $\mu$ l Natriumcarbonatlösung (1 M) zugegeben. Die genaue Reaktionszeit wird notiert. Die festen Bestandteile werden durch Zentrifugation für 5 Minuten in der Tischzentrifuge pelletiert. Der klare Überstand wird abgenommen und die OD420 wird bestimmt. Dieses Protokoll (Strathmann, persönliche Mitteilung) ist eine Modifikation des Originalprotokolls nach (Miller *et al.*, 1999).

Die Berechnung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität erfolgt nach folgender Formel:

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

V = Für die Messung eingesetztes Volumen der Kultur (0,5 ml)

t = Reaktionszeit in Minuten

#### 4.25 Chromatin-Immunopräzipitation

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

##### 4.25.1 Chromatinpräparation

Zur Kreuzvernetzung der DNA-Proteinkomplexe (Solomon *et al.*, 1988; Solomon und Varshavsky, 1985) werden je 10g Blattmaterial in Einmachgläser überführt und mit



Crosslinkingpuffer (50mM Kaliumphosphatpuffer, 1% Formaldehyd) überschichtet. Dann wird ein Vakuum angelegt, bis die Blätter mit dem Crosslinkingpuffer vollgesogen sind. Für 30 Minuten wird bei Raumtemperatur inkubiert, dann werden die Blätter nacheinander in eiskalter 0,3M Glycinlösung und dann dreimal in 1x TBS gewaschen. Die Blätter werden dann trockengetupft und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Von jetzt an alle Schritte auf Eis durchführen.

Das Blattmaterial wird in Stickstoff aufgemörsert und in 20ml Extraktionspuffer aufgenommen. Dort wird es mit einem Homogenisator (Micra) auf Stufe B für etwa 4 Minuten weiter homogenisiert. Anschließend wird durch 2 Lagen Miracloth filtriert, das Volumen mit Extraktionspuffer auf 24ml gebracht, und unter langsamen Rühren langsam 1ml 25% Triton zugetropft. Anschließend wird 15 Minuten weiter gerührt. Ein Percoll-Gradient aus 6ml 75% Percoll / 6ml 35% Percoll wird mit den 24ml Kernen überschichtet und bei 2000xg (3500rpm), soft start&stop, 30min abzentrifugiert. Extraktionspuffer und 35% Percoll werden abgenommen, die Zwischenphase in ein neues Greiner überführt und mit 20ml Gradientenpuffer verdünnt. Dieses wird auf ein neues 6ml 35% Percollkissen gegeben und bei 2000g (3500rpm), soft stop, 10 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und die Kerne werden in 1ml TE mit 0,25% SDS aufgenommen.

Die Ultraschallbehandlung zur Fragmentierung des Chromatins findet für 4 x 12 Sekunden auf Eis statt. Anschließend wird 15 Minuten bei 13.000rpm und 4°C abzentrifugiert, und das Pellet in 500µl sonication buffer aufgenommen. 2 Aliquots von 200µl werden bei -80°C weggefroren, der Rest wird genommen um die DNA-Konzentration zu bestimmen. Dazu wird die Quervernetzung durch Übernacht-Inkubation bei 65°C rückgängig gemacht, anschließend wird die Probe RNase und ProteinaseK (je 1 µl) verdaut. Anschließend wird die DNA PCI-Aufgereinigt und unter Zugabe von 1µl Glycogen (10mg/µl) 4h bei -80°C gefällt. Die gefällte DNA wird in 25µl H<sub>2</sub>O aufgenommen, die Ausbeute sollte 30-200ng/µl sein.

#### **4.25.2 Immunopräzipitation**

Die Chromatin-Proteinkomplexe werden nun für die Immunopräzipitation eingesetzt. Die aufgetauten Proben werden 10 Minuten bei 13.000rpm abzentrifugiert und mithilfe der zuvor bestimmten DNA-Konzentrationen auf die gleiche Konzentration eingestellt. 200µl Chromatin werden mit 300µl RPAF ohne SDS und 30µl gewaschenen Protein A beads 1 Stunde bei 4°C im Intellimixer inkubiert. Die Protein A beads werden abzentrifugiert und der Überstand mit 8µl HA-Antikörper mindestens 4h (oder ü.N.) bei 4°C inkubiert. Dann werden 30µl gewaschene Protein A beads zugeben, 1h bei 4°C im Intellimixer inkubiert, und anschließend werden die beads abzentrifugiert und 4 mal mit RPAF gewaschen. Die Elution erfolgt mit 200µl Glycin elution buffer, anschließend werden 50µl 1M Tris-HCl pH 9,7 zum Neutralisieren zugegeben. Der Erfolg der IP wird im Western mit je 40µl Überstand und Eluat überprüft. Nachdem die DNA mit einer Phenol-Chloroformfällung aufgereinigt wird, kann sie in einer PCR getestet werden.

#### **4.26 Herstellung denaturierender Gesamtzellextrakte aus Pflanzen**

Das Blattgewebe wird unter flüssigem Stickstoff aufgemörsert, 50 - 200 mg des Pulvers im gefrorenen Zustand in ein Eppendorfgefäß eingewogen, in der doppelten Menge

(w/v) Harnstoffextraktionspuffer (4 M Harnstoff, 16,6% (v/v) Glycerin, 5% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol, 5% (w/v) SDS, 0,5% (w/v) Bromphenolblau) aufgenommen, gevortext und bei 65°C für 10 Minuten inkubiert. Nach 5 Minuten Inkubation werden die Eppendorfgefäße mehrmals invertiert. Anschließend wird der Rohextrakt 15 Minuten bei 15000 rpm und RT zentrifugiert um Zelltrümmer und DNA abzutrennen. 2/3 Volumen des Überstandes werden in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Proteinextrakte werden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Vor Auftragung in der SDS-PAGE werden sie 5 Minuten bei 65°C inkubiert. Die Proben können direkt auf das Gel appliziert werden.

## 4.27 Western Blot Analyse

### 4.27.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE, (Laemmli, 1970)) dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekularmasse. Die Polyacrylamidmatrix wird durch Polymerisation von Acrylamid mit dem Quervernetzer N,N'-Methylenbisacrylamid (BIS) hergestellt. Die Porengröße im Gel kann durch die Wahl der Acrylamidkonzentration sowie des Verhältnisses Acrylamid/BIS verändert werden. Die Polymerisation wird durch Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) durch Erzeugung freier Radikale gestartet. Als Katalysator wird N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) zugefügt. In dieser Arbeit werden SDS-Gele verwendet, die sich aus einem Trenngel aus 10% (w/v) Acrylamid/Bis (19:1), 0,4 M Tris/HCl pH 8,8, 0,1% (w/v) SDS, 0,1% (v/v) TEMED, 0,1% (w/v) APS sowie einem Sammelgel aus % (w/v) Acrylamid/BIS (19:1), 125 mM Tris/HCl pH 6,8, 0,1% (w/v) SDS, 0,2% (v/v) TEMED, 0,1 % (w/v) APS zusammensetzen. Nach Beladen der Taschen des Gels mit je 10  $\mu$ l Proteinextrakt aus denaturierten Harnstoffextrakten erfolgte der Gellauf bei 20 mA für 2 Stunden. Als Laufpuffer diente 25mM Tris, 190mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS.

### 4.27.2 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 (25% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Essigsäure) geschwenkt. Nach Verfärbung des Bromphenolblau ins Gelbliche wird das Gel in der Färbelösung (0,006% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 10% (v/v) Essigsäure) 30 bis 60 Minuten inkubiert. Die Entfärbung des Gels erfolgt in dem Entfärbebad (10% (v/v) Essigsäure) unter wiederholtem Wechsel der Lösung für mehrere Stunden. Optional kann der Vorgang durch kurzes Erwärmen in der Mikrowelle beschleunigt werden.

### 4.27.3 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 (192mM Glycin, 25 mM Tris, 20% (v/v) Methanol, 0,01% (w/v) SDS) 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/cm<sup>2</sup> 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.

#### 4.27.4 Immunodetektion mit dem ECL+ System

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

#### 4.28 Verwendete Computerprogramme

VectorNTI Suite V 6.0 (InforMax, 2000)

BLAST (Altschul *et al.*, 1997; Madden *et al.*, 1996)

PCBAS 2.09 und TINA 2.0 (Raytest)

POBO (Kankainen und Holm, 2004)

Genevestigator (Zimmermann *et al.*, 2004)

Coils, Version 2.2 (Lupas, 1996)

Biopro spektor (Liu *et al.*, 2001)

## 4.29 Mathematische Formeln

Formel zur Berechnung des Mittelwertes:

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

Formel zur Berechnung der Standardabweichung:

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

## 5 Ergebnisse:

### 5.1 AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppe C bilden spezifische Heterodimere mit AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppe S1

Protein-Protein Interaktionen zwischen bZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppe C und bZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppe S1 sind bereits für die Spezies Tabak und Petersilie gezeigt worden (Rugner *et al.*, 2001; Strathmann *et al.*, 2001). Solche Interaktionen auch für bZIP-Transkriptionsfaktoren aus *Arabidopsis* zu zeigen, und zu quantifizieren, war das erste Ziel dieser Arbeit. In *Arabidopsis* sind zudem alle Mitglieder dieser beiden Gruppen bekannt (Jakoby *et al.*, 2002), sodass es möglich ist, eine Interaktionsmatrix auf genomischer Basis zu erstellen.

Die Fähigkeit der AtbZIP-Transkriptionsfaktoren zur Homodimerisierung oder Heterodimerisierung mit anderen AtbZIP-Transkriptionsfaktoren, sowie ihre Aktivierungseigenschaften, wurden mit dem ProQuest-System in "Yeast One-Hybrid" bzw. "Yeast Two-Hybrid" Tests untersucht (INVITROGEN, 2001).

Das "Yeast Two-Hybrid" System ist ein klassisches System zur Analyse von *in vivo* Protein-Protein Interaktionen. 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 DNA-Bindedomäne interagiert mit der *GAL4-UAS* (upstream activating sequence) der DNA und positioniert den Transkriptionsfaktor in der Nähe des Transkriptionsstartpunktes, die Aktivierungsdomäne wird benötigt, um die Transkription durch Interaktion mit dem RNA-Polymerase II Komplex einzuleiten (Giniger *et al.*, 1985).

In "Yeast Two-Hybrid" Tests untersucht man die Interaktion zwischen zwei Proteinen, indem man das eine Protein an die GAL4-BD und das andere Protein an die GAL4-AD fusioniert. Wenn die Proteine miteinander interagieren, wird der GAL4 Transkriptionsfaktor rekonstituiert und aktiviert die Expression eines Reportergens, das

unter der Kontrolle eines *GAL4-UAS* abhängigen Promotors steht (Fields und Song, 1989).

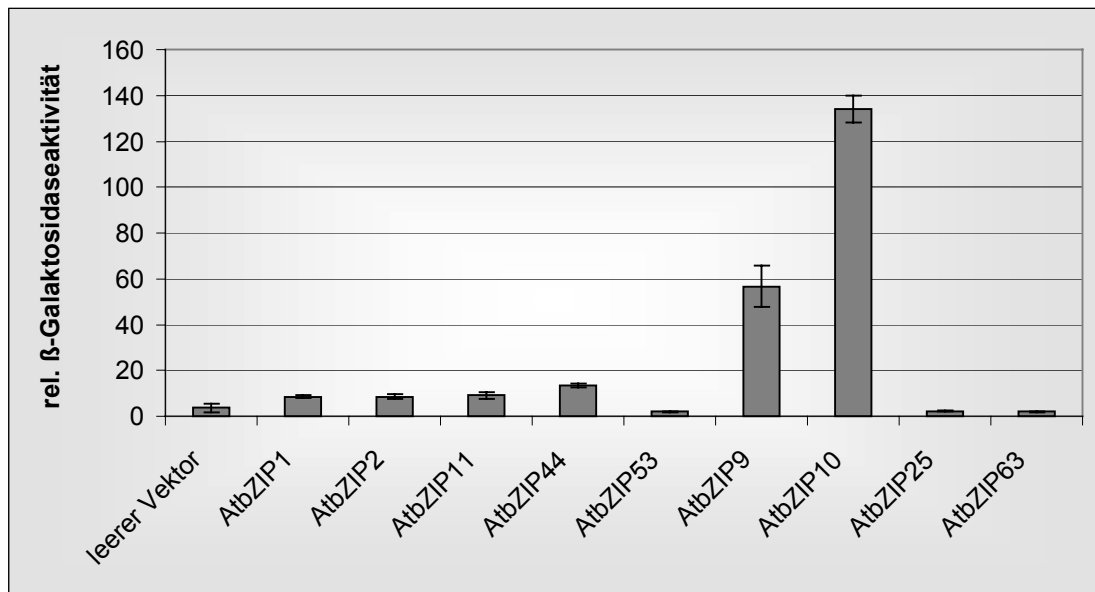
Die für die "Yeast One-Hybrid" bzw. "Yeast Two-Hybrid" Tests notwendigen Expressionsvektoren stammen aus dem REGIA-Projekt und wurden durch Rekombination der *AtbZIP*-Gene in die Gateway-Plasmide pDEST22 (AD) bzw. pDEST32 (BD) erzeugt (siehe Material und Methoden 4.5 Gateway Rekombination). Zur Kontrolle wurden die AD- und BD-Vektoren mit den Primern Gal4AD und Gal4BD sequenziert. Dabei konnte die Sequenz sowie die Einhaltung des Leserasters mit der GAL4-Domäne bestätigt werden.

### **5.1.1 *AtbZIP*-Transkriptionsfaktoren der Gruppen S1 und C zeigen unterschiedliche Aktivierungseigenschaften**

In dem "Yeast One-Hybrid" System wird lediglich das GAL4-BD Fusionsprotein in Hefe exprimiert, das über die Gal4-BD an die Reporter-gen-Promotoren binden kann. Eine Aktivierung des Reportergens sollte hier ausschließlich auf den Aktivierungseigenschaften des fusionierten *AtbZIP*-Proteins beruhen, und deren Stärke wiedergeben.

Um quantitative Werte für die Aktivierungseigenschaften der *AtbZIP*-Proteine zu erhalten, wurden oNPG-Tests mit jeweils drei unabhängigen Kolonien durchgeführt (Abbildung 5.1). Der oNPG-Test erlaubt eine quantitative Bestimmung der Aktivität der vom *lacZ*-Reporter gen kodierte  $\beta$ -Galaktosidase. Als Negativ-Kontrolle wurde der leere BD-Vektor pDEST32 verwendet. *AtbZIP9* ist ein starker, *AtbZIP1*, 2, 11, 44 vergleichsweise schwache Transkriptionsaktivatoren in Hefe. Für *AtbZIP53* und 63 konnten keine Aktivierungseigenschaften gezeigt werden. Die Ergebnisse wurden durch Verwendung verschiedener Methoden und Reporter genkonstrukte (Filter-lift assay, Wachstum auf Selektivmedium ohne Uracil oder ohne Histidin) verifiziert (nicht gezeigt).

Im Rahmen ihrer Diplomarbeit wurden diese Ergebnisse der oNPG-Tests von Andrea Ehlert reproduziert, außerdem wurden hier auch die Aktivierungseigenschaften von *AtbZIP10* und 25 quantifiziert (Ehlert, 2004). Dabei wurde gezeigt, dass *AtbZIP10* im Vergleich zu *AtbZIP9* eine mehr als doppelt so starke Aktivierung des Reporter gens bewirkt, während *AtbZIP25* in Hefe keine Aktivierungseigenschaften zeigt.



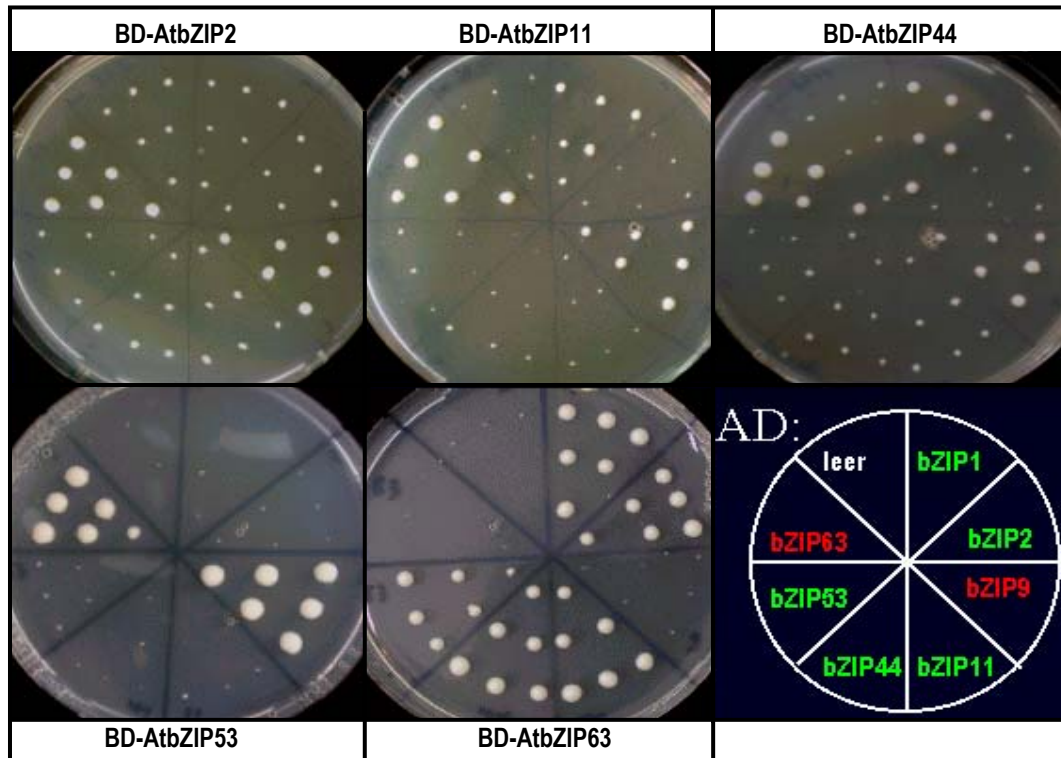
**Abbildung 5.1: Analyse der Aktivierungseigenschaften der Gruppe C/S1 AtbZIP-Transkriptionsfaktoren im “Yeast One-Hybrid“ System.** Die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität entspricht der Aktivität des *lacZ*-Reportergens, dessen Aktivierung hier ausschließlich über das Aktivierungspotential der durch die BD-Fusion an den Reportergen-Promotor gebrachten Transkriptionsfaktoren erfolgt. Die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten wurden jeweils für drei Klone bestimmt und werden mit Standardabweichungen dargestellt. Als Hefestamm wurde MaV203 verwendet, die BD-Fusionen wurden mit dem Plasmid pDEST32 erzeugt.

### 5.1.2 AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppe C heterodimerisieren in Hefe bevorzugt mit AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppe S1

Mit Hilfe des “Yeast Two-Hybrid“ Systems (Y2H) sollten Interaktionen zwischen Mitgliedern der Gruppen S1 und Mitgliedern der Gruppe C identifiziert und quantifiziert werden. Dabei wurde die durch Interaktionen entstehende Aktivierung des Reportergens mit Hilfe aller drei im verwendeten Stamm MaV203 zur Verfügung stehenden Reporterkonstrukte analysiert.

AtbZIP9 hat zu starke Aktivierungseigenschaften, um sinnvoll als BD-Fusion verwendet zu werden. Daher wurde ein Deletionsderivat, AtbZIP9 $\Delta$ N, verwendet, das reduzierte Aktivierungseigenschaften zeigt (Weltmeier, 2002).

Zunächst wurden mit Hilfe des *URA*-Reportergenkonstruktes Tests auf Interaktionen durchgeführt (Abbildung 5.2). Hierbei führt eine Interaktion zur Aktivierung eines Gens für die Uracil-Synthese, das Wachstum auf Platten ohne Uracil erlaubt.



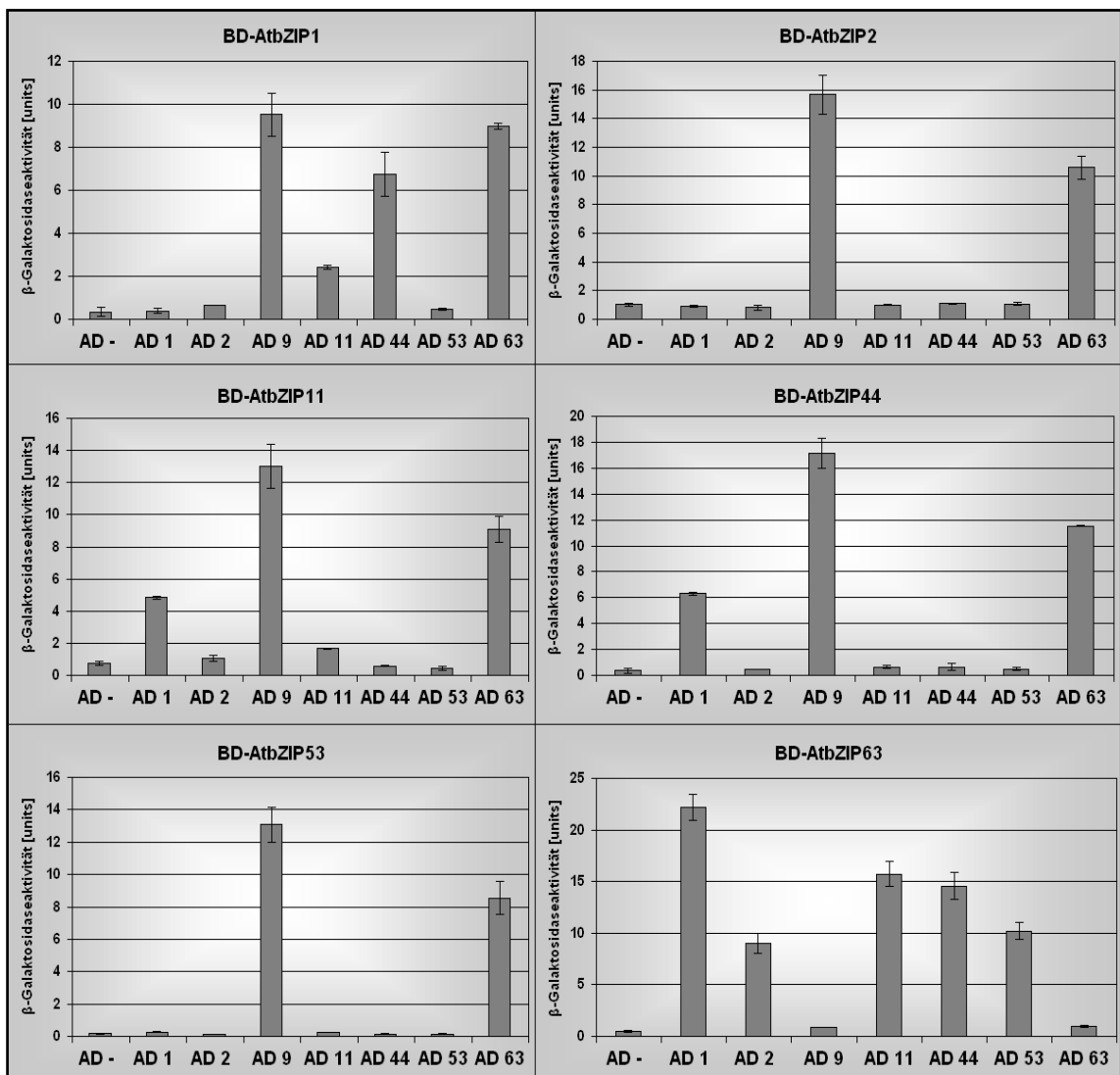
**Abbildung 5.2:** “Yeast Two-Hybrid“ (Y2H)-Tests zur Identifizierung von Protein-Protein Interaktionen zwischen AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1. Auf den Platten wurden Kotransformanten der angegebenen BD-AtbZIP Fusionen mit verschiedenen AD-AtbZIP Fusionen angeimpft. Die Positionen der verschiedenen AD-AtbZIP Fusionen sind rechts unten wiedergegeben, jede Kombination wurde aus drei unabhängigen Kolonien angeimpft. Y2H-Tests mit den BD-Fusionen von AtbZIP53 bzw. 63 wurden auf SD-Medium ohne Uracil, Y2H-Tests mit den leicht aktivierenden BD-Fusionen von AtbZIP2, 11 und 44 wurden auf SD-Medium ohne Histidin und mit 100mM 3-AT durchgeführt. Als Hefestamm wurde MaV203 verwendet, die BD-Fusionen wurden mit dem Plasmid pDEST32 erzeugt, die AD-Fusionen mit dem Plasmid pDEST22.

Für AtbZIP53-BD Fusionen konnten dabei spezifische Interaktionen mit den Gruppe C Mitgliedern AtbZIP9 und AtbZIP63 gezeigt werden, und für AtbZIP63-BD Fusionen spezifische Interaktionen mit allen Gruppe S1 Mitgliedern.

Die Aktivierungseigenschaften von AtbZIP1, 2, 11, 44 und 9 $\Delta$ N hingegen erwiesen sich als zu stark, um mit diesem Reporterkonstrukt als BD-Fusionen eingesetzt werden zu können. Daher wurden sie mit dem *HIS*-Reporterkonstrukt getestet, das ein Unterdrücken der Hintergrundaktivität durch Zugabe von 3-Amino-1,2,4-Triazol (3-AT) in das Medium erlaubt. Bei einer sehr hohen 3-AT Konzentration von 100mM konnten so für AtbZIP2, 11 und 44 spezifische Interaktionen mit AtbZIP9 und 63 gezeigt werden, AtbZIP11 und AtbZIP44 interagierten außerdem mit AtbZIP1 (Abbildung 5.2). BD-Fusionen von AtbZIP1 und AtbZIP9 $\Delta$ N verursachten auch hier noch eine zu starke Hintergrundaktivität, um klare Ergebnisse zu erhalten.



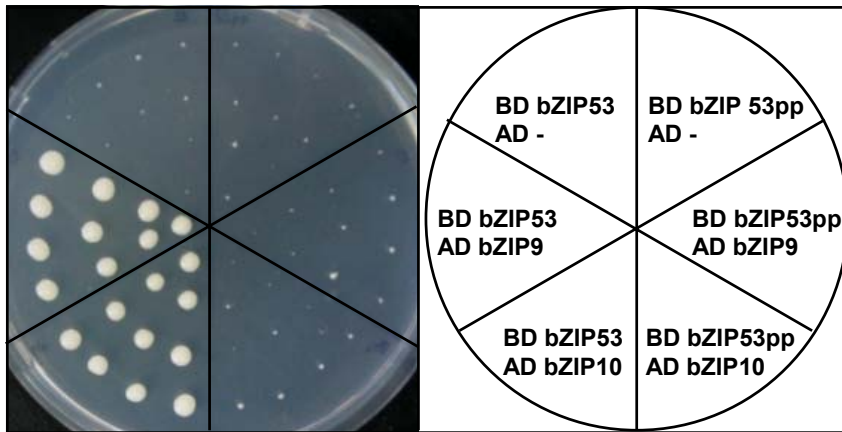
Im folgenden wurden die Interaktionen unter Verwendung des *lacZ*-Reporterkonstruktes in oNPG-Tests untersucht, die den Vorteil bieten, dass sie quantitative Werte liefern. Die Messungen der  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität wurden für jede AtbZIP-Kombination mit zwei biologischen und jeweils zwei technischen Replikaten durchgeführt, und die so erhaltenen Werte wurden mit Standardabweichungen in Diagramme aufgenommen, die in Abbildung 5.3 dargestellt sind.



**Abbildung 5.3:** oNPG-Tests zur Quantifizierung von Protein-Protein Interaktionen zwischen AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1. Die verwendeten BD-Fusionen wurden mit dem Plasmid pDEST32 erzeugt, die AD-Fusionen mit dem Plasmid pDEST22. Die über den einzelnen Diagrammen angegebenen BD-Fusionen wurden mit AD-Fusionen von AtbZIP1 (AD1), AtbZIP2 (AD2), AtbZIP11 (AD11), AtbZIP44 (AD44), AtbZIP53 (AD53) und AtbZIP63 (AD63) in den Hefestamm MaV203 kotransformiert, und die Aktivität des *lacZ*-Reportergens wurde in oNPG-Tests für jeweils zwei unabhängige Kolonien in je zwei Messungen bestimmt. oNPG-Tests unter Verwendung einer BD-AtbZIP9 $\Delta$ N Fusion lieferten keine brauchbaren Resultate (nicht gezeigt).



Um zu überprüfen, ob es sich bei den gezeigten Interaktionen wirklich um durch den Leucin Zipper vermittelte Dimerisierungen handelt, wurde ein mutiertes AtbZIP53-Protein (AtbZIP53pp) erzeugt, bei dem die in der Leucin Zipper liegenden Aminosäuren Leucin58 und Alanin72 gegen Proline ausgetauscht wurden. Die Proline brechen die  $\alpha$ -helikale Struktur des Leucin Zippers und verhindern so die Heterodimerisierung. Exemplarisch wurde die Interaktion dieser Mutante mit AtbZIP9 und AtbZIP10 getestet. Tatsächlich ließ sich hier keine Interaktion mehr nachweisen, was belegt, dass es sich bei den gezeigten Interaktionen wirklich um eine Zipper-vermittelte Heterodimerisierung handelt (Abbildung 5.5).



**Abbildung 5.5:** Tests unter Verwendung des *URA*-Reportergens zeigen, dass die Zipper-Mutante AtbZIP53pp nicht mehr mit AtbZIP9 oder AtbZIP10 interagieren kann. Kotransformanten der angegebenen BD- und AD-AtbZIP Fusionen wurden mit einem Zahnstocher angeimpft, auf der rechten Seite wurde AtbZIP53 mit mutierter Zipper-Domäne verwendet, auf der linken Seite als Kontrolle das nicht mutierte AtbZIP53. Als Hefestamm wurde MaV203 verwendet, die BD-Fusionen wurden mit dem Plasmid pDEST32 erzeugt, die AD-Fusionen mit dem Plasmid pDEST22.

## **5.2 Promotor-GUS Fusionen zeigen eine Kolo­kalisierung von AtbZIP Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1**

Kolo­kalisierung ist eine Voraussetzung für die Heterodimerisierung. In einem ersten Experiment wurde die Gewebe-spezifische Expression von AtbZIP Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 mit Hilfe von Promotor-GUS Fusionen analysiert. Promotor-GUS Fusionen bieten hier gegenüber Northern-Analysen zwei entscheidende Vorteile. Zum einen lassen Northern-Analysen nur begrenzt Aussagen über die Gewebespezifität zu, da eine Isolation z.B. von Zellen des Phloems oder von Schließzellen technisch kaum zu realisieren ist. Zum anderen korreliert die Transkriptmenge nicht notwendigerweise mit der Menge an Protein, die letztlich für die Funktion entscheidend ist.

Gerade für die Gruppe S1 trifft dieses in besonderem Maße zu, da für sie eine Saccharose-induzierte Repression der Translation gezeigt wurde (Wiese *et al.*, 2004). Promotor-GUS Fusionen hingegen sind eine Möglichkeit der Expressionsanalyse, die translationale Kontrollmechanismen zumindest zum Teil miteinbezieht, und die im Vergleich zum Northern eine genauere Darstellung der Gewebespezifität der Expression ermöglicht.

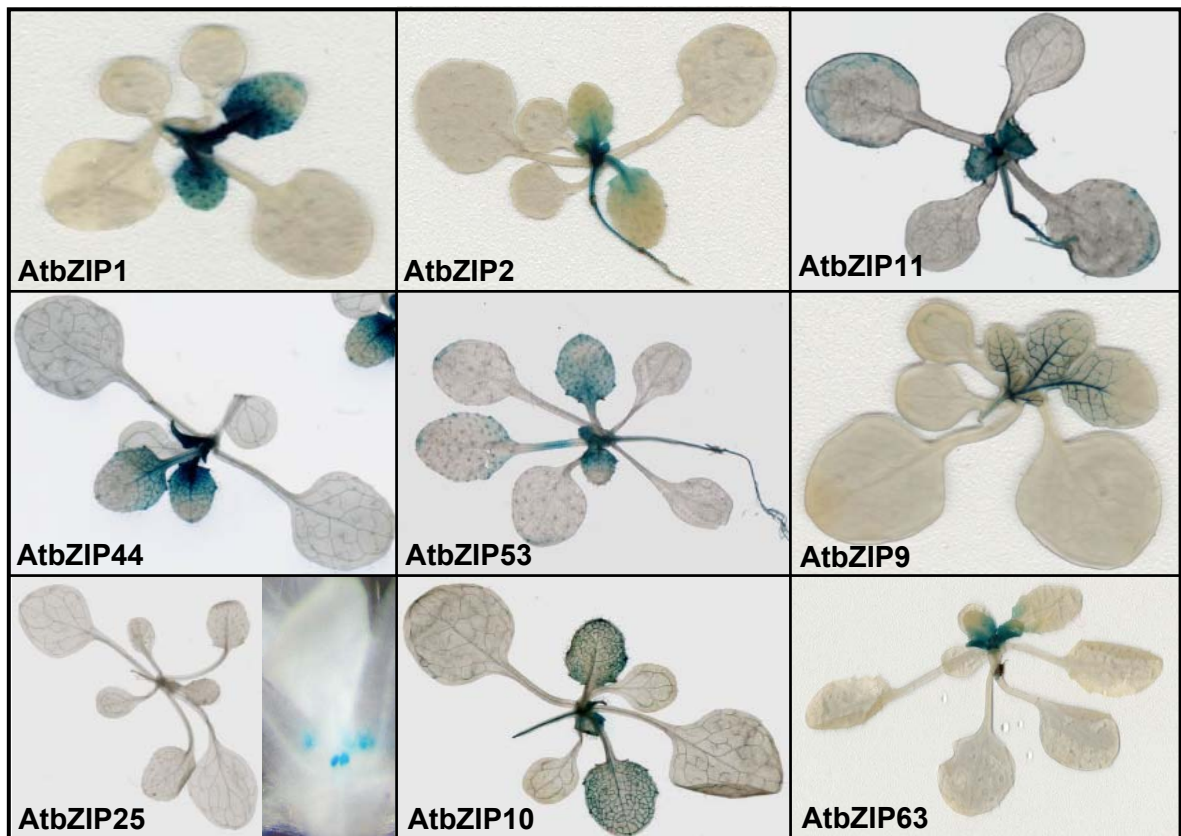
Für alle AtbZIP-Transkriptionsfaktoren des Heterodimerisierungsnetzwerkes stehen Linien mit Promotor-GUS Fusionen zur Verfügung. Die Promotor-GUS Linien für AtbZIP1 und AtbZIP53 wurden im Rahmen der vorangegangenen Diplomarbeit erzeugt (Weltmeier, 2002), und im Rahmen der Dissertation wurden mehrere unabhängige Linien mit vergleichbarer GUS-Aktivität identifiziert und über mehrere Generationen weitergezogen, um homozygote Pflanzen zu erhalten.

### **5.2.1 AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 zeigen überlappende gewebespezifische Expressionsmuster**

Die verschiedenen Promotor-GUS Linien wurden auf Erde angezogen. Nach 20 Tagen wurden Pflanzen mit 6-8 Blättern an der Wurzel kurz unterhalb der Erde abgeschnitten und mit 1mM X-Gluc / 1mM Kalium-Hexacyanoferrat 24h gefärbt (Abbildung 5.6).

Während bei allen anderen Linien eine deutliche Färbung zu erkennen war, zeigten die  $Pro_{AtbZIP25}:GUS$  und  $Pro_{AtbZIP53}:GUS$  Linien nur eine Färbung der Nebenblätter. Daher wurde für diese Linien die Färbung mit 2 und 4 mM X-Gluc / 1mM Kalium-Hexacyanoferrat wiederholt.

Allen Linien außer  $Pro_{AtbZIP25}:GUS$  ist gemeinsam, dass sich die stärksten Färbungen in jungen Blattanlagen finden, und dass die GUS-Aktivität während der Entwicklung der Blätter zurückgeht, so dass die ältesten Blätter keine GUS-Aktivität mehr zeigen. Darüber hinaus ist in der Regel die GUS-Aktivität am Blattansatz höher als in der Blattspitze. In  $Pro_{AtbZIP9}:GUS$  und  $Pro_{AtbZIP10}:GUS$  Linien ist die GUS-Aktivität auf das Leitgewebe beschränkt, in den anderen Linien erstreckt sie sich über die ganze Blattspreite, ist aber auch dort im Leitgewebe am stärksten. Für  $Pro_{AtbZIP9}:GUS$  Pflanzen konnte in mikroskopischen Schnittpräparaten gezeigt werden, dass die GUS-Aktivität auf das Phloem beschränkt ist (Xuan Wang, persönliche Mitteilung). Für die  $Pro_{AtbZIP25}:GUS$  Pflanzen konnte auch bei hohen X-Gluc Konzentrationen nur eine



**Abbildung 5.6: Histologische Färbungen von 20 Tage alten Promotor-GUS Pflanzen zum Nachweis der  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität zeigen eine Kolokalisation von AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 in sich entwickelnden Blättern.** Die Pflanzen wurden auf Erde angezogen, am Hypokotyl abgeschnitten, 20 Minuten in 90% Aceton fixiert und anschließend 24 Stunden in 1mM X-Gluc / 1mM Kalium-Hexacyanoferrat gefärbt ( $Pro_{AtbZIP25}:GUS$  und  $Pro_{AtbZIP25}:GUS$  Pflanzen wurden in 2mM X-Gluc / 1mM Kalium-Hexacyanoferrat gefärbt). Für jedes Promotor-GUS Konstrukt ist eine repräsentative Pflanze gezeigt. Für  $Pro_{AtbZIP25}:GUS$  wurde eine Blaufärbung nur in den Nebenblättern gefunden, die rechts neben der Pflanze vergrößert dargestellt sind.

Färbung der Nebenblätter gefunden werden. Die Färbungen wurden mit allen zur Verfügung stehenden Linien reproduziert, und vergleichbare Expressionsmuster wurden auch bei 5 Tage (erste echte Blätter erkennbar) oder 28 Tage alten Pflanzen gefunden.

Im folgenden wurde untersucht, in welchen Geweben blühender Pflanzen eine GUS-Aktivität zu beobachten war. Die Daten sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst. GUS-Aktivitäten wurden in praktisch allen Pflanzenteilen mit Ausnahme von älteren Blättern, also mit Ausnahme von Source-Geweben, gefunden. In vielen Geweben schwankten die GUS-Aktivitäten jedoch sehr stark, so dass dort wahrscheinlich andere Faktoren als die Gewebespezifität ausschlaggebend sind.

**Tabelle 5.1: Übersicht über die Gewebe, in denen in den Promotor\_GUS Linien der AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 eine GUS-Aktivität beobachtet wurde.** +: reproduzierbare GUS-Aktivität in diesem Gewebe; -: keine GUS-Aktivität in diesem Gewebe; (+): Die GUS-Aktivität in diesen Geweben ist starken Schwankung unterworfen; <sup>1</sup>: GUS-Aktivität vorwiegend im Leitgewebe; <sup>2</sup>: GUS-Aktivität vorwiegend in den Funikuli; <sup>3</sup>: GUS-Aktivität vorwiegend in der Schotenhülle; <sup>4</sup>: GUS-Aktivität vorwiegend Samenanlagen.

AtbZIP-Faktoren:	Gruppe S1					Gruppe C			
	1	2	11	44	53	9	10	25	63
Junge Blätter	+	+	+	+	+	+ <sup>1</sup>	+	+	+
Alte Blätter	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nebenblätter	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trichome	+	+	(+)	+	(+)	-	+	-	-
Hydathoden	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	(+)	-	-
Stängel	(+)	(+)	(+)	-	(+)	+ <sup>1</sup>	(+)	+	(+)
Wurzel	+	+	+	(+)	(+)	+ <sup>1</sup>	+	(+)	+
Wurzelspitze	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Blütenknospe	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Blütenblätter	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	+ <sup>1</sup>	-	(+)	-
Kronblätter	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+) <sup>1</sup>	(+)	-	(+)
Fruchtknoten	(+)	+	(+)	+	-	+	(+)	(+)	-
Pollen	(+)	(+)	-	-	(+)	-	-	(+)	(+)
Konnektiv	-	-	+	+	-	+	+	-	-
Junge schoten	<sup>3</sup>	2, <sup>3</sup>	2, <sup>4</sup>	2, <sup>4</sup>	-	1, <sup>2</sup>	2	3	2, <sup>3</sup>

### **5.3 Erzeugung und Charakterisierung von Mutanten und ektopischen Überexpressionslinien der AtbZIP-Transkriptionsfaktoren 1, 53, 9 und 63**

Über die Funktion der an dem Heterodimerisierungsnetzwerk beteiligten Transkriptionsfaktoren war zu Beginn dieser Doktorarbeit wenig bekannt, lediglich für *AtbZIP11* gab es Publikationen, in denen eine Regulation durch Licht und Zucker, sowie Daten zur gewebespezifischen Expression gezeigt werden konnten (Rook *et al.*, 1998a; Rook *et al.*, 1998b). Da für das Verständnis der Bedeutung der Heterodimerisierung ein Verständnis der Funktion der einzelnen Heterodimerisierungspartner notwendig ist, sollte versucht werden diese zu charakterisieren.

Um Funktionen mit Hilfe von Phänotypen zu belegen wurden mehrere transgene Linien mit einer ektopischen Überexpression der AtbZIP-Transkriptionsfaktoren erzeugt. Darüber hinaus wurden in der SALK Sammlung von T-DNA Insertionslinien Mutanten der AtbZIP-Transkriptionsfaktoren identifiziert und anschließend charakterisiert. Die so erhaltenen Linien sollten neben der phänotypischen Charakterisierung auch zur Identifizierung von Zielgenen durch Mikroarray-Experimente, Chromatin-IP und Northern-Analysen genutzt werden.

Da parallel zu dieser Arbeit eine funktionelle Charakterisierung von *AtbZIP10* und *AtbZIP25* durch unseren Kollaborationspartner Jesus Vincente-Carbajosa von der Universität Madrid und eine funktionelle Charakterisierung von *AtbZIP2*, *11* und *44* durch unseren Kollaborationspartner Sjef Smeekens von der Universität Utrecht erfolgen sollte, wurde ein besondere Schwerpunkt auf *AtbZIP1*, *53*, *9* und *63* gelegt.

#### **5.3.1 Ektopische Expression von AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 unter Kontrolle des 35S-Promotors**

Zur Erzeugung transgener Linien mit einer ektopischen Überexpression wurden *AtbZIP1*, *2*, *11*, *44*, *53*, *9* und *63* mit der Gateway-Technik in den Pflanzen-

Transformationsvektor pAlligator2 rekombiniert. Dieser Vektor enthält einen 35S-Promotor sowie einen HA-tag, der N-terminal an das in den Vektor rekombinierte Gen fusioniert wird. Die so entstandenen Plasmide wurden in den *Agrobacterium tumefaciens* Stamm GV3101 (Koncz und Schell, 1986) transformiert. Nach der Transformation gewachsene Kolonien wurden per PCR mit dem Primern 35S sowie einem AtbZIP-spezifischen Rückwärtsprimer auf Anwesenheit des Plasmids getestet.

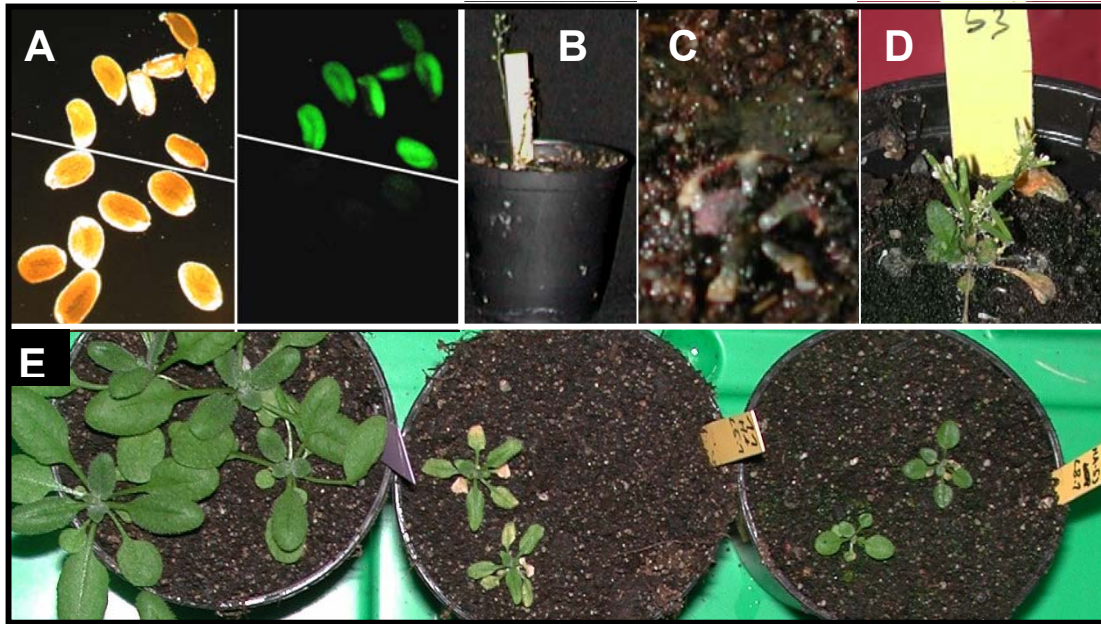
Positiv getestete *Agrobacterium*-Klone wurden anschließend genutzt, um *Arabidopsis thaliana* nach der "floral dip" Methode stabil zu transformieren (Clough und Bent, 1998). Der Vektor pAlligator2 verwendet als Selektionsmarker ein unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors stehendes GFP. Dieser Selektionsmarker bewirkt, dass transgene Samen grün fluoreszieren. Die nach der Transformation gesammelten Samen wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop auf diese Expression des GFP hin untersucht, und für alle transformierten Konstrukte konnten transgene Samen identifiziert werden.

Von den transgenen Samen mit den Konstrukten zur Überexpression von *AtbZIP2*, *11*, *44* oder *53* sind viele deutlich kleiner als nicht transformierte, d.h. keine GFP-Expression zeigende, Samen (Abbildung 5.7 A).

Samen mit deutlicher GFP-Aktivität wurden auf Erde ausgelegt. Mehrere der mit dem Konstrukt für eine ektopische Überexpression von *AtbZIP11*, *44* oder *53* transformierten Linien zeigten einen deutlichen, zum Teil extremen Zwergwuchs (Abbildung 5.7 B-E). Des weiteren sind viele der ausgelegten Samen dieser Linien nicht gekeimt, was dafür sprechen könnte, dass eine starke Überexpression dieser AtbZIP-Transkriptionsfaktoren letal ist.

Samen von einer *35S:AtbZIP53* Linie sowie von einer *atbzip53* Mutante (siehe 5.3.2) wurden 4 Tage im Dunkeln auf feuchtem Whatman Papier angezogen, um den Effekt der Überexpression auf das Streckungswachstum des Hypokotyls zu beobachten. Dabei zeigten die *AtbZIP53* überexprimierende Pflanzen ein deutlich kürzeres Hypokotyl als der Wildtyp. Das Hypokotyl der *atbzip53* Mutanten war leicht länger, der Unterschied lag jedoch im Bereich der natürlichen Schwankungen zwischen einzelnen Individuen (Abbildung 5.8).





**Abbildung 5.7: Phänotypen von Pflanzen mit ektopischer Überexpression von AtbZIP11, 44 oder 53.** A: T1-Samen aus der Transformation zur AtbZIP11-Überexpression. Transformierte, GFP-Expression zeigende Samen sind kleiner als nicht transformierte Samen. B-D: 6 Wochen alte Überexpressionspflanzen mit extremem Zwergphänotyp, T<sub>1</sub> Generation. (B:AtbZIP11; C:AtbZIP44; D:AtbZIP53). Diese Pflanzen produzierten keine keimungsfähigen Samen. E: 24 Tage alte Überexpressionspflanzen mit deutlichem Zwergphänotyp, T<sub>2</sub> Generation. Links Wildtyp; Mitte *35S:AtbZIP11* (Linie 5.1); Rechts *35S:AtbZIP53* (Linie 8.1)

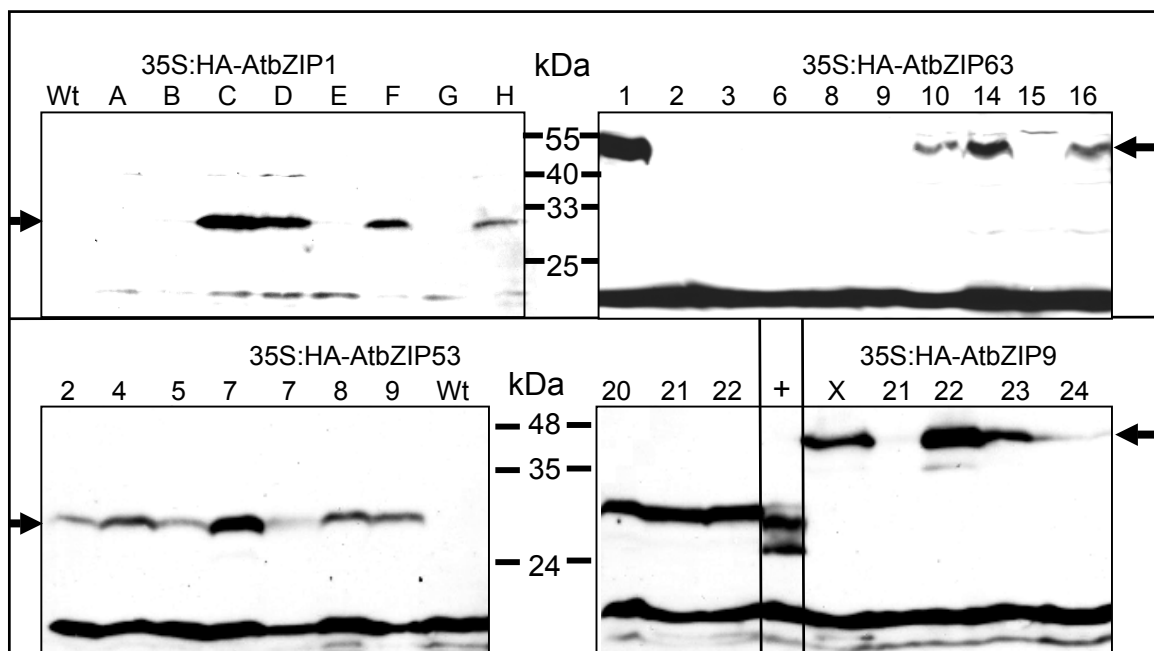


**Abbildung 5.8: Reduziertes Streckungswachstum des Hypokotyls in *35S:AtbZIP53* Pflanzen bei Keimung im Dunkeln.** Die Samen wurde auf feuchtem Wattman Papier ausgelegt, 3 Tage bei 4°C stratifiziert, und anschließend 4 Tage bei Raumtemperatur ausgekeimt. Der Versuch wurde mit zwei unabhängigen AtbZIP53 Überexpressionslinien reproduziert.

Die erhaltenen transgenen Pflanzen wurden in Western-Analysen auf die Expression der HA-AtbZIP Fusionsproteine untersucht. Für AtbZIP1, 53, 9 und 63 konnten mehrer Linien mit einer deutlichen Expression identifiziert werden, wobei die HA-AtbZIP Fusionsprotein langsamer liefen als die berechneten Molekulargewichte erwarten ließen (siehe Abbildung 5.9). Linien mit extremen Phänotypen wie in Abbildung 5.8 B-D

konnten nicht in Western-Analysen untersucht werden, da nicht genug Pflanzenmaterial vorhanden war. In Überexpressionslinien von AtbZIP2, 11 oder 44, die keinen Phänotyp zeigten, ließ sich in Western-Analysen auch die Expression von HA-getagtem Protein nicht nachweisen, so dass das Überexpressionskonstrukt in diesen Pflanzen wahrscheinlich nicht aktiv war.

Während die meisten der identifizierten HA-AtbZIP1 bzw. HA-AtbZIP9 Überexpressionslinien sich nicht erkennbar vom Wildtyp unterschieden, zeigten die AtbZIP1-Überexpressionslinie H sowie die AtbZIP9-Überexpressionslinie X einen buschigen Wuchs und verkümmerte Pollensäcke sowie Schoten (Abbildung 5.10). Dieser Phänotyp fand sich auch bei einem Teil der Nachkommen dieser beiden Linien. Beide Linien zeigten in Western-Analysen eine deutliche Überexpression, jedoch korreliert diese nicht direkt mit dem Phänotyp, da andere Linien mit einer vergleichbaren oder stärkeren Expression diesen Phänotyp nicht zeigten. Somit bleibt es fraglich, ob der beobachtete Phänotyp auf die Überexpression zurückzuführen ist.



**Abbildung 5.9: Western-Analysen verschiedener 35S:HA-AtbZIP Überexpressionslinien.** Die Detektion fand mit einem anti-HA Antikörper statt, detektierte HA-AtbZIP Fusionsproteine sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet. Die bei etwa 16 kDa auftretende Bande ist eine für den anti-HA Antikörper typische Hintergrundbande in *Arabidopsis*. Die Buchstaben und Zahlen über den einzelnen Gelspuren kennzeichnen die verschiedenen Linien, + steht für eine Positivkontrolle. Von auf Erde angezogenen Pflanzen wurde Blattmaterial geerntet und daraus mit Harnstoff-Extraktionspuffer Proteinextrakte gewonnen. Jeweils 30µl Proteinextrakt wurden auf ein 15% SDS-Gel aufgetragen. (Berechnet Molekulargewichte: HA-AtbZIP1: 24 kDa; HA-AtbZIP53: 24,5 kDa; HA-AtbZIP9: 38,1 kDa; HA-AtbZIP63: 41,8 kDa)



**Abbildung 5.10: A: Blütenstände von ektopischen AtbZIP1 oder AtbZIP9 Überexprimierern sowie Wildtyp-Pflanzen.** Die Pflanzen waren 7 Wochen alt und wurden unter Langtag angezogen. Die Schoten der Überexpressionspflanzen sind verkümmert und enthalten kaum Samen. B: Nahaufnahme von Blüten zum Zeitpunkt der Bestäubung. Die Pollensäcke der ektopischen AtbZIP9 Überexpressionspflanzen sind verkümmert.

### 5.3.2 Identifizierung und Charakterisierung von T-DNA Insertionsmutanten

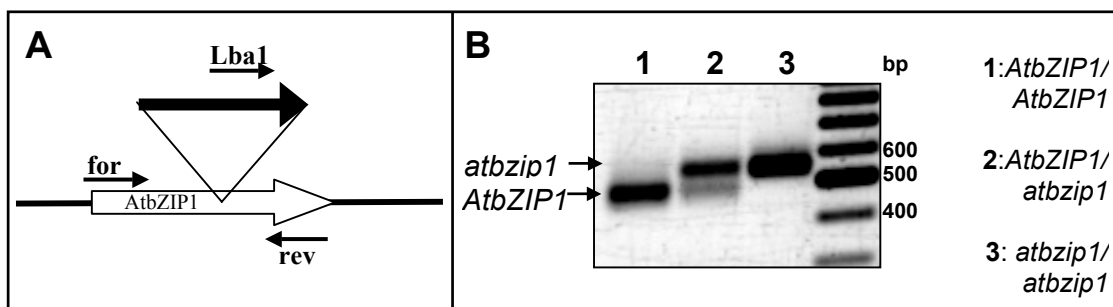
Ektopische Überexpression ist ein wertvolles Hilfsmittel für die funktionelle Charakterisierung eines Gens, kann jedoch auch zu irreführenden Ergebnissen führen, z.B. da das ektopisch exprimierte Gen Funktionen in Geweben ausüben kann, in denen es normalerweise gar nicht exprimiert wird. Daher ist es notwendig, neben den ektopischen Überexprimierern auch Mutanten ohne oder mit reduzierter Expression der AtbZIP-Transkriptionsfaktoren zu charakterisieren.

Eine Methode zur Erzeugung solcher Mutanten ist die T-DNA Mutagenese (Alonso *et al.*, 2003). Die Insertion einer T-DNA in ein Gen kann zum Verlust oder zu einer Reduzierung der Genfunktion führen. Da die Integration der T-DNA in das Pflanzen-Genom zufällig erfolgt, lassen sich Gene auf diese Weise nicht gezielt ausschalten. Es sind jedoch von mehreren Instituten große Sammlungen von T-DNA Insertionsmutanten erstellt worden. Durch TAIL-PCR (Alonso *et al.*, 2003) wurden die an die T-DNA Insertionsstellen angrenzenden Sequenzen gewonnen, die dann mit der Sequenz des *A. thaliana* Genoms verglichen wurden, um den Insertionsort der T-DNA

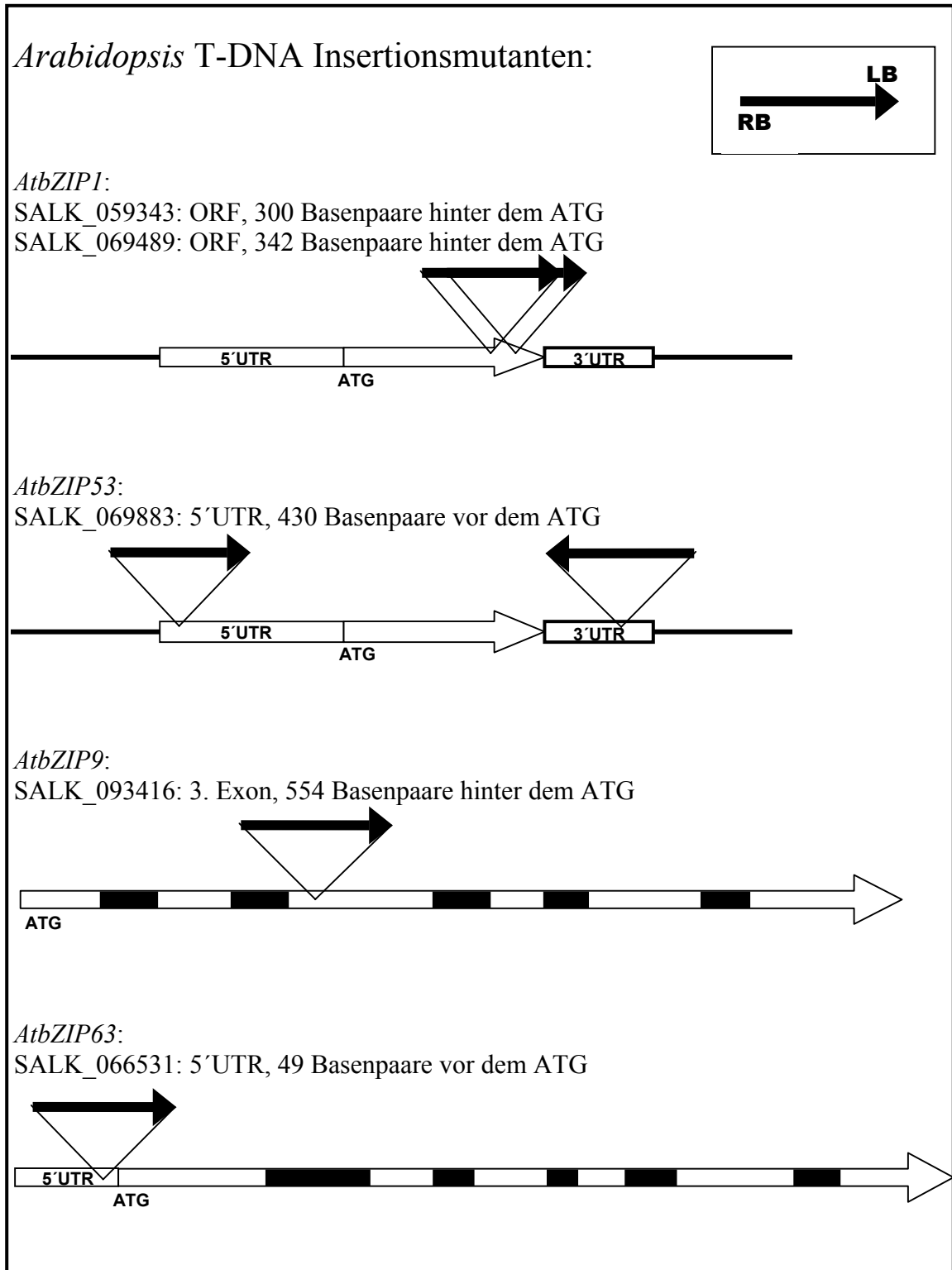
und damit das eventuell mutierte Gen zu ermitteln. Diese Daten sind in einer Datenbank zusammengefasst, in der sich nach Mutanten für das gewünschte Gen suchen lässt (SIGnAL "T-DNA Express" *Arabidopsis* Gene Mapping Tool, (Alonso *et al.*, 2003); <http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>).

Verfügbare Mutanten von *AtbZIP*-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C/S1 im Ökotyp Columbia wurden bei dem NASC stock center bestellt. Da die Angaben in der Datenbank zum Teil fehlerhaft sind, wurde das Vorhandensein der in der Datenbank angegebenen T-DNA Insertionen mit Hilfe von PCR-Analysen verifiziert. Dabei konnten für zwei Linien eine Insertion im Kodierbereich von *AtbZIP1* bestätigt werden (SALK\_059343, SALK\_069489), für eine Linie eine Insertion im Kodierbereich von *AtbZIP9* (SALK\_093416) und für zwei weitere Linien eine Insertion im 5'untranslatierten Bereich von *AtbZIP53* (SALK\_069883) bzw. *AtbZIP63* (SALK\_066531). Für die Linien SALK\_004675 (*AtbZIP53*) und SALK\_111897 (*AtbZIP9*) konnten die in der Datenbank angegebenen T-DNA Insertionen nicht bestätigt werden.

Die positiv getesteten Linien wurden bis zur T2-Generation weitergezogen und mittels PCR wurden homozygote Linien identifiziert (Abbildung 5.11). Eine Übersicht über die vorhandenen T-DNA Insertionsmutanten findet sich auf der folgenden Seite (Abbildung 5.12).



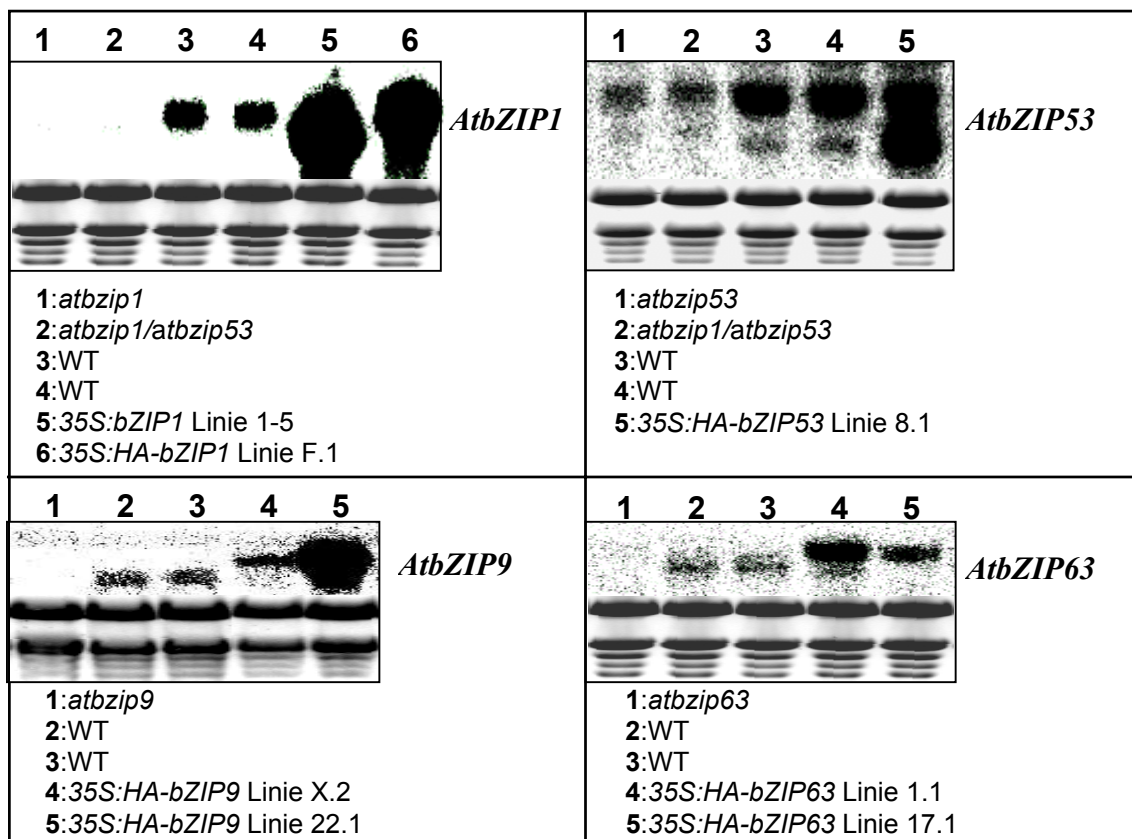
**Abbildung 5.11: 3-Primer PCR zur Charakterisierung einer *atbzip1* T-DNA Insertionsmutante.**  
 A: Die drei verwendeten Primer sind ein genspezifischer Vorwärtsprimer (for), ein genspezifischer Rückwärtsprimer (rev) sowie ein T-DNA spezifischer Primer (Lba1). Im Wildtyp bilden nur for und rev ein PCR-Produkt (hier 500bp), in der homozygoten Mutante nur Lba1 und rev (hier ~550bp). In Heterozygoten Pflanzen treten beide Banden auf. B: Agarosegel mit den PCR-Produkten von Wildtyp, einer heterozygoten sowie einer homozygoten T-DNA Insertionsmutante.



**Abbildung 5.12: Übersicht über die in dieser Arbeit charakterisierten T-DNA Insertionsmutanten.** Exons sind weiß dargestellt, Introns schwarz, 3' und 5' untranslatierte Bereiche sind beschriftet (3'UTR, 5'UTR). Die T-DNA ist als schwarzer Pfeil dargestellt, die Pfeilspitze gibt die Position der linken T-DNA Grenz Sequenz an. Die T-DNA ist nicht maßstabsgerecht wiedergegeben. Zu jeder T-DNA Insertionslinie ist der Insertionsort sowie der Abstand zum ATG angegeben. LB: linke T-DNA Grenz Sequenz; RB: rechte T-DNA Grenz Sequenz; ORF: offenes Leseraster; UTR: Untranslatierter Bereich.

Die Transkriptmengen der *AtbZIP*-Transkriptionsfaktoren in den homozygoten T-DNA Insertionsmutanten, im Wildtyp und in verschiedenen Überexpressionslinien wurden in Northern Analysen verglichen (Abbildung 5.13). Dazu wurden zwei Wochen alte Pflanzen aus Sterilkultur verwendet. Für *AtbZIP1*, 9 und 63 konnte in den Mutanten kein Transkript mehr detektiert werden, während in den Überexpressionslinien ein deutlich stärkeres Signal als im Wildtyp detektiert wurde.

Mit 1242 Basenpaaren ist die *AtbZIP53* mRNA deutlich länger als der eigentliche Kodierbereich (441bp), was auf den langen 5'UTR zurückzuführen ist. Da dieser 5'UTR im Transkript des *AtbZIP53* Überexpressionskonstruktes fehlt, ist es deutlich kürzer. Für *AtbZIP1* ist dieser Unterschied nicht so deutlich, da hier die mRNA nur 907bp lang ist, während der Kodierbereich mit 474bp sogar länger als der von *AtbZIP53* ist. In Northern-Analysen zur Expression von *AtbZIP53* wurden meistens zwei Banden detektiert, die auch hier zu sehen sind.



**Abbildung 5.13: Charakterisierung homozygoter T-DNA Insertionsmutanten sowie einzelner Überexpressions- Linien von *AtbZIP1*, 53, 9 und 63 durch Northern Analysen.** Die RNA wurde aus 2 Wochen alten, in Sterilkultur auf 2MS Medium angezogenen Pflanzen isoliert. Die verwendeten T-DNA Insertionsmutanten sind SALK\_059343 (*atbzip1*), SALK\_069883 (*atbzip53*), SALK\_066531 (*atbzip63*) und SALK\_93416 (*atbzip9*).

---

Die obere, stärkere Bande läuft deutlich langsamer als die des Überexpressionskonstruktes, und ist damit eher dem erwarteten Transkript zuzuordnen. Die schwächere, untere Bande läuft etwa auf einer Höhe mit Transkript des Überexpressionskonstruktes. Interessanterweise sind beide Banden in der *atbzip53*-Mutante deutlich schwächer, so dass es sich bei der unteren Bande möglicherweise um ein kürzeres Transkript von *AtbZIP53* handelt. Da das *AtbZIP53*-Transkript noch detektierbar ist, ist die Linie als Knock-down einzustufen.

Die Mutanten zeigten keine offensichtlichen Phänotypen. Da dies möglicherweise auf eine funktionelle Redundanz der Faktoren zurückzuführen ist, wurden durch Kreuzung der Mutanten der jeweils ähnlichsten *AtbZIP*-Transkriptionsfaktoren *atbzip1/atbzip53* und *atbzip9/atbzip63* Doppel-Mutanten erzeugt. Jedoch zeigten auch diese Linien keine auffälligen Phänotypen.

## 5.4 Prolindehydrogenase ist ein Zielgen von AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1

Prolindehydrogenase (ProDH) ist ein Enzym, welches den ersten Schritt der Degradation der Aminosäure Prolin katalysiert. Prolin wird als kompatibles Osmolyt unter osmotischem Stress akkumuliert, wo es außerdem als Schutz vor Hydroxylradikalen dienen könnte (Delauney und Verma, 1993; Schobert und Tschesche, 1978; Smirnov und Cumbes, 1989). Unter hypoosmolaren Bedingungen wie etwa nach Ende von osmotischem Stress wird die *ProDH* induziert und katalysiert den Abbau von Prolin (Peng *et al.*, 1996).

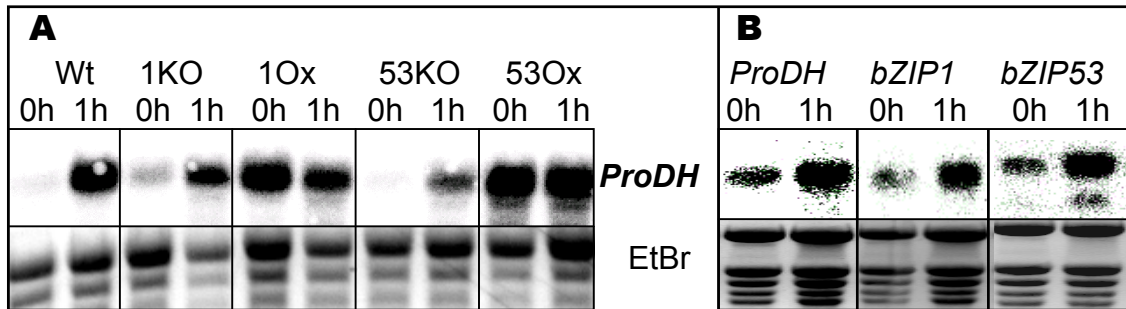
Neben der Funktion unter hypoosmotischem Stress wird für die *ProDH* auch eine Funktion in der Pollen- und Samenentwicklung vermutet (Nakashima *et al.*, 1998; Verbruggen *et al.*, 1996). Hier könnte Prolin als eine schnell verfügbare Quelle von Stickstoff, Kohlenstoff und Reduktionsequivalenten dienen (Blum und Ebercon, 1976; Skubatz *et al.*, 1989). In einem transienten Expressionssystem in Protoplasten konnten (Sato *et al.*, 2004) zeigen, dass AtbZIP2, 11, 44 und 53, nicht jedoch AtbZIP1, an ein *ACTCAT*-Motiv aus dem *ProDH*-Promotor binden und die Transkription aktivieren.

### 5.4.1 AtbZIP53 und AtbZIP1 regulieren die Expression der *ProDH*

Um zu überprüfen, ob die Transkriptionsfaktoren AtbZIP1 und AtbZIP53 *in planta* die Expression der *ProDH* regulieren können, wurden durch Northern Analysen die Transkriptmenge der *ProDH* in Pflanzen mit veränderter Expression von *AtbZIP1* oder *AtbZIP53* quantifiziert. Dabei wurde eine konstitutive Expression der *ProDH* nicht nur in *35S:AtbZIP53* Pflanzen, sondern, im Widerspruch zu den Daten von Sato *et al.* (2004), auch in *35S:AtbZIP1* Pflanzen gefunden (Abbildung 5.14). Die konstitutive Expression der *ProDH* in *35S:AtbZIP53* oder *35S:AtbZIP1* Pflanzen konnte sowohl mit Pflanzen aus Sterilkultur auf 2MS-Medium, als auch mit auf Erde angezogenen Pflanzen, mehrfach reproduziert werden.

Für die *ProDH* wird eine Induktion innerhalb einer Stunde durch eine Hypoosmolaritätsbehandlung beschrieben, bei der Pflanzen aus 2MS-Sterilkultur in Wasser transferiert werden (Nakashima *et al.*, 1998). *AtbZIP1* und *AtbZIP53* werden





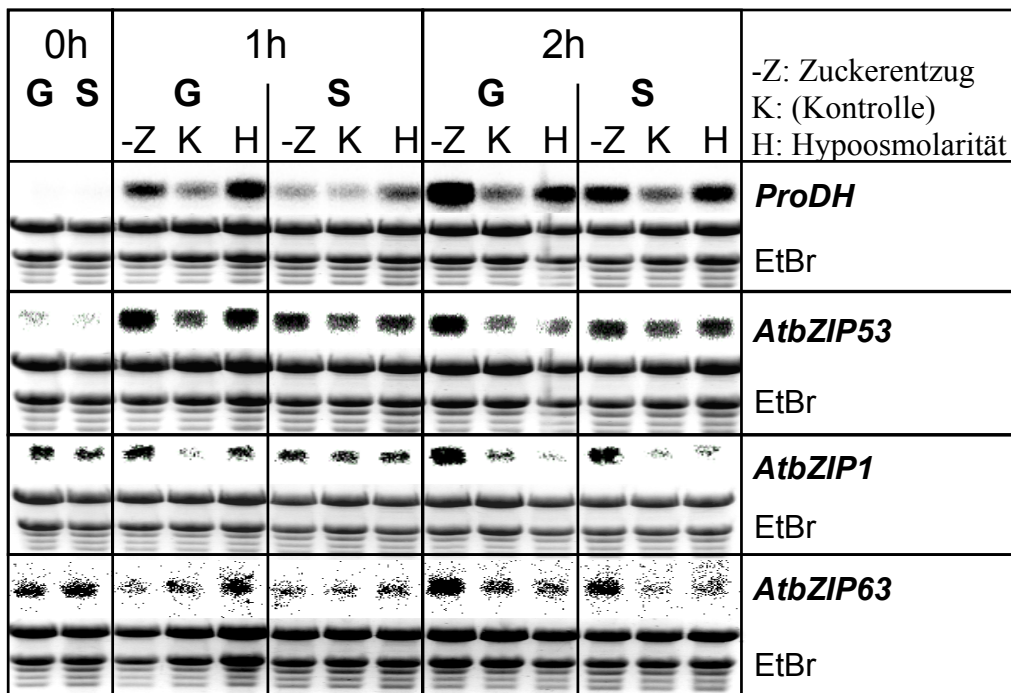
**Abbildung 5.14: *AtbZIP53* und *AtbZIP1* regulieren die Expression der *ProDH*.** **A:** Induktion der *ProDH* in Wildtyp (Wt), *atbzip1* (1KO), *35S:AtbZIP1* (1Ox), *atbzip53* (53KO) und *35S:AtbZIP53* (53Ox) Pflanzen nach Hypoosmolaritäts-Behandlung. Die Pflanzen wurden in Sterilkultur auf MS Medium mit 2% Saccharose angezogen und für eine Stunde in destilliertes Wasser transferiert. In Northern Analysen sieht man die von Satoh *et al.* beschriebene Induktion. Bei den Null Stunden Werten (0h) sieht man eine konstitutive Expression der *ProDH* in den beiden Überexpressionslinien, im Vergleich der 1 Stundenwerte (1h) eine schwächere Induktion der *ProDH* in den beiden Mutanten. Die Resultate wurden mehrfach reproduziert. EtBr: Etidiumbromid-Färbung der verwendeten RNA-Gele zum Nachweis gleichmäßiger Beladung. **B:** *AtbZIP1* und *AtbZIP53* werden nach Hypoosmolaritäts-Behandlung innerhalb einer Stunde induziert. Wildtyppflanzen wurden in Sterilkultur auf MS Medium mit 0,5% Saccharose angezogen (0h) und für eine Stunde in destilliertes Wasser transferiert (1h). In Northern-Analysen zeigt sich parallel zur Induktion der *ProDH* auch eine Induktion von *AtbZIP1* und *AtbZIP53*. Die Resultate wurden mehrfach reproduziert.

unter diesen Bedingungen ebenfalls induziert und kommen somit als Aktivatoren der *ProDH* nach Hypoosmolaritäts-Induktion in Frage (Abbildung 5.14). Die Induktion der *ProDH* durch Hypoosmolarität ist in *atbzip1* bzw. *atbzip53* Mutanten gegenüber Wildtyp-Pflanzen reduziert, was ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung dieser Faktoren an der Induktion ist.

#### 5.4.2 *AtbZIP1*, 53, 9, 63 und die *ProDH* werden durch Zuckermangel, *AtbZIP53* und die *ProDH* auch durch Hypoosmolarität induziert

Bei der von Nakashima *et al.* (1998) beschriebenen Hypoosmolaritätsbehandlung werden die Pflanzen nicht nur hypoosmolarem Stress ausgesetzt, ihnen wird auch der zuvor aus dem Medium verfügbare Zucker entzogen. Daher ist zu klären, ob die gesehenen Effekte wirklich auf der Änderung der Osmolarität beruhen, oder ob sie auf die Zuckerverarmung zurückzuführen sind. Dazu wurden Pflanzen in Sterilkultur auf MS-Medium angezogen, das neben Zucker auch PEG1000 als Osmotikum enthielt. Dadurch war es möglich, Hypoosmolarität (durch Transfer in entsprechendes Medium ohne PEG) von der Zuckerverarmung (durch Transfer in equimolares Medium ohne

Zucker) zu trennen. Als Zucker wurden sowohl Glukose als auch Saccharose verwendet. Da die Translation von *AtbZIP1* und *AtbZIP53* durch Saccharose, aber nicht durch Glukose reguliert wird (Anika Wiese, persönliche Mitteilung), war es interessant, ob eine Unterscheidung zwischen Glukose und Saccharose auch auf Transkriptionsebene stattfindet. Die Regulation der Gruppe C Heterodimerisierungspartner *AtbZIP9*, *10*, *25* und *63* wurde ebenfalls untersucht. Zunächst ist zu erkennen, dass *AtbZIP53* und die *ProDH* ähnlich reguliert werden (Abbildung 5.15). Beide Gene zeigen eine Induktion sowohl durch Hypoosmolarität als auch durch Zuckermangel, sind aber auch im Kontrollmedium induziert. Da die Medien, in welche die Pflanzen transferiert wurden, im Gegensatz zu dem Anzuchtmedium der Agar fehlt, haben sie alle eine niedrigere Osmolarität als das Anzuchtmedium, sodass es in allen Proben zu einer hypoosmolaren Induktion gekommen ist. Da jedoch die Induktion in dem Medium ohne Zucker (-Z) sowie in dem Medium mit niedriger Osmolarität (H) stärker ist als in dem Kontrollmedium, ist anzunehmen, dass *AtbZIP53*



**Abbildung 5.15: Northern Analysen zur Differenzierung zwischen einer Induktion durch Hypoosmolarität oder durch Zuckerverarmung.** In der ersten Zeile über den Northern ist der Zeitpunkt der Probennahme angegeben, in der zweiten Zeile, ob die Anzucht auf MS-Medium mit 70,8 mM PEG1000 und entweder 29,2 mM Glukose (G) oder 29,2 mM Saccharose (S) erfolgte. In der dritten Zeile ist angegeben ob die Induktion mit 100mM PEG1000 (-Z; weniger Zucker, gleiche Osmolarität), einer dem Anzuchtmedium entsprechenden Kontrolle (K; 70,8mM PEG1000 und 29,2 mM des jeweiligen Zuckers), oder 29,2mM Glukose bzw. Saccharose (H; Hypoosmolarität bei gleichbleibender Zuckerkonzentration) erfolgte. EtBr: Etidiumbromid-Färbung der verwendeten RNA-Gele zum Nachweis gleichmäßiger Beladung.

und die *ProDH* sowohl durch Zuckermangel als auch durch Hypoosmolarität induziert werden.

Für *AtbZIP1* und *AtbZIP63* ist zu erkennen, dass der Transfer von auf Glukose oder Saccharose gewachsenen Pflanzen in Medium ohne Zucker, aber mit hoher Osmolarität, nach zwei Stunden zu einer deutlichen Induktion führt, während der Transfer in die beiden zuckerhaltigen Lösungen mit vergleichbarer oder niedrigerer Osmolarität sogar zu einer Repression führt (Abbildung 5.15). Dies zeigt, dass eine Induktion der Transkription von *AtbZIP1* und *63* durch Zuckerverarmung, nicht durch Hypoosmolarität erfolgt. Dass in der Kontroll- und der Zuckerlösung sogar eine Repression zu sehen ist, mag darauf zurückzuführen sein, dass in Anzuchtmedium schon ein Teil des Zuckers verbraucht war, wodurch der Transfer in frisches 2MS Medium bzw. 29,2mM Zucker ein plus an Zucker bedeutet.

Die Expression von *AtbZIP9*, *AtbZIP25* und *AtbZIP10* unter den getesteten Bedingungen wurde ebenfalls durch Northern analysiert. *AtbZIP9* und *AtbZIP25* zeigten jedoch keine Regulation durch Zucker oder Hypoosmolarität, während für *AtbZIP10* in keiner der Proben ein Transkript zu detektieren war.

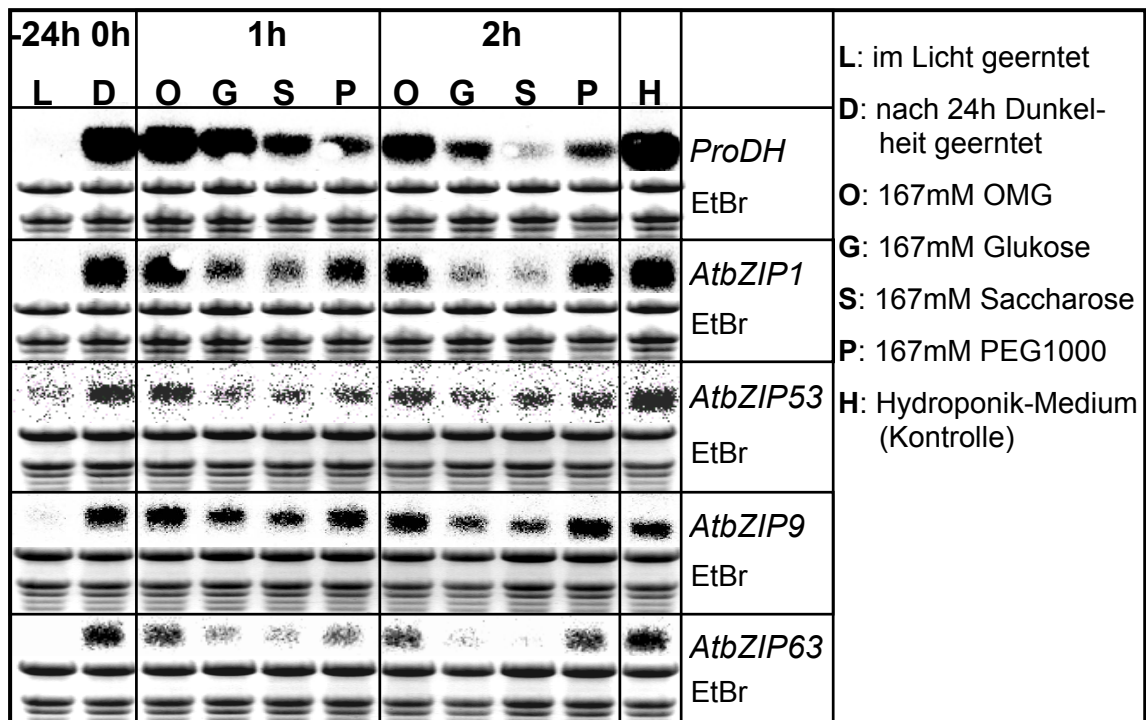
#### **5.4.3 Eine Dunkel-induzierte Expression von *ProDH*, *AtbZIP1*, *AtbZIP53*, *AtbZIP9* und *AtbZIP63* wird durch Zucker reprimiert.**

Im Gegenzug zur gezeigten Induktion durch Zuckermangel sollte getestet werden, ob die Transkription von AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 sowie die Transkription der *ProDH* auch durch Zucker reprimiert werden kann. Dazu wurden drei Wochen alte, in Hydroponik angezogene Pflanzen für 24 Stunden dunkel gestellt, um sie an Zuckern zu verarmen. Sowohl die *ProDH* als auch *AtbZIP1*, *53*, *9* und *63* werden deutlich durch Dunkelheit induziert. Diese Induktionen könnten direkt auf die Abnahme der Zuckerkonzentration in den Blättern während der Dunkelheit zurückzuführen sein (Fujiki *et al.*, 2001).

Die Pflanzen wurden anschließend in Hydroponikmedium mit 167mM 3-orthomethylglukose (3-OMG), Glukose, Saccharose oder PEG1000 transferiert und dabei weiter im Dunkeln gehalten. 3-OMG ist ein Glukose-Derivat, das von der Zelle aufgenommen wird, aber nicht zur Aktivierung des Hexokinase1 (HXK1) -abhängigen Zuckersignalwegs führt (Cortes *et al.*, 2003). *AtbZIP1*, *AtbZIP63* und *AtbZIP9* werden

spezifisch durch Zucker, nicht aber durch Hyperosmolarität, reprimiert. Da 3-OMG nicht zu einer Repression führt, scheint die Glukose-vermittelte Repression über einen HXK1-abhängigen Signalweg stattfindet (Abbildung 5.16).

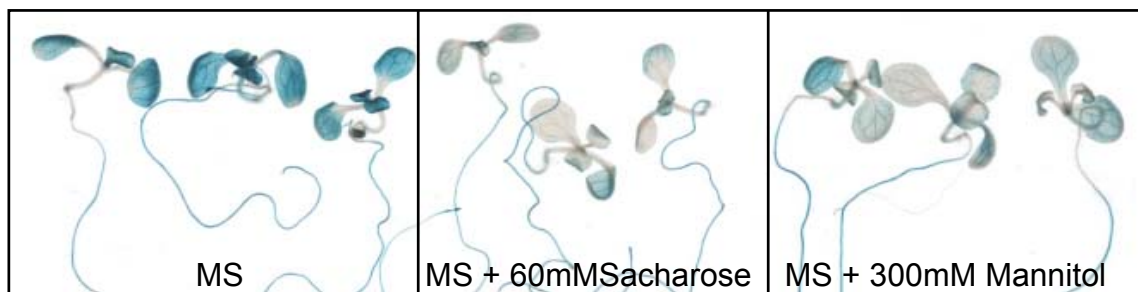
*AtbZIP53* und die *ProDH* hingegen werden auch durch 167mM PEG, das heißt durch Hyperosmolarität, reprimiert. Die Repression der *ProDH* durch Saccharose ist jedoch stärker als die durch equimolare Glukose oder PEG-Lösungen, was auf einen zusätzlichen, Saccharose-spezifischen Repressionsmechanismus hindeutet, der additiv mit der osmotischen Repression arbeitet. Ein solcher Effekt ist für *AtbZIP53* nicht deutlich zu erkennen. 3-OMG zeigt trotz gleicher Konzentrationen einen schwächeren Effekt als Glukose. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass 3-OMG ebenso wie Glukose in die Zelle aufgenommen wird, dort aber nicht metabolisiert wird, sondern in der Vakuole akkumuliert (Cortes *et al.*, 2003). Dadurch steigt der osmotische Wert in der Zelle, und die Differenz zum Medium wird kleiner.



**Abbildung 5.16:** Northern-Analysen zeigen eine Repression von *AtbZIP1*, *9* und *63* durch Zucker und eine Repression von *AtbZIP53* und der *ProDH* durch Zucker oder Hyperosmolarität. Pflanzen wurden auf Netzen in hydroponischer Kultur (ohne Zucker) im Kurztag angezogen. 3 Stunden nach Beginn der Lichtphase wurde die erste Probe (L, -24h) geerntet, danach wurden die Pflanzen für 24 Stunden dunkel gestellt. Nach dem Ernten einer weiteren Probe (D, 0h) wurden die Pflanzen mit Netz in Gefäße mit Hydroponikmedium mit 167mM 3-Orthomethylglukose (O), Glukose (G), Saccharose (S) oder PEG1000 (P) transferiert und dabei weiter im Dunkeln gehalten. Nach 1 bzw. 2 Stunden wurden die Pflanzen mit Wurzeln geerntet. Als Kontrolle wurde ein Netz in Hydroponik Medium umgesetzt und nach 2 Stunden geerntet (H). EtBr: Etidiumbromid-Färbung der verwendeten RNA-Gele zum Nachweis gleichmäßiger Beladung.

#### 5.4.4 Die Induktion von *AtbZIP53* durch Hypoosmolarität findet vorwiegend in Blättern statt

Eine Induktion von *AtbZIP53* durch Hypoosmolarität konnte auch mit Hilfe von Promotor-GUS Fusionen gezeigt werden (Abbildung 5.17). Dazu wurden *Pro<sub>AtbZIP53</sub>:GUS* Pflanzen in Sterilkultur auf MS-Medium mit 2% Saccharose angezogen. Nach 8 Tagen wurden ganze Pflanzen in H<sub>2</sub>O, in MS Medium mit 2% Saccharose oder in MS Medium mit 300mM Mannitol transferiert und nach einer Inkubation über Nacht histochemisch gefärbt. Dabei zeigten die in Wasser transferierten Pflanzen eine deutliche Zunahme der GUS-Aktivität. Die Induktion findet dabei hauptsächlich in den Blättern statt, im Hypokotyl und in den Wurzeln waren keine deutlichen Unterschiede zu sehen. Bei den in Mannitol transferierten Pflanzen ist ebenfalls eine leichte Zunahme der GUS-Aktivität zu sehen, die auf die Abnahme der Saccharose-induzierten Repression der Translation zurückzuführen sein könnte. Der Versuch wurde zweimal unter der Verwendung von zwei unabhängigen *Pro<sub>AtbZIP53</sub>:GUS* Linien reproduziert.

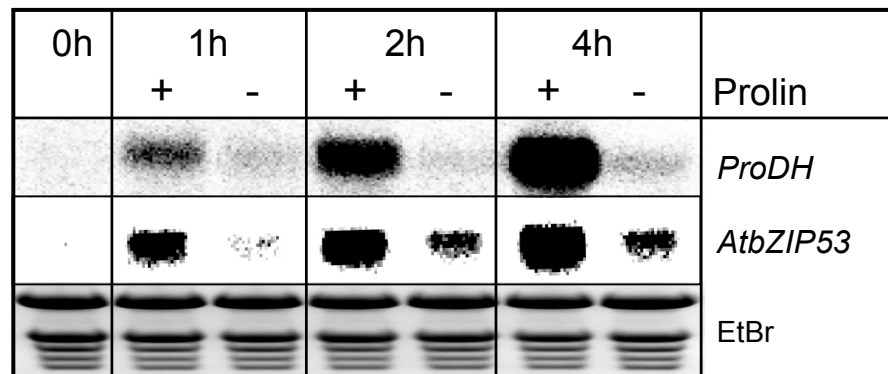


**Abbildung 5.17: *AtbZIP53* wird durch Hypoosmolarität induziert.** Pflanzen mit einer *Pro<sub>AtbZIP53</sub>:GUS* Fusion wurden für 8 Tage auf MS-Medium mit 60mM Saccharose angezogen und über Nacht in MS-Medium, MS-Medium mit 60mM Saccharose oder MS-Medium mit 300mM Mannitol inkubiert. Anschließend wurden sie mit 2mM X-Gluc / 1mM Hexacyanoferrate für 24 Stunden histochemisch gefärbt. Der Versuch wurde mit zwei unabhängigen *Pro<sub>AtbZIP53</sub>:GUS* Linien reproduziert.

#### 5.4.5 *AtbZIP53* wird durch Prolin induziert

Die *ProDH* wird neben Hypoosmolarität auch stark durch Prolin induziert (Nakashima *et al.*, 1998). Um zu überprüfen, ob *AtbZIP*-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 neben Osmolaritäts- und Zucker-Signalen auch Prolin-abhängige Signale vermitteln

könnten, wurde getestet, ob sie durch Prolin induziert werden können. Dazu wurden 2 Wochen alte Pflanzen, die in Sterilkultur auf MS Medium mit 2% Saccharose angezogen worden waren, mit Wurzel in flüssiges MS Medium mit 2% Saccharose und 100mM Prolin bzw. 100mM Mannitol umgesetzt. Mannitol diente dabei als osmotische Kontrolle. Nach 0, 1, 2 und 4 Stunden wurden Proben genommen, und die Expression von *AtbZIP1*, *53*, *9*, *63*, *25* und *10* in diesen Proben wurde in Northern Analysen getestet. *AtbZIP53* wird dabei sehr schnell stark induziert (Abbildung 5.18). Vergleicht man die Kinetik der Induktion von *AtbZIP53* mit der der *ProDH*, so scheint *AtbZIP53* früher induziert zu werden, was dafür spricht, dass die Prolin-abhängige Induktion der *ProDH* über *AtbZIP53* erfolgen könnte. Die Transkription von *AtbZIP1*, *9*, *63* und *25* wird nicht durch Prolin induziert (nicht gezeigt).



**Abbildung 5.18: Die Transkription von *AtbZIP53* wird durch Prolin induziert.** Zwei Wochen alte, in Sterilkultur auf MS-Medium mit 2% Saccharose angezogene ganze Pflanzen wurden in MS-Medium mit 100mM Prolin (+) oder MS-Medium mit 100mM Mannitol (-; Mannitol dient als osmotische Kontrolle) inkubiert. Anschließend wurde aus den ganzen Pflanzen RNA extrahiert und in Northern auf die Expression von der *ProDH* und von *AtbZIP1*, *53*, *9*, *63*, *25* und *10* analysiert. *AtbZIP1*, *9*, *63*, und *25* zeigten keine Unterschiede zwischen den mit Mannitol oder Prolin behandelten Proben, das Transkript von *AtbZIP10* war nicht nachzuweisen. EtBr: Etidiumbromid-Färbung der verwendeten RNA-Gele zum Nachweis gleichmäßiger Beladung.

#### 5.4.6 Die *ProDH* ist ein direktes Zielgen von *AtbZIP53*

Um zu überprüfen, ob *AtbZIP53* direkt an den *ProDH*-Promotor bindet, oder ob die in Protoplasten- und Northern Analysen gesehenen Einflüsse indirekt sind, wurde eine Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) durchgeführt (Johnson *et al.*, 2001). Diese Methode war im Labor zuvor nur für Tabak etabliert, und musste für *Arabidopsis* modifiziert werden. Für die ChIP Experimente wurden Pflanzen mit einer ektopischen Expression eines HA-markierten *AtbZIP53* verwendet. Als Kontrolle dienten Wildtyp-Pflanzen. Zunächst wurden DNA-bindende Proteine und DNA durch eine Formaldehydbehandlung quervernetzt. Hierfür wurde ein 50mM Kaliumphosphatpuffer mit 1% Formaldehyd eingesetzt, wie er für Tabak bereits erfolgreich verwendet wurde. Für die folgende Kernpräparation wurden verschiedene Protokolle getestet, und ihr Erfolg kontrolliert, in dem die mit Propidiumiodid gefärbten Kerne unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet wurden. Ein Percoll-basiertes Protokoll (Dr. Corinna Thurow, persönliche Mitteilung) erwies sich als am besten geeignet.

Das mit den Kernen isolierte Chromatin wurde anschließend durch Ultraschall fragmentiert. Dabei wurde empirisch eine Dauer von vier mal 12 Sekunden für die Ultraschallbehandlung ermittelt, die eine ideale Fragmentgröße von etwa 500 Basenpaaren lieferte. Um die Effizienz der Quervernetzung sowie der Fragmentierung zu überprüfen, wurde für ein Aliquot des fragmentierten Chromatins die Quervernetzung rückgängig gemacht, und dieses zusammen mit einem zweiten Aliquot in einem Agarose-Gel aufgetrennt (Abbildung 5.19 B). Das langsamere Laufverhalten der quervernetzten Proben ist auf die an die DNA gebundenen Proteine zurückzuführen und bestätigt den Erfolg der Vernetzungsreaktion.

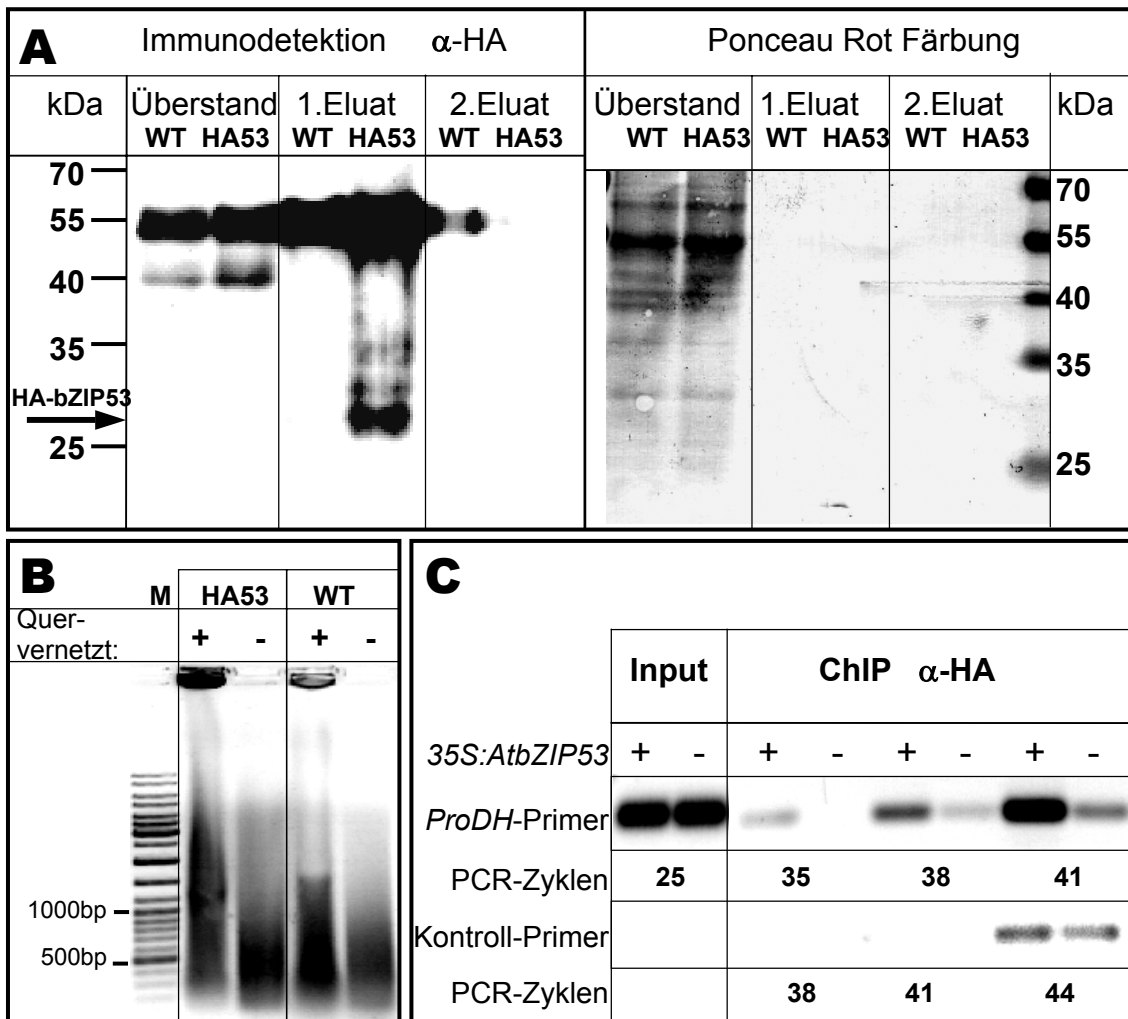
Anschließend wurde mit den quervernetzten Chromatin-Fragmenten und einem HA-Antikörper eine Immunopräzipitation (IP) durchgeführt. Um sicherzustellen, dass gleiche Mengen von Chromatin eingesetzt wurden, wurde für einen Teil des Chromatins die Quervernetzung rückgängig gemacht, und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt. Für die Immunopräzipitation wurden dann die DNA-Konzentrationen der HA-*AtbZIP53*-Probe und der Wildtyp-Kontrolle aneinander angepasst. Die gleiche Konzentration von *ProDH*-Promotor Fragmenten wurde über eine PCR mit für den *ProDH*-Promotor spezifischen Primern, die zu beiden Seiten des von Satoh *et al.* beschriebenen *cis*-Elements binden, bestätigt (Abbildung 5.19 C, Input).

Die Anreicherung des HA-markierten AtbZIP53 Proteins durch die IP wurde durch eine Western Analyse bestätigt (Abbildung 5.19 A). Während im Überstand kein HA-markiertes AtbZIP53 Protein detektiert wurde, war es im Eluat deutlich nachzuweisen. Eine Ponceau Rot Färbung des für den Western verwendeten Filters zeigte, dass sich der Großteil des Gesamtproteins im Überstand befand, während über die Färbung im Eluat kein Protein nachzuweisen ist. Verschiedene Protokolle schlagen für die Immunopräzipitation zwei Elutionschritte vor. Da die Western Analysen jedoch kein HA-markiertes AtbZIP53 Protein im zweiten Eluat zeigen, wurde im folgenden nur das erste Eluat verwendet.

Bindet das HA-AtbZIP53 Protein in der Pflanze an den *ProDH*-Promotor, so werden DNA-Fragmente aus dem Promotor mit präzipitiert und so angereichert. Über eine PCR mit für den *ProDH*-Promotor spezifischen Primern konnte eine deutliche Anreicherung von Fragmenten der Promotor-Region detektiert werden, was belegt, dass die *ProDH* ein direktes Zielgen von AtbZIP53 ist. Als Kontrolle wurden Wildtyppflanzen ohne HA-markiertes AtbZIP53 Protein parallel mitbehandelt.

Um zu überprüfen, ob der Hintergrund an unspezifische präzipitierter DNA in den ChIP-Proben der Pflanzen mit einer ektopischen Expression des HA-markierten AtbZIP53 mit dem in den ChIP-Proben der Wildtyp-Pflanzen vergleichbar ist, wurde eine PCR mit den Kontrollprimern cwINV2for und cwINV2rev durchgeführt, die ein Stück aus dem Kodierbereich eines Genes amplifizieren, dass nicht von AtbZIP53 gebunden wird. Bei dieser PCR konnte auch ein Produkt amplifiziert werden, was einen Hintergrund an unspezifische präzipitierter DNA belegt. Jedoch ist dieser Hintergrund in beiden Proben vergleichbar.





**Abbildung 5.19: ChIP-Analysen bestätigen die Bindung von AtbZIP53 an den *ProDH*-Promotor.** 4 Wochen alte auf Erde angezogene Wildtyp und *35S:HA-AtbZIP53* Pflanzen wurden für 30 min mit Formaldehyd behandelt, um Protein und DNA quervernetzen. **A:** Aus diesen Pflanzen wurde das Chromatin isoliert und dieses durch Ultraschallbehandlung fragmentiert, so dass DNA-Bruchstücke von durchschnittlich 500bp Länge entstanden. In einem Agarose-Gel zeigt die vernetzten DNA-Probe in Vergleich zu der Probe bei der die Vernetzung rückgängig gemacht wurde eine Retardation, die die Effizienz der Vernetzung anzeigt. **B:** Mit den vernetzten DNA-Fragmente wurde eine Co-Immunopräzipitation durchgeführt. Der Erfolg der Immunopräzipitation wurde im Western überprüft. **C:** Für die präzipitierten Chromatin-Fragmente wurde die Vernetzung aufgehoben, und die Menge des enthaltenen *ProDH*-Promotors über eine quantitative PCR mit den Primern *PDHpromfor* und *PDHpromrev* ermittelt. Der Abgleich des DNA-Hintergrundes erfolgt über eine quantitative PCR mit den Kontrollprimern *AtcwINV2gstFOR* und *AtcwINV2gstREV*. Input: Für die Immunopräzipitation eingesetztes Chromatin.

#### **5.4.7 Heterodimere von AtbZIP53 mit Gruppe C AtbZIP-Transkriptionsfaktoren führen zu einer synergistischen Aktivierung der *ProDH***

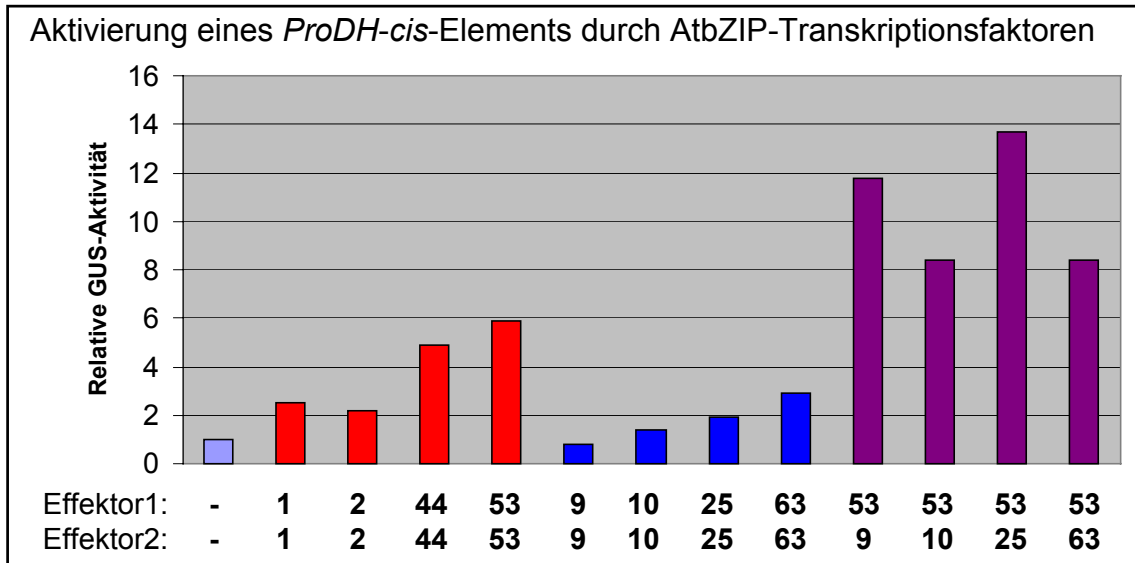
Im folgenden wurde der Einfluss der Heterodimerisierung von AtbZIP53 mit Gruppe C AtbZIP Faktoren auf die Expression der ProDH untersucht. Diese Analysen wurden in Mesophyll-Protoplasten an dem von (Sato *et al.*, 2002, siehe Einleitung) identifizierten *cis*-Element *ACTCAT* durchgeführt.

9µg eines Reporterplasmid (pBT10-2xProDH-GUS), welches dieses *cis*-Element 2-fach vor ein GUS-Reportergen fusioniert enthielt, wurde zusammen mit jeweils 14 µg von den Effektor-Plasmiden 1 und 2 (pHBTL-HAGW), welche die AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 unter Kontrolle des 35S-Promotors exprimieren, transient in *Arabidopsis* Mesophyll-Protoplasten transformiert.

Werden nur einzelne AtbZIP-Transkriptionsfaktoren in den Mesophyll-Protoplasten exprimiert, zeigt vor allem die Expression von *AtbZIP53* eine deutliche Aktivierung des Reportergens, während diese durch die Expression von einzelnen Gruppe C AtbZIP-Transkriptionsfaktoren kaum gesteigert wird (Abbildung 5.20). Bei der Betrachtung dieser Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass es in Mesophyll-Protoplasten auch zu einer endogene Expression von AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 kommt. Die Aktivierung, die bei der Transformation nur mit *AtbZIP53* als Effektor zu sehen ist, kann also durchaus auf Heterodimeren von AtbZIP53 mit endogenen Gruppe C AtbZIP-Transkriptionsfaktoren beruhen.

Wird, gegenüber der Expression von *AtbZIP53* alleine, die Hälfte des Effektors durch den für die Expression von z.B. *AtbZIP25* ersetzt, würde man eine Reporter-gen-Aktivität zwischen der bei der alleinigen Expression der beiden AtbZIP-Transkriptionsfaktoren erhaltenen erwarten. Diese fällt jedoch deutlich stärker aus, was einen synergistischen Effekt der Heterodimerisierung auf die Aktivierung des *ACTCAT* Motivs belegt.

Detailliertere Analysen der Regulation dieses Motivs durch verschiedenen Heterodimere sowie eine genauere Analyse des *cis*-Elements durch verschiedene Mutationen werden von Andrea Ehlert im Rahmen ihrer Dissertation durchgeführt. Dabei konnten die synergistischen Effekte bei der Aktivierung durch C/S1 Heterodimere bestätigt werden (Weltmeier *et al.*, zur Veröffentlichung eingereicht).



**Abbildung 5.20:** AtbZIP53 enthaltende Heterodimere führen zu einer stärkeren durch das *ACTCAT*-Motiv vermittelten Expression als einzelne C/S1 AtbZIP-Transkriptionsfaktoren. Gezeigt ist die Aktivität eines GUS-Reportergens in transient transformierten *Arabidopsis* Mesophyll-Protoplasten. Das Reporter gen steht unter der Kontrolle eines doppelten *ACTCAT*-Motivs aus dem *ProDH*-Promotor. Die Zahlen unter dem Diagramm (Effektor1 und Effektor2) geben an, welcher AtbZIP-Transkriptionsfaktor von den mit dem Reporterplasmid kotransformierten Effektorplasmiden exprimiert wurde, der Strich steht für ein leeres Effektorplasmid. Von den Effektorplasmiden wurden jeweils gleiche Mengen (14 µg) eingesetzt, von dem Reporterplasmid 9µg.

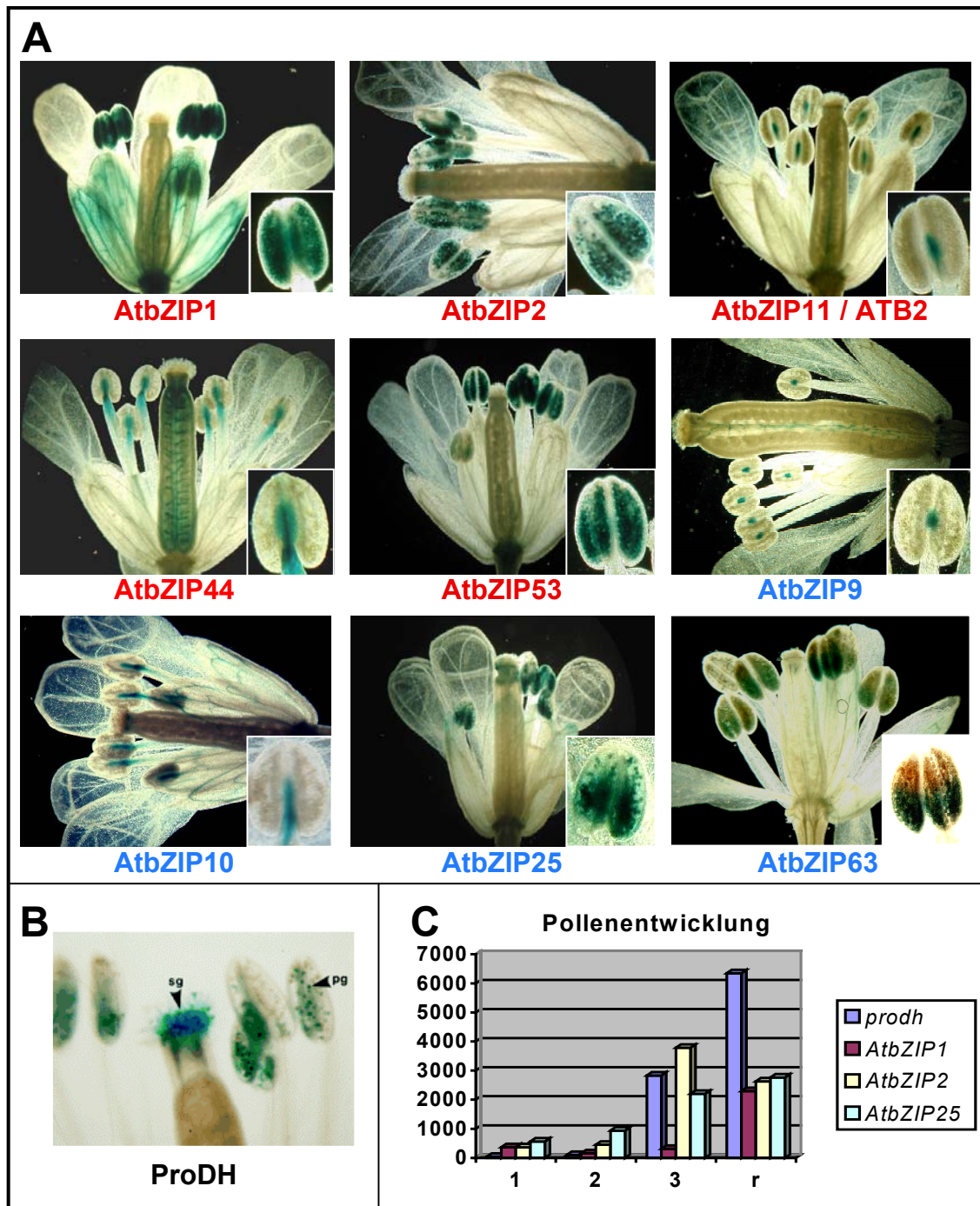
#### 5.4.8 Einzelne AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 werden wie die *ProDH* stark in Pollen exprimiert

Die *ProDH* wird nicht nur durch Osmolarität reguliert, sondern zeigt auch gewebespezifische Expressionsmuster. So konnten Verbruggen *et al.* (1996) eine blütenspezifische Expression der *ProDH* zeigen, die von Nakashima *et al.* (1998) mit Hilfe von Promotor-GUS Fusionen auf die Pollen und in Samen eingegrenzt werden konnte. Verschiedene Publikationen zeigen hohe Konzentrationen von Prolin in reproduktiven Geweben wie Samen und Pollen (Chiang und Dandekar, 1995; Zhang und Croes, 1983). Die starke Expression der *ProDH* mag also auf die Induktion durch die hohe Prolin-Konzentration zurückzuführen sein. Jedoch wird für diese Gewebe auch über eine Funktion von Prolin als Energiequelle spekuliert (Nakashima *et al.*, 1998).

Für S1 bZIP-Transkriptionsfaktoren aus Tabak, *BZI3/tbzF* und *BZI4*, wurde ebenfalls eine spezifische Expression in Blüten gezeigt, und es gibt Hinweise auf eine Funktion

von BZI-1 und BZI-4 in der Pollen-Entwicklung (Strathmann *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2002). Für *AtbZIP11* konnte durch Promotor-GUS Fusionen eine spezifische Expression im Konnektiv gezeigt werden (Rook *et al.*, 1998).

Daher wurde im folgenden die Expression der AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen S1 und C in Blüten mit Hilfe der Promotor-GUS Linien untersucht. Dazu wurden die Pflanzen bis zu Blüte auf Erde angezogen, und komplette Blütenstände mit 2mM X-Gluc / 2mM Kalium-Hexacyanoferrat für 24 Stunden gefärbt. Vergleicht man Blüten in einem Entwicklungsstadium etwa zur Zeit der Pollination miteinander, so lassen sich hier deutlich zwei Gruppen voneinander unterscheiden, die unterschiedliche Expressionsmuster in den Antheren zeigen: GUS-Fusionen mit den Promotoren von *AtbZIP9*, *11*, *44* und *10* zeigten eine GUS-Aktivität, die auf das Konnektiv beschränkt war, während solche mit den Promotoren von *AtbZIP1*, *2*, *53*, *25* und *63* eine deutliche GUS-Aktivität in den Pollen zeigten (Abbildung 5.21). Während die Expression im Konnektiv sehr stabil und in vielen GUS-Färbungen nachzuweisen wahr, unterlag die Pollen-spezifische GUS-Aktivität insbesondere von *AtbZIP53* und *63* Promotor-GUS Fusionen Schwankungen, sodass oft an einer Blüte ein Teil der Antheren Blau gefärbt war, ein anderer nicht, oder dass nur ein Teil der Staubbeutel eine Blaufärbung zeigte. In den von (Nakashima *et al.*, 1998) für die *ProDH* veröffentlichten GUS-Färbungen ist ebenfalls eine pollenspezifische Expression zu sehen. Es liegt daher nahe zu vermuten, dass *AtbZIP1*, *2*, *53*, *25* oder *63* auch an der Regulation der Pollen-spezifischen Expression der *ProDH* beteiligt sind, während *AtbZIP9*, *11*, *44* und *10* möglicherweise andere Funktionen in der Pollenentwicklung übernehmen. Eine Analyse der zur Expression in Pollen erhältlichen Mikroarray-Daten zeigt ebenfalls eine pollenspezifische Koexpression. Eine ähnliche Koexpression von der *ProDH* mit AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen S1 und C findet sich auch in Samen. Auf diese wird in Kapitel 5.8 eingegangen.



**Abbildung 5.21: A: Gruppe C/S1 AtbZIP-Transkriptionsfaktoren zeigen zwei distinkte Expressionsmuster in Antheren.** Von 8 Wochen alten, auf Erde im Langtag angezogenen Pflanzen mit Promotor-GUS-Fusionen der verschiedenen AtbZIP-Transkriptionsfaktoren wurden sechs Stunden nach Beginn der Lichtphase Blüten geerntet und 24 Stunden mit 1 mM X-Gluc / 2 mM Kalium-Hexacyanoferrat histochemisch gefärbt. **B: Histochemische Färbung einer  $Pro_{ProDH}:GUS$  Pflanze** (aus Nakashima *et al.* (1998)). **C: Pollen-spezifische Expression von AtbZIP1, 2, 25 und der ProDH** in verschiedenen Entwicklungsstadien der Pollen. 1: Einzell-Stadium; 2: Zweikern-Stadium; 3: Zweikern-Stadium; r: reifes Pollenkorn. Die Werte stammen aus der Genevestigator Datenbank, die Signalstärke der ProDH wurde zugunsten der besseren Darstellbarkeit jeweils um den Faktor 10 reduziert.

## **5.5 Eine Regulation von AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C/S1 durch Zucker lässt sich durch Transkriptom-analyse-Daten und Promotor-GUS Fusionen bestätigen**

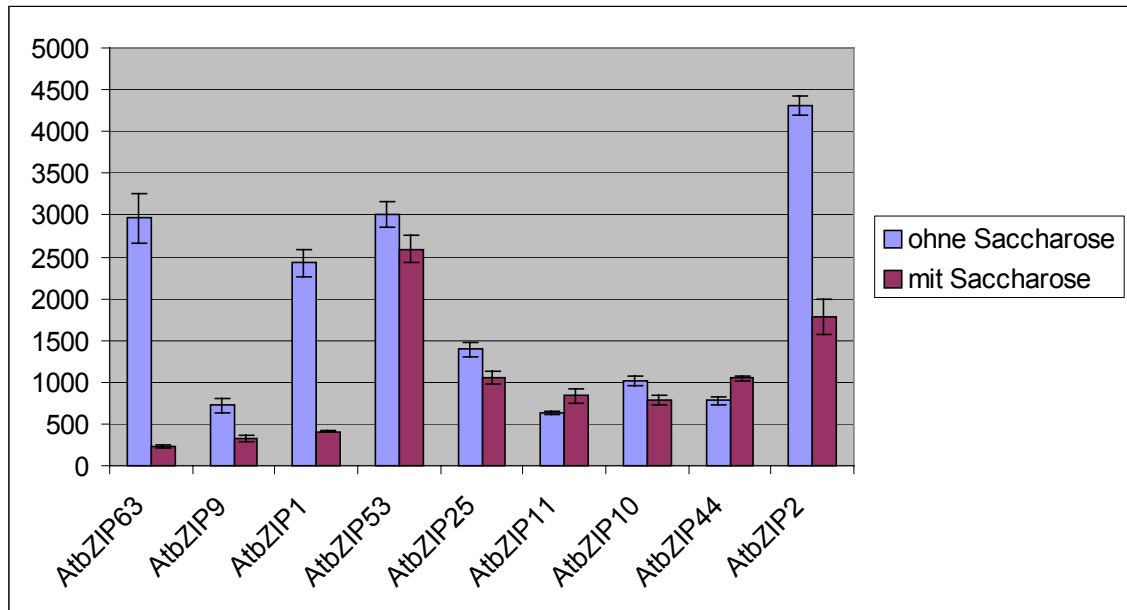
In den vorangegangenen Kapiteln wurde gezeigt, dass die *ProDH* sowie die Mehrheit der Gruppe AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 durch Zucker reprimiert und durch Dunkelheit induziert werden. Dunkelheit führt zu einer Abnahme der Zuckerkonzentration in den Blättern (Gibon *et al.*, 2004), und viele der bekannten dunkelinduzierten Gene werden durch Zucker reprimiert (Fujiki *et al.*, 2000; Fujiki *et al.*, 2001), sodass diese beiden Prozesse eng miteinander verwandt sind.

Um zusätzliche Daten zu erhalten, wurde nach veröffentlichten Transkriptomanalysen zur Zuckerregulation gesucht und die Regulation aller AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 in diesen Expressionsprofilen betrachtet.

### **5.5.1 Transkriptionelle Regulation von AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 durch Saccharose**

In der NASCArray Datenbank (Craigon *et al.*, 2004) sind Daten aus einem Experiment veröffentlicht, in dem 3 Tage alte Keimlinge aus Sterilkultur auf MS-Medium mit oder ohne Saccharose verglichen wurden (Karen Greville und Mark Hooks, 2004).

In diesem Experiment wird in Abwesenheit von Saccharose die Expression von *AtbZIP63* um mehr als das Zehnfache, die von *AtbZIP1* um mehr als das Fünffache, und die von *AtbZIP9* und *AtbZIP2* um das Zwei- bis Dreifache induziert. Auf die Expression der anderen AtbZIPs sind hier keine signifikanten Effekte zu sehen (Abbildung 5.22). In zwei weiteren, ähnlichen Experimenten (Malcolm Campbell und AtGenExpress, 2005), wo 7 bzw. 8 Tage alte Pflanzen aus Sterilkultur auf MS-Medium mit oder ohne Saccharose getestet wurden, wird die Repression von *AtbZIP63*, *9* und *1* durch Saccharose bestätigt, allerdings sind die Effekte zu dieser Zeit nicht mehr so deutlich. Dafür findet sich nun eine leichte Induktion von *AtbZIP2* und *AtbZIP11* (Daten nicht gezeigt).



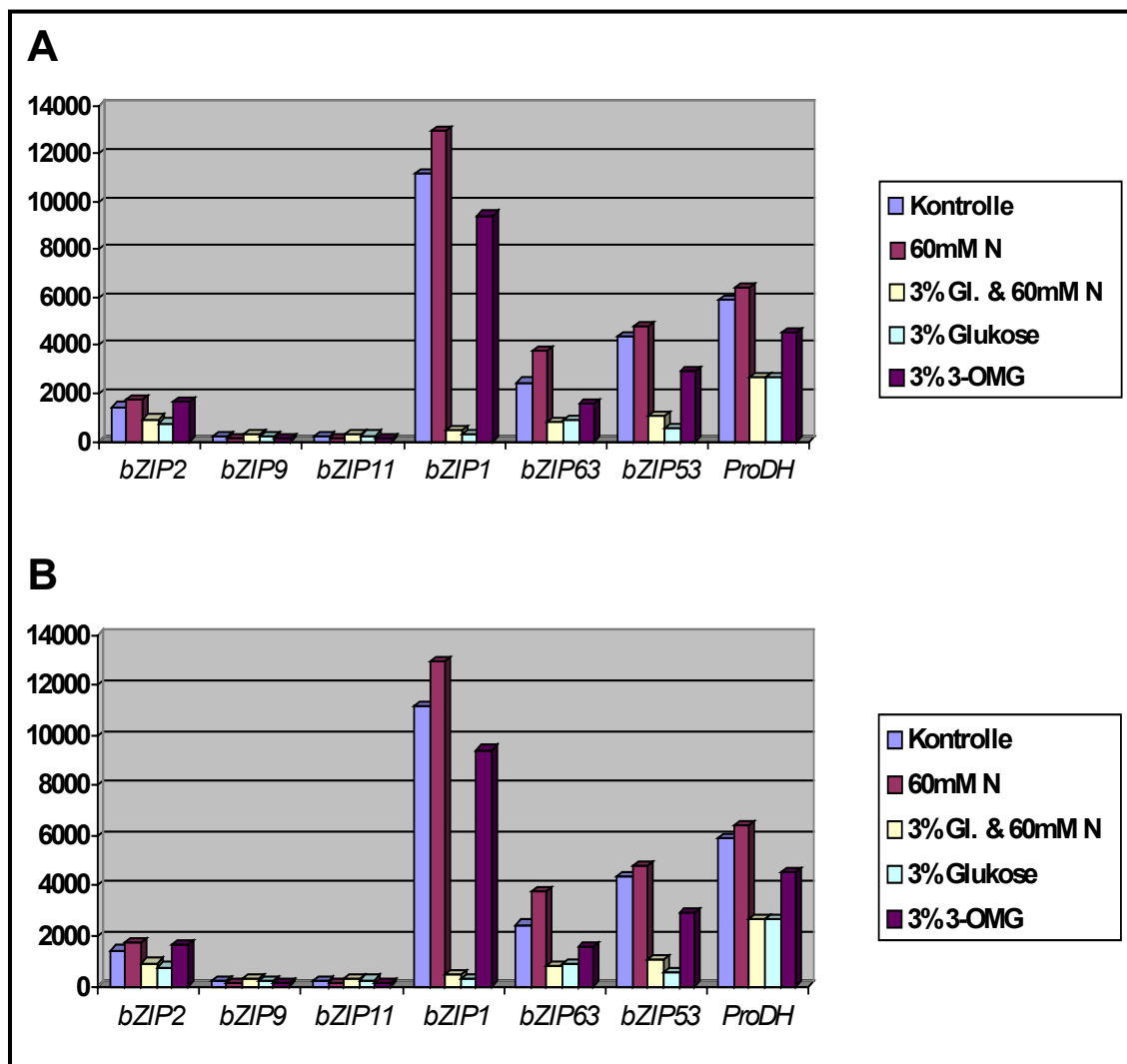
**Abbildung 5.22: AtbZIP1 und AtbZIP63 werden durch Saccharose reprimiert.** Expression der AtbZIP-Transkriptionsfaktoren des Gruppen C und S1 in drei Tage alte Keimlingen, die auf MS-Medium mit oder ohne Saccharose angezogen wurden (Karen Greville und Mark Hooks, 2004). Auf der X-Achse sind die Mittelwerte mit Standardabweichung von in 3 biologischen Replikaten gemessenen Signalstärken wiedergegeben.

Ein anderer experimenteller Ansatz wurde von Contento *et al.* (2004) veröffentlicht. Hier wurden *Arabidopsis* Zellkulturen vor und nach Transfer in ein Medium, in dem Saccharose durch PEG ersetzt wurde (um osmotische Effekte auszuschließen), miteinander verglichen. Innerhalb von 24 Stunden wurden auch hier sowohl *AtbZIP1* (14fach) als auch *AtbZIP63* (8fach) deutlich induziert.

### 5.5.2 Transkriptionelle Regulation von AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 durch Glukose

Die Regulation durch Glukose wurde ebenfalls in verschiedenen Experimenten untersucht. In einem der interessantesten dieser Experimente wurden Pflanzen in Hydroponik-Medium mit 167mM Glukose bzw. 167mM 3-ortho-Methylglukose (3-OMG) transferiert (Price *et al.*, 2004). Zusätzlich wurde hier der Einfluss der Verfügbarkeit von Stickstoff untersucht, und eine Wiederholung des Experiments nach Vorbehandlung mit Cycloheximid durchgeführt. Cycloheximid inhibiert die Proteinsynthese, so dass sich hier transkriptionelle Regulationen, die die Neusynthese

von Proteinen erfordern, von solchen, bei denen dieses nicht der Fall ist, unterscheiden lassen. Parallel zur Glukose-Behandlung wurden Pflanzen auch mit 3-OMG behandelt. 3-OMG ist ein Glukose-Analogon, welches wie Glukose in die Zelle aufgenommen wird, aber nicht zur Aktivierung des Hexokinase-Signalweges führt. Es ermöglicht die Unterscheidung zwischen Hexokinase-abhängigen und Hexokinase-unabhängigen Signalen (Xiao *et al.*, 2000). Die Glukose-Behandlung führt zu einer deutlichen Repression von *AtbZIP1* und *AtbZIP63* so wie einer leichten Repression von *AtbZIP2*, 53 und 9, für *AtbZIP11* hingegen sieht man eine Induktion durch Glukose.



**Abbildung 5.23: Die Transkription von AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 wird durch Glukose reguliert.** A: *Arabidopsis* Wildtyp Pflanzen wurden für 5 Tage in flüssigem MS-Medium mit 58,4 mM Saccharose angezogen und dann für 24 Stunden im Dunkeln in MS-Medium ohne Saccharose gehalten, um sie an Zuckern zu verarmen. Anschließend wurden die Pflanzen bei Dunkelheit für 3 Stunden in Wasser (Kontrolle), 20mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> und 20mM KNO<sub>3</sub> (60mM N), 3% Glukose mit 20mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> und 20mM KNO<sub>3</sub> (3% Gl. & 60mM N), 3% Glukose oder 3% OMG transferiert. B: Gleiche Durchführung wie unter A, jedoch wurden die Pflanzen vor dem Transfer in die verschiedenen Lösungen mit Cycloheximid behandelt. Die Diagramme beruhen auf Mikroarraydaten von (Price *et al.*, 2004), *AtbZIP44*, 10 und 25 zeigten in dem Experiment keine signifikante Regulation.



Da die mit 3-OMG induzierten Proben diese Effekte nicht zeigen, findet die Repression/Induktion wahrscheinlich über einen Hexokinase-abhängigen Signalweg statt.

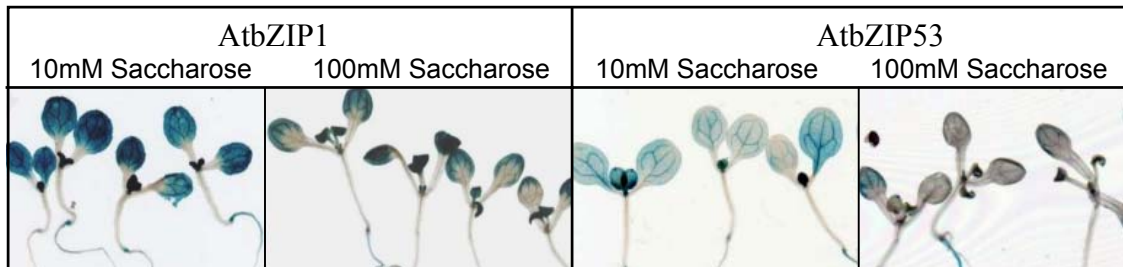
Das Experiment wurde nach Vorbehandlung mit Cycloheximid wiederholt, um herauszufinden, ob eine *de novo* Proteinsynthese notwendig für die gezeigten Regulationen ist. Die Repression von *AtbZIP1*, *2*, *53* und *63* wurden durch die Vorbehandlung mit Cycloheximid nicht beeinflusst, sodass hier ein sehr direkter Signalweg von Zucker zu ihrer Regulation vermutet werden kann. Eine Induktion von *AtbZIP11* hingegen fand nicht mehr statt, daher sind am Signalweg zur Induktion wohl Proteine beteiligt, die erst neu synthetisiert werden müssen. *AtbZIP9* war nach Vorbehandlung mit Cycloheximid *per se* nur sehr schwach exprimiert, sodass hier keine Aussage getroffen werden kann.

In einem in der Genevestigator-Datenbank verfügbaren Experiment (Dorthe Villadsen, 2004) finden sich vergleichbare Ergebnisse (nicht gezeigt).

### 5.5.3 Saccharose reprimiert die Translation von *AtbZIP1* und *AtbZIP53*

Rook *et al.* (1998) konnten zeigen, dass die Translation des S1 *AtbZIP*-Transkriptionsfaktors *AtbZIP11* spezifisch durch Saccharose reprimiert wird (SIRT: sucrose induced repression of translation). Dieser Mechanismus wird durch einen konservierten uORF vermittelt, der in den 5' untranslatierten Bereichen von allen 5 Mitgliedern der Gruppe S1 vorkommt (Siehe Einleitung, Abbildung 2.2). Daher wurde getestet, ob Saccharose einen vergleichbaren Einfluss auf die Translation von *AtbZIP1* und *AtbZIP53* hat. Hierzu wurden Pflanzen auf MS-Medium mit 10 oder 100mM Saccharose angezogen. Wie erwartet, zeigten die Pflanzen in Gegenwart höherer Saccharose-Konzentrationen eine reduzierte GUS-Aktivität (Abbildung 5.24). Für *AtbZIP1* wurde in Abbildung 5.22 im Gegensatz zu *AtbZIP53* unter vergleichbaren Bedingungen auch eine Repression of Transkriptionsebene gezeigt, sodass sich nicht ohne weiteres feststellen lässt, ob der hier gezeigte Effekt bei *AtbZIP1* wirklich auf den SIRT-Mechanismus zurückzuführen ist. Jedoch wurden hierzu von der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Sjef Smeekens (Universität Utrecht) detailliertere Analysen durchgeführt, und Sie konnten inzwischen bestätigen, dass alle 5 Mitglieder der Gruppe

S1 durch SIRT reguliert werden (persönliche Mitteilung). Daher ist anzunehmen, dass in Gegenwart hoher Saccharose-Konzentrationen das Vorhandensein von C/S1-Heterodimeren generell abnimmt.



**Abbildung 5.24: GUS-Färbungen zeigen eine Repression der Expression von AtbZIP1 und AtbZIP53 durch Saccharose.** Samen der AtbZIP1 und AtbZIP53 Promotor-GUS Linien wurden Gasphasensterilisiert und in Sterilkultur auf MS-Medium mit 10 bzw. 100 mM Saccharose angezogen. Nach 8 Tagen wurden die Pflanzen geerntet und 24 Stunden mit 1mM X-Gluc / 1mM Kalium-Hexacyanoferrat gefärbt.

## 5.6 Transkriptomanalyse einer 35S:AtbZIP53 Linie zur Identifizierung von Zielgenen

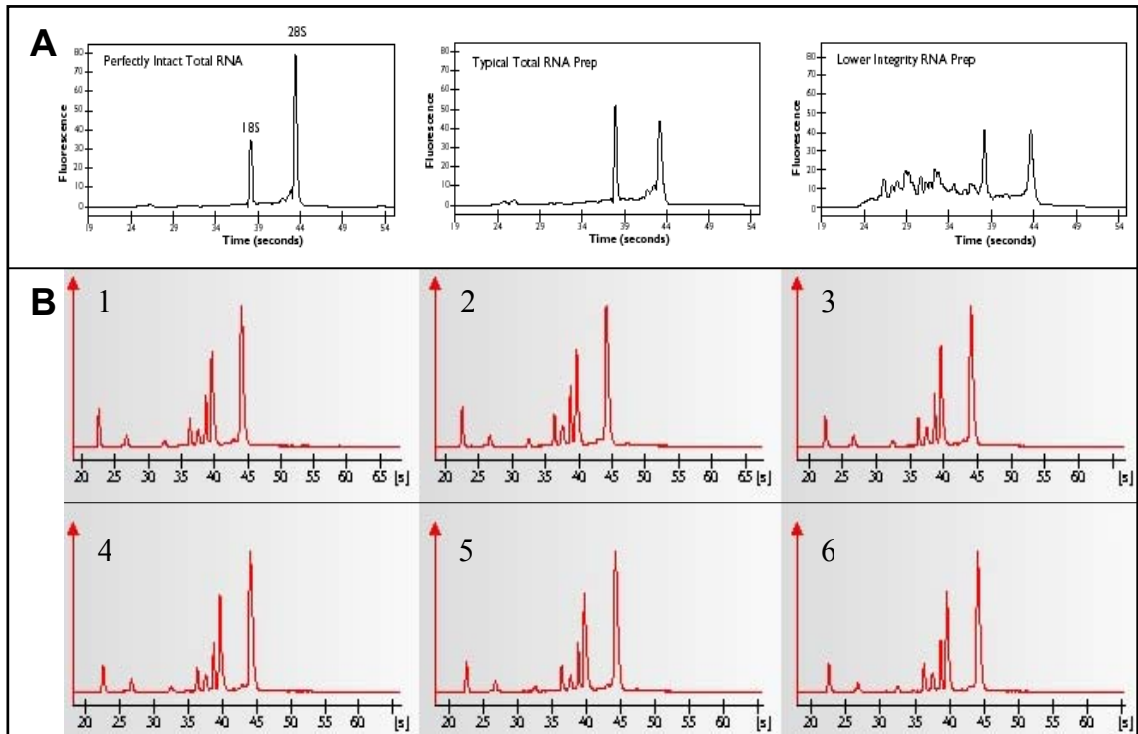
Um direkt oder indirekt regulierte Zielgene von AtbZIP53 zu identifizieren sollten die Transkriptome von ektopischen *AtbZIP53*-Überexprimierern und Wildtyp Pflanzen mit Hilfe von "Arizona whole-genome microarrays" miteinander verglichen werden. Die Mikroarray Experimente wurden in den Laboren von Jesus Vicente-Carbajosa und Roberto Solano in Madrid / Spanien durchgeführt.

Da in Northern Analysen für Pflanzen aus Sterilkultur auf MS Medium mit 2% Saccharose bereits eine erhöhte Expression der *ProDH* in *35S:AtbZIP53* Pflanzen gezeigt werden konnte, wurden dieselben Bedingungen auch für die Mikroarray Experimente gewählt. Außerdem bietet die Anzucht auf MS Medium mit 2% Saccharose die Vorteile, dass die Wuchsbedingungen sehr vergleichbar sind, die Pflanzen mit Wurzel geerntet werden können, und dass eine große Zahl von Pflanzen gleichzeitig geerntet werden kann, so dass zufällige Schwankungen besser herausgemittelt werden.

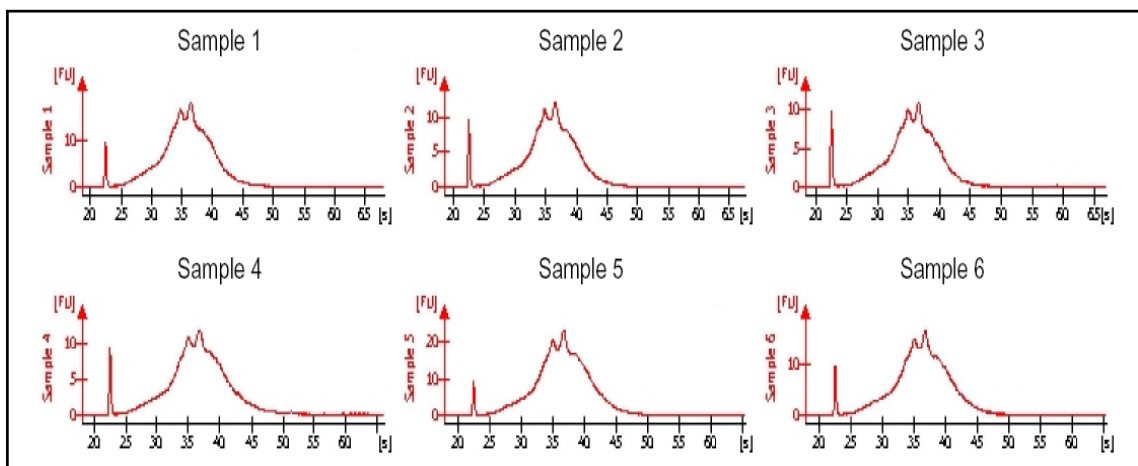
Die Transkriptomanalyse wurde mit 3 biologischen Replikaten durchgeführt, und für jedes Replikat wurden Pflanzen von 2 Petrischalen verwendet, so dass in jede Probe etwa 4g Pflanzenmaterial bzw. 200 Pflanzen einfließen. Die Proben wurden im Langtag angezogen und etwa 8 Stunden nach Beginn der Lichtphase komplett mit Wurzeln geerntet. Nach der Isolation der RNA wurde deren Qualität im Bioanalyser überprüft (Abbildung 5.25).

Im Anschluss wurde die RNA zu Antisense RNA (aRNA) amplifiziert. Der Prozess der aRNA-Amplifikation beginnt mit einer reversen Transkription der zu untersuchenden RNA-Extrakte mit einem Oligo(dT)-Primer, der am 5'-Ende einen T7-Promotor enthält. Mit der nach der Zweitstrangsynthese erhaltenen cDNA wird dann eine *in vitro* Transkription mit T7 RNA Polymerase durchgeführt, wobei tausende Antisense RNA Kopien von jeder mRNA im Ausgangsmaterial erstellt werden. Die Qualität der so erhaltenen aRNA wurde ebenfalls im Bioanalyser überprüft (Abbildung 5.26).

Für aRNA Proben wird eine erhöhte Zuverlässigkeit der mit ihnen erhaltenen Array Ergebnisse beschrieben, unabhängig davon, ob eine Amplifikation des Ausgangsmaterials notwendig ist oder nicht (Feldman *et al.*, 2002; Polacek *et al.*, 2003).



**Abbildung 5.25: Qualitätskontrolle der für die Transkriptomanalyse eingesetzten Gesamt-RNA Extrakte mit dem Bioanalyzer.** Die X-Achse gibt die Zeit an, die die RNA zum Durchwandern einer Gelmatrix benötigt, die Y-Achse die zum jeweiligen Zeitpunkt gemessene RNA-Menge. A: Beispiele für vollständig intakte RNA (links), eine durchschnittliche RNA-Präparation (Mitte) sowie teilweise degradierte RNA. B: Mit den drei biologischen Replikaten von Wildtyp (1-3) sowie *35S:HA-AtbZIP53* (4-6) Pflanzen erhaltene RNA-Profile. Die distinkten rRNA-Peaks sowie der sonstige Verlauf der Kurve nah an der Null-Linie lassen eine gute Qualität der RNA-Proben erkennen. Hier sind mehr Peaks zu erkennen als in den Beispielen unter (A), da diese Beispiele tierische RNA-Proben zeigen, denen die chloroplastidären rRNAs fehlen.



**Abbildung 5.26: Qualitätskontrolle der aRNA im Bioanalyzer.** Die Peaks der rRNAs sind verschwunden, dafür ist jetzt der hügelartige Verlauf der aRNAs, der equivalent zu dem von mRNAs ist, zu erkennen. Die Kurven belegen den Erfolg der aRNA-Synthese. Der Peak nach etwa 22 Sekunden stammt von einem in dem System verwendeten Farbmarker. Sample 1-3: Wildtyp aRNAs; Sample 4-6: *35S:HA-AtbZIP53* aRNAs.

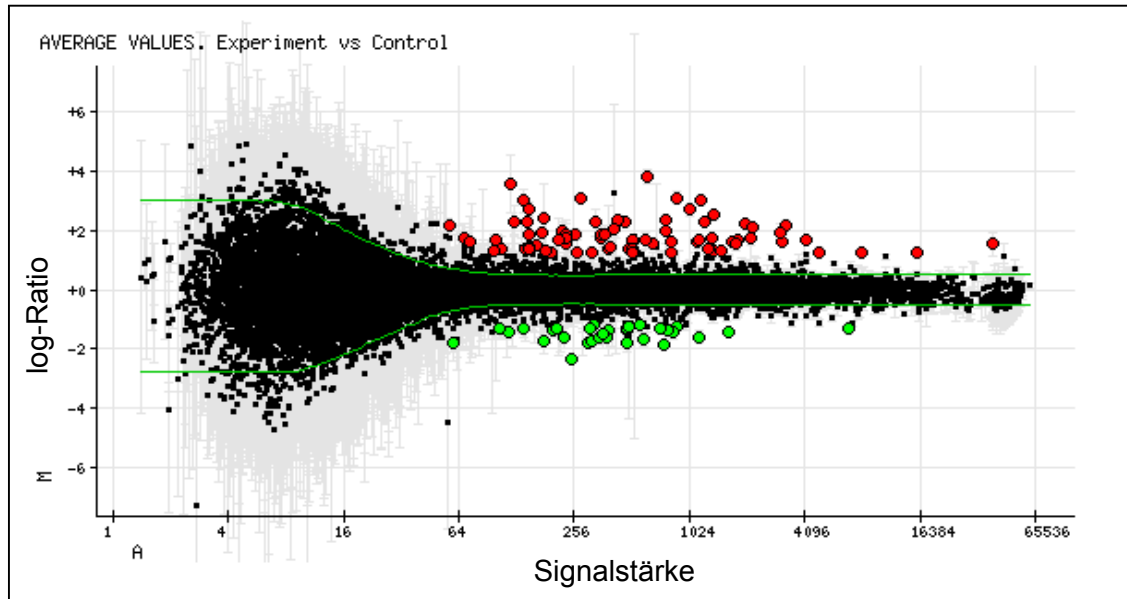
Das Markieren der aRNA fand indirekt statt, d.h., dass während der aRNA Synthese zunächst Aminoallyl-UTP eingebaut wurden, an das anschließend chemisch die Fluoreszenzfarbstoffe Cy3 bzw. Cy5 gekoppelt wurden. Dieses indirekte Fluoreszenzmarkieren bietet den Vorteil dass der Einbau von Aminoallyl-UTP während der aRNA-Synthese durch die T7-Polymerase wesentlich effizienter abläuft als der Einbau von bereits kovalent an die Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelten UTPs.

Die fluoreszenzmarkierte Wildtyp- bzw. *35S:AtbZIP53* aRNA wurde anschließend auf "ARIZONA whole genome arrays" hybridisiert, und die hybridisierten Arrays mit einem "GenePix 4000B Microarray Scanner" eingelesen. Die richtige Platzierung der Felder für das Auslesen der Signalstärken der einzelnen Spots wurde von Hand überprüft und gegebenenfalls korrigiert, und die aus den 3 biologischen Replikaten erhaltenen Daten wurden mit der Software S.O.L.A.R. System der Firma Bioalma integriert.

Für jedes auf dem Array vertretene Gen wurde das Maß der differentiellen Regulation (Y-Achse) gegen die mittlere Signalstärke (X-Achse) aufgetragen (Abbildung 5.27). Die große Mehrheit der Punkte liegt dicht an der Nulllinie, was für einen niedrigen Hintergrund und für eine hohe Reproduzierbarkeit zwischen den Proben spricht, die wohl durch die große Zahl von Pflanzen in jeder Probe zu erklären ist.

Für die Identifizierung von in der *35S:AtbZIP53* Linie im Vergleich zum Wildtyp signifikant unterschiedlich exprimierten Genen wurden zunächst als Schwellenwerte ein P-Wert von höchstens 0,07, eine Signalstärke von mindestens 50 sowie ein Unterschied in der Signalstärke (Ratio) von mindestens Faktor 2,4 festgesetzt.

In der Übersicht ist deutlich zu erkennen, dass nach diesen Definitionen in *AtbZIP53* überexprimierenden Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp mehr Gene induziert als reprimiert sind, und dass die Induktionen stärker sind als die Repressionen (Abbildung 5.27). Dies ist ein Ergebnis wie man es für die Überexpression eines Transkriptionsaktivators erwarten würde. In Zahlen sind nach diesen Definitionen 71 Gene in der *35S:AtbZIP53* Linie signifikant herauf reguliert (Tabelle 5.2) und 30 Gene signifikant herunter reguliert (Tabelle 5.3). Das am stärksten heraufregulierte Gen zeigt in der *35S:AtbZIP53* Linie ein 13,93fach stärkeres Signal als im Wildtyp, das am stärksten herunterregulierte Gen ein 5,13fach schwächeres Signal.



**Abbildung 5.27:** Verteilung nach Signalstärke und dem Logarithmus des Quotienten (log-Ratio) der Signale von *35S:HA-AtbZIP53* und Wildtyp Pflanzen. Die hellgrauen Balken geben die p-Werte der einzelnen Datenpunkte wieder. Rote Punkte: In *35S:HA-AtbZIP53* Pflanzen hochregulierte Gene mit einer Signalstärke von mindestens 50, einem p-Wert von höchstens 0,07, sowie einem log-Ratio von mindestens 1,25. Grüne Punkte: In *35S:HA-AtbZIP53* Pflanzen herunterregulierte Gene mit einer Signalstärke von mindestens 50, einem p-Wert von höchstens 0,07, sowie einem log-Ratio von höchstens -1,25.

**Tabelle 5.2:** In *35S:AtbZIP53* Pflanzen stärker als im Wildtyp exprimierte Gene. In der Genevestigator-Analyse am stärksten in Samen exprimierte Gene sind grün gekennzeichnet, am stärksten in Pollen exprimierte Gene blau, am stärksten in seneszenten Blättern exprimierte Gene gelb und am stärksten in den Wurzeln exprimierte Gene braun. Gene in den weißen Feldern fallen in keine dieser Gruppen, kursiv geschriebene Gene sind in der Genevestigator-Datenbank nicht vorhanden und können deshalb nicht zugeordnet werden. Das Ratio gibt den Quotienten der für *35S:AtbZIP53* und Wildtyp Pflanzen erhaltenen Signale an, der p-Wert ihre statistische Signifikanz (je niedriger der p-Wert, desto zuverlässiger die Daten). Mit # gekennzeichnete Gene enthalten ein ACGTGCC-Motiv in ihrem Promotor (siehe 5.6.3)

Signal	Ratio	p-Wert	Beschreibung	AGI-Code
614	13,93	0,001	legumin-like protein	At5g44120#
13557	11,82	0,024	unknown protein	At1g68250
27975	8,22	0,000	similar to myo-inositol oxygenase	At4g26260#
1172	8,01	0,001	12S cruciferin seed storage protein	At4g28520#
21110	7,94	0,006	splicing factor SF3a like protein	At4g16200
1014	6,47	0,002	trehalose-6-phosphate phosphatase-like protein	At4g22590#
149	6,43	0,002	similar to PEP-carboxykinase (ATP) -like protein	At5g65690
1379	5,65	0,001	NWMU1 - 2S albumin 1 precursor	At4g27140
177	5,32	0,067	putative cruciferin 12S seed storage protein	At1g03880
763	5,11	0,001	NWMU2 - 2S albumin 2 precursor; protein id	At4g27150
432	5,01	0,003	NWMU4 - 2S albumin 4 precursor; protein id	At4g27170
126	4,88	0,016	glycosyl hydrolase family protein 17	At5g63240
1220	4,86	0,001	Prolinhydrogenase	At3g30775
146	4,85	0,013	acireductone dioxygenase (ARD/ARD') family protein	At2g26400
475	4,82	0,001	NWMU3 - 2S albumin 3 precursor	At4g27160
1993	4,54	0,001	unknown protein	At1g14880
3243	4,4	0,003	glutamine-dependent asparagine synthetase	At3g47340
58	4,4	0,000	peroxiredoxin	At1g48130#
2182	4,28	0,002	pathogenesis-related PR-1-like protein	At2g14610

220	3,96	0,008	RNA polymerase II fifth largest subunit like protein	At4g14660
769	3,96	0,001	putative Fe(II)/ascorbate oxidase	At4g10500
174	3,76	0,002	11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase-like	At5g50600
356	3,66	0,008	disease resistance protein (TIR class), putative	At1g19960
149	3,65	0,011	hypothetical protein	At1g13470
259	3,58	0,003	galactinol synthase	At1g56600
234	3,54	0,015	MADS-box protein	At5g65080
373	3,52	0,013	putative trehalose-6-phosphate phosphatase (AtTPPA);	At4g12430#
57	3,38	0,031	unknown protein	At3g07600
355	3,37	0,003	<i>lipase class 3-related</i>	At5g24200
231	3,29	0,037	thionin, putative	At2g15010
2136	3,26	0,006	Expressed protein	At3g22231
69	3,25	0,028	oleosin	At3g01570#
1324	3,24	0,001	nucleoid DNA-binding protein cnd41 - like protein	At5g10760
510	3,23	0,001	ankyrin repeat family protein	At1g10340
1828	3,2	0,001	unknown protein	At2g14560#
101	3,18	0,002	AIL1; LEA76 homologue type2	At3g15670#
4111	3,17	0,001	glycosyl hydrolase family 36	At3g57520#
210	3,15	0,061	putative protein	At5g45630#
1136	3,14	0,004	germin-like protein (GLP1) (GLP4)	At1g18970
608	3,13	0,009	putative protein	At5g41080#
511	3,09	0,000	branched chain aminoacid transaminase	At1g10070#
1114	3,08	0,002	hypothetical protein	At2g18660
828	3,06	0,001	putative protein	At3g45730
74	3,03	0,032	aminoacid transporter family protein	At2g41190#
3134	3,01	0,002	AtbZIP53	At3g62420
1691	3,01	0,002	CTP synthase-like protein	At1g30820
657	2,97	0,001	<i>similar to Fructose-2,6-bisphosphatase</i>	At3g60420
69	2,96	0,007	hypothetical protein	At1g56660#
1768	2,96	0,008	<i>Lipoxygenase - defense gene conferring resistance</i>	At1g55020
230	2,93	0,005	ankyrin-repeat-containing protein-like	At5g54610
39126	2,9	0,020	expressed protein	At2g25510
161	2,83	0,000	polygalacturonase, putative	At5g14650
68	2,73	0,023	unknown protein	At1g54095
398	2,66	0,014	protein kinase, putative	At4g23160
148	2,64	0,032	<i>hypersensitive response protein 3 (HR3)</i>	At3g50470
390	2,62	0,008	glycosyl hydrolase family 1, beta-glucosidase	At3g60140
496	2,58	0,001	proline oxidase, mitochondrial precursor -like protein	At5g38710
515	2,58	0,001	cytochrome P450, putative	At1g01190
1269	2,55	0,005	zinc finger family protein / ankyrin repeat family protein	At4g14365
106	2,54	0,040	NAM (no apical meristem)-like protein	At1g02230
149	2,54	0,048	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putativ	At1g35710
142	2,53	0,002	tonoplast intrinsic protein, alpha (alpha-TIP)	At1g73190
1504	2,51	0,003	flavanone 3-hydroxylase-like protein;	At5g24530
1369	2,49	0,002	<i>glutamine amidotransferase-related;</i>	At1g15045
180	2,49	0,004	oleosin	At3g27660
97.7	2,49	0,055	trehalose-phosphatase, putative	At1g35910
1369	2,49	0,002	hypothetical protein;	At3g27660
52	2,48	0,008	embryo-specific protein 3 (ATS3);	At5g07190
68	2,46	0,042	NAM (no apical meristem)-like protein;	At2g17040
8064	2,4	0,002	calcium binding protein (CaBP-22);	At2g41090
524	2,4	0,009	putative calcium-binding protein;	At3g47480
4858	2,4	0,005	hypothetical protein;	At1g67020

### 5.6.1 Gene mit einer erhöhten Expression in der 35S:AtbZIP53 Linie zeigen gewebespezifische Expressionsmuster

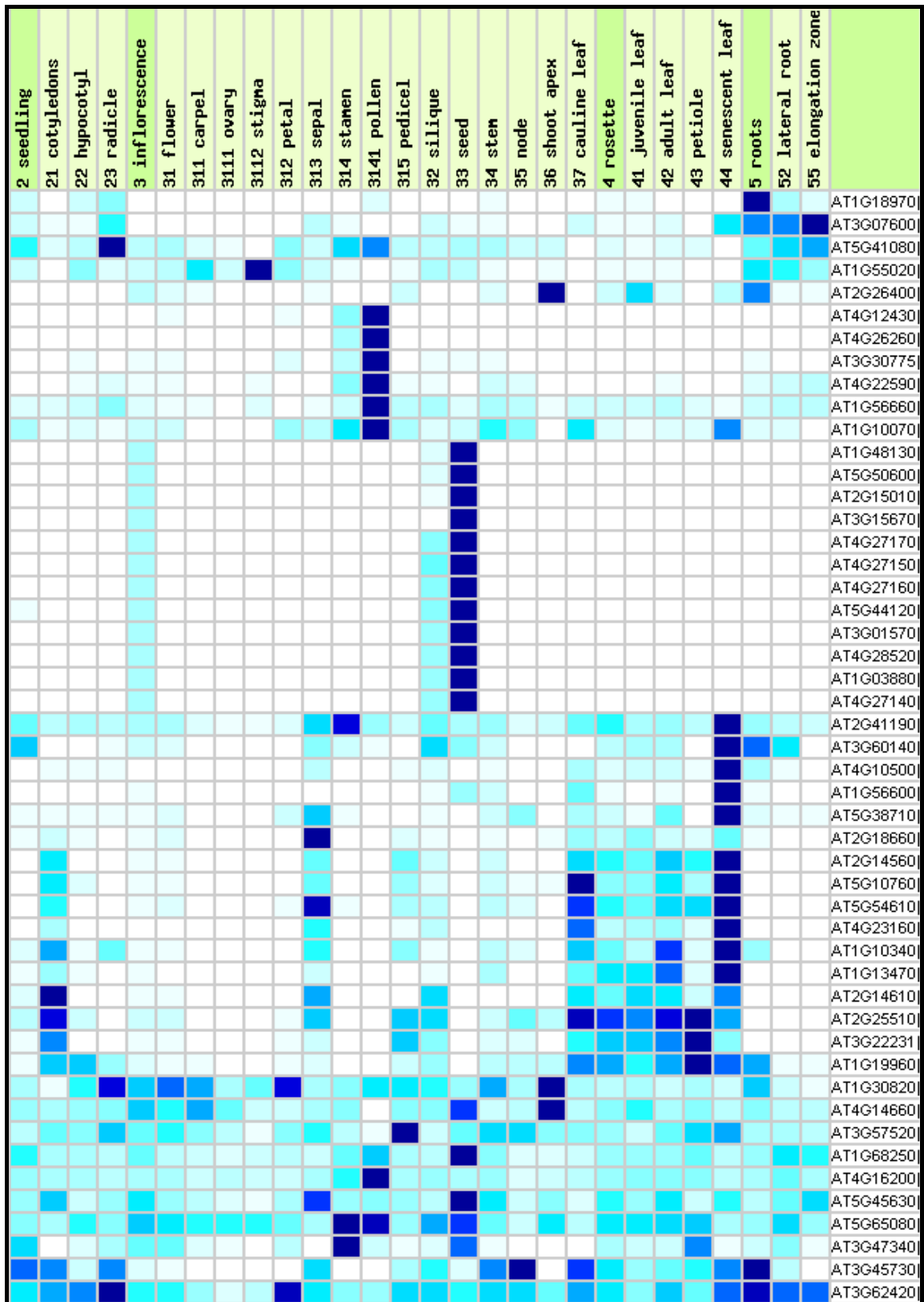
Direkte Zielgene von AtbZIP53 sind am ehesten in der Gruppe der aktivierten Gene zu erwarten. Hier fällt zunächst auf, dass alle 12S und 2S Samenspeicherprotein-Gene in dieser Gruppe vertreten sind. Darüber hinaus finden sich weitere samenspezifische Gene wie *Oleosin*, *Thionin* oder ein LEA-Gen.

Um zu prüfen, ob auch andere der induzierten Gene eine samenspezifische Expression zeigen, sowie um einen Überblick über die gewebespezifische Expression der putativen Zielgene zu erhalten, wurden die 50 am stärksten aktivierten Gene mit dem Metaanalyser Programm der Genevestigator Software (Zimmermann *et al.*, 2004) auf ihr Expressionsmuster hin analysiert (Abbildung 5.28). Dieses Programm fasst Daten mehrerer Mikroarray-Experimente zur gewebespezifischen Expression zusammen, und ermöglicht so für einzelne Gene die Expression in verschiedenen Geweben miteinander zu vergleichen. Für jedes Gen werden die stärksten gemessenen Expressionen dunkelblau, die schwächsten weiß dargestellt. Da einige der aktivierten Gene auf den Affymetrix Mikroarrays, mit denen die Daten der Genevestigator-Datenbank erzeugt wurden, nicht vorhanden sind, konnten diese nicht analysiert werden.

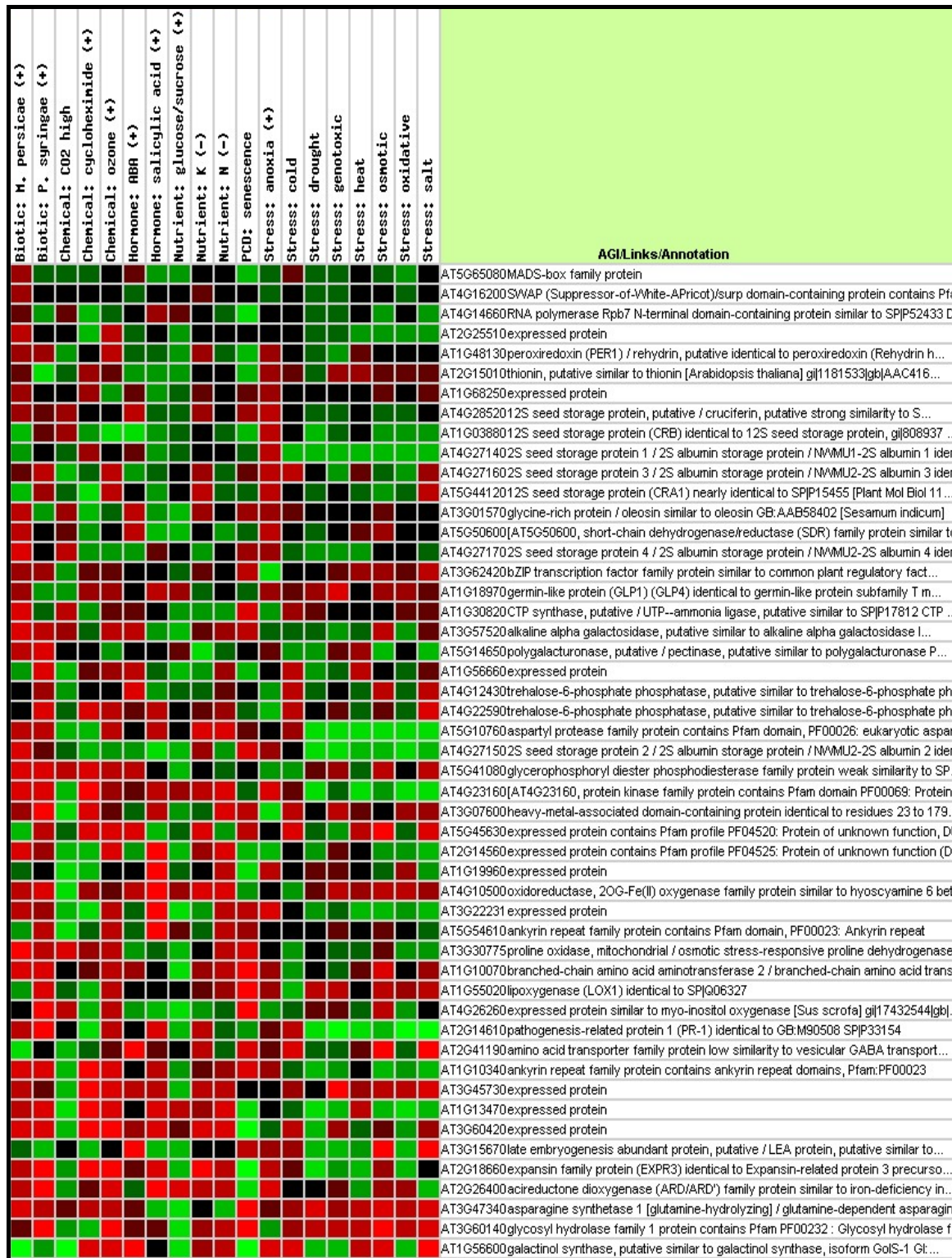
In der Analyse der Gewebespezifität der Expression der 50 am stärksten aktivierten Gene fällt auf, dass ein Großteil von ihnen in eine von drei Gruppen fällt, die entweder eine starke samenspezifische oder pollenspezifische Expression zeigen, oder deutlich am stärksten in seneszenten Blättern exprimiert werden. Die Gruppe der pollenspezifischen Gene, die auch das bereits bekannte Zielgen ProDH enthält, unterstützt die aufgrund der Promotor-GUS Daten aufgestellte Vermutung, dass AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 an der Pollenentwicklung beteiligt sind. Die anderen Gruppen können als Hinweis auf eine Beteiligung von *AtbZIP53* an der Samenentwicklung bzw. Seneszenz gesehen werden.

Neben der Analyse der gewebespezifischen Expressionsmuster wurde mit Genevestigator auch eine Analyse der Stressregulation der in den 35S:AtbZIP53 Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp am stärksten aktivierten Gene durchgeführt (Abbildung 5.29). Hier zeigt sich ein wesentlich heterogeneres Bild. Insgesamt sind in der über Genevestigator analysierbaren Datenbank Mikroarray-Experimente zu 76 verschiedenen Stressen vorhanden. Zu Gunsten der Übersichtlichkeit sind hier nur





**Abbildung 5.28:** Genevestigator-Analyse der gewebespezifischen Expressionsmuster der in den *35S:AtbZIP53* Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp am stärksten aktivierten Gene. Je dunkler das Blau, desto stärker ist die Expression in dem jeweiligen Gewebe. Für die Darstellung wurden Kallus und Zellkultur von der Liste der Gewebe ausgeschlossen, verwendete Einstellungen für die Berechnung der Cluster waren Euclidean und Average. Entsprechend den Ergebnissen dieser Analyse wurden die Gene in Tabelle 5.2 den jeweiligen Gruppen zugeordnet.



**Abbildung 5.29: Übersicht über die Regulation der in *35S:AtbZIP53* Pflanzen aktivierten Gene unter verschiedenen Stressbedingungen.** Die Beschriftungen oben bezeichnen das jeweilige Experiment, rechts sind verschiedenen aktivierten Gene aufgeführt. Ist ein Feld rot, ist das Gen im Experiment stärker exprimiert, ist es grün, so ist das Gen im Experiment schwächer exprimiert. Je heller die Farben sind, desto stärker ist die Differenz zwischen Experiment und Kontrolle. Schwarze Felder bedeuten eine gleichstarke Expression in Experiment und Kontrolle.

Experimente gezeigt, in denen ein Grossteil der Gene eine deutliche Regulation zeigt, sowie verschiedene Experimente zu abiotischem Stress, da für *AtbZIP53*-ähnliche Transkriptionsfaktoren mehrfach eine Beteiligung an der Antwort auf abiotischen Stress postuliert wurde (siehe Einleitung, Kapitel 2.6). Es fällt auf, dass viele Gene durch Infektion mit den Pathogenen *M. persicae* oder *Pseudomonas syringae*, oder nach Behandlung mit dem in der Pathogenabwehr wichtigen Hormon Salicylsäure induziert werden. Möglicherweise hat *AtbZIP53* also auch eine Funktion in der Pathogenabwehr. Zudem finden sich auch hier viele durch Seneszenz induzierte Gene. In diesem Fall wurde die Seneszenz in einer Zellkultur durch Zucker-Verarmung induziert, weshalb sie als Stress aufgeführt ist.

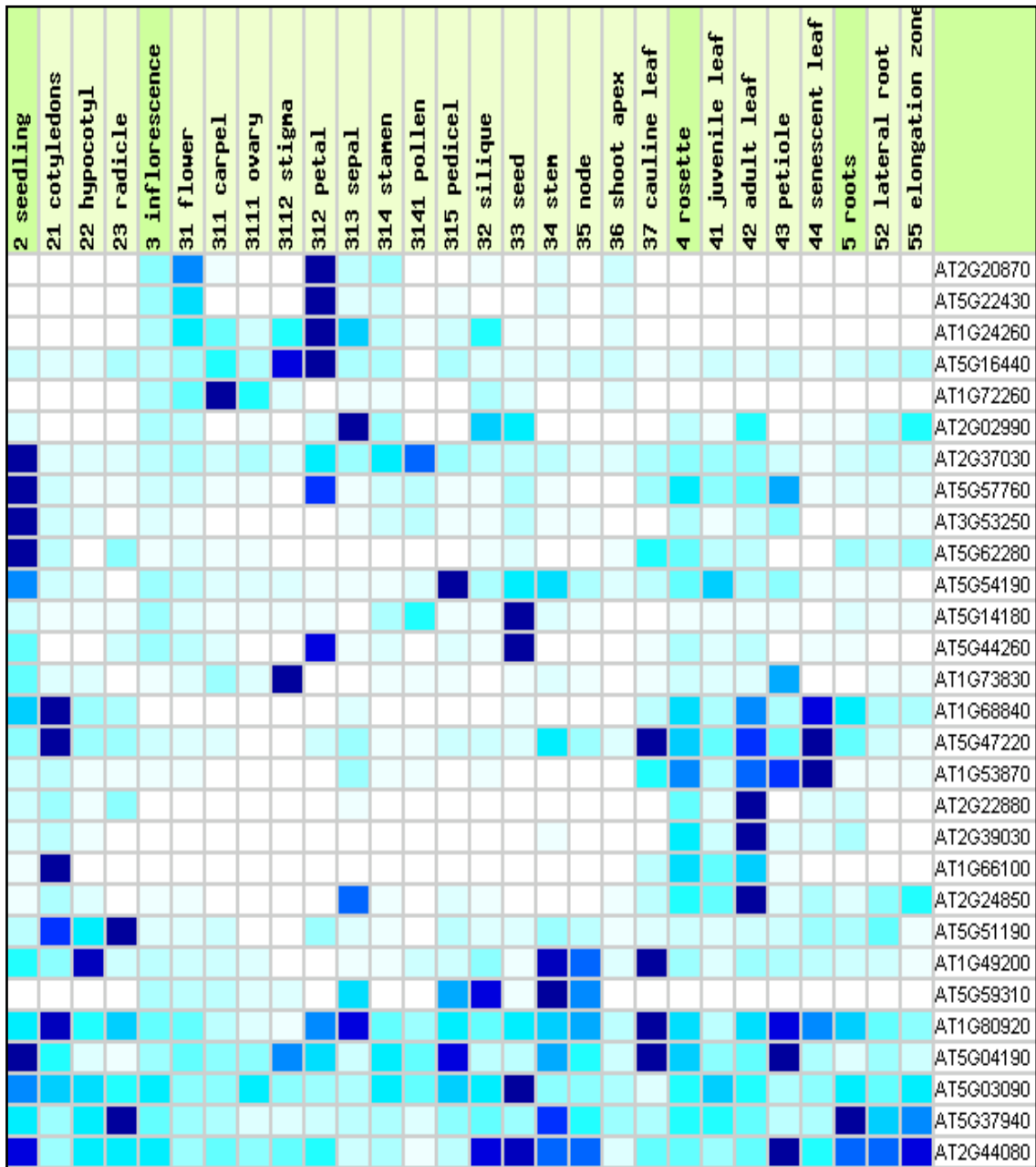
### **5.6.2 Gene mit einer reduzierten Expression in der 35S:*AtbZIP53* Linie zeigen keine einheitlichen Expressionsmuster**

Unter den in der 35S:*AtbZIP53* Linie reprimierten Gene wird der Anteil an Genen, deren Regulation auf sekundäre und indirekte Effekte zurückzuführen ist, erwartungsgemäß größer sein. Entsprechend fällt hier auch die Zuordnung der Gene in verschiedene Kategorien schwerer. Es fällt auf, dass in dieser Gruppe der Anteil an Transkriptionsfaktoren deutlich größer ist als in der Gruppe der aktivierten Gene. Des Weiteren sind auch unter den reprimierten Genen zwei Thionine, die aber nicht in Samen exprimiert werden. Für die reprimierten Gene wurde ebenfalls eine Analyse der Expressionsmuster mit dem Metaanalyser Werkzeug der Genevestigator Software durchgeführt.

In der Analyse der gewebespezifischen Expression zeigte keines der reprimierten Gene eine nennenswerte Expression in Pollen, jedoch finden sich auch hier 4 vorwiegend in Samen und zwei vorwiegend in seneszenten Blättern exprimierte Gene (Abbildung 5.30). Eine möglicherweise interessante Gruppe sind die vier am stärksten in Blütenblättern exprimierten Gene, von denen drei zu den zehn am stärksten reprimierten Genen gehören. Auch *AtbZIP53* wird laut Genevestigator mit am stärksten in den Blütenblättern exprimiert, jedoch zeigt keines der aktivierten Gene eine vergleichbare Expression. In der Analyse der Stressregulation der reprimierten Gene zeichnen sich keine klaren Gruppen ab, die einen Hinweis auf die Funktion von *AtbZIP53* geben könnten.

**Tabelle 5.3:** In *35S:AtbZIP53* Pflanzen schwächer als im Wildtyp exprimierte Gene. Transkriptionsfaktoren sind blau unterlegt. In der Genevestigator-Analyse am stärksten in Samen exprimierte Gene sind grün gekennzeichnet, und am stärksten in seneszenten Blättern exprimierte Gene gelb. Am stärksten in Blütenblättern exprimierte Gene sind fett geschrieben. Das Ratio gibt den Quotienten der für *35S:AtbZIP53* und Wildtyp Pflanzen erhaltenen Signale an, der p-Wert ihre statistische Signifikanz (je niedriger der p-Wert, desto zuverlässiger die Daten).

Signal	Ratio	p-Wert	Beschreibung	AGI-Code
246	-5,13	0,000	cell wall protein precursor	At2g20870
756	-3,62	0,001	similar to GCN5-related N-acetyltransferase family protein	At2g39030
483	-3,49	0,010	lipase family protein	At5g14180
60	-3,48	0,039	putative auxin-induced protein	At2g37030
303	-3,43	0,003	putative helix-loop-helix DNA-binding protein	At1g73830
177	-3,39	0,016	expressed protein	At5g22430
314	-3,31	0,004	MADS-box protein	At1g24260
586	-3,25	0,006	zinc finger (CCCH-type) family protein	At5g44260
62	-3,21	0,042	thionin	At1g72260
343	-3,12	0,007	thionin, putative	At1g66100
380	-3,07	0,016	putative protein	At5g62280
224	-3,06	0,014	auxin-responsive family protein	At3g53250
1148	-3,01	0,005	unknown protein	At2g44080
364	-2,82	0,030	ribonuclease, RNS1	At2g02990
117	-2,74	0,006	RING-H2 finger protein RHA3a, putative	At1g49200
832	-2,72	0,008	unknown protein	At5g57760
1641	-2,69	0,002	AP2 domain protein RAP2.8 (RAV2)	At1g68840
386	-2,64	0,005	member of the ERF subfamily B-3 of ERF/AP2	At5g51190
477	-2,63	0,006	nonspecific lipid-transfer protein precursor - like	At5g59310
782	-2,61	0,008	expressed protein	At1g53870
197	-2,60	0,010	lipase family protein	At5g14180
6946	-2,53	0,004	J8-like protein, DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein	At1g80920
138	-2,52	0,013	putative protein	At5g03090
484	-2,52	0,018	putative tyrosine aminotransferase	At2g24850
83	-2,52	0,027	protochlorophyllide oxidoreductase A (gb AAC49043.1)	At5g54190
311	-2,50	0,019	quinone oxidoreductase -like protein	At5g37940
206	-2,49	0,016	phytochrome kinase substrate 1 - like protein	At5g04190
105	-2,45	0,023	hypothetical protein	At2g22880
715	-2,44	0,009	ethylene responsive element binding factor 2 (EREBP-2)	At5g47220
60	-2,43	0,017	isopentenyl pyrophosphate:dimethylallyl pyrophosphate isomerase	At5g16440

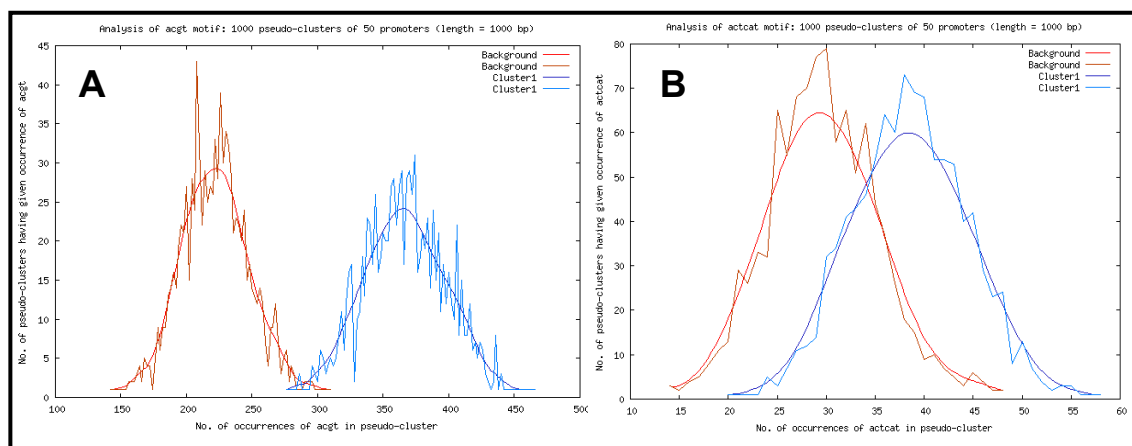


**Abbildung 5.30: Genevestigator-Analyse der gewebespezifischen Expressionsmuster der in den 35S:AtbZIP53 Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp am stärksten reprimierten Gene.** Je dunkler das blau, desto stärker ist die Expression in dem jeweiligen Gewebe. Für die Darstellung wurden Kallus und Zellkultur von der Liste der Gewebe ausgeschlossen, verwendete Einstellungen für die Berechnung der Cluster waren Euclidean und Average. Entsprechend den Ergebnissen dieser Analyse wurde die Gene in Tabelle 5.3 den jeweiligen Gruppen zugeordnet.

### 5.6.3 Die Analyse der Promotoren von in der *35S:AtbZIP53* Linie stärker exprimierten Genen zeigt ein gehäuftes Auftreten eines *ACGTGGC*-Motivs

Da AtbZIP53 wahrscheinlich als Heterodimer seine Zielgene reguliert, und die von AtbZIP53 gebundenen *cis*-Elemente wahrscheinlich auch von dem Heterodimerisierungspartner abhängen (Matsushima-Hibiya *et al.*, 1998), wird es schwierig sein, ein konkretes Bindeelement zu identifizieren. Solche Aussagen anhand der Arraydaten werden zusätzlich erschwert, da die Überexpression über einen langen Zeitraum erfolgte, so dass wahrscheinlich nur ein Teil der aktivierten Gene direkte Zielgene sind.

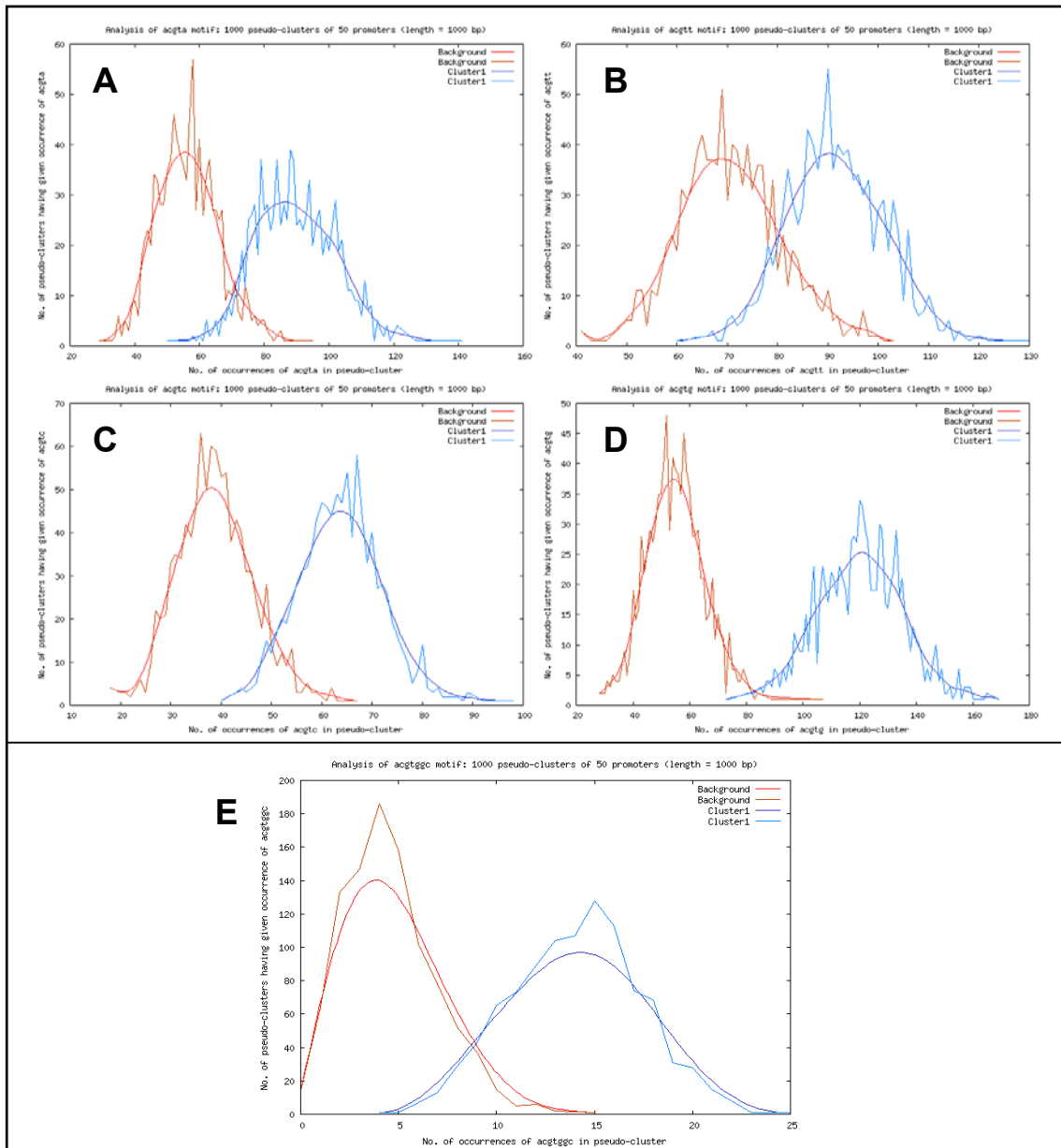
Nichtsdestotrotz zeigen Promotoranalysen der Gene mit einer erhöhten Expression in der *35S:AtbZIP53* Linie mit dem Programm POBO (promoter bootstrapping program, Kankainen und Holm, 2004) ein deutlich gehäuftes Auftreten von *ACGT*-Motiven, einer klassischen Erkennungssequenz von bZIP-Transkriptionsfaktoren, ebenso wie von den für die ProDH beschriebenen *ACTCAT*-Motiv (Abbildung 5.31). Um ein möglicherweise bevorzugt von AtbZIP53 gebundenes *cis*-Element über das *ACGT*-Motiv hinaus zu definieren wurde analysiert, welche Basen gehäuft vor und hinter der *ACGT*-Sequenz vorkommen.



**Abbildung 5.31:** Analyse der  $-1$  bis  $-1000$  bp Promotorregionen der 57 in *35S:HA-AtbZIP53* Pflanzen am stärksten aktivierten Gene mit dem Programm POBO. **A:** Häufigkeit des *ACGT*-Motivs; **B:** Häufigkeit des *ACTCAT*-Motivs; 52 der 57 aktivierten Promotoren enthielten *ACGT*-Motive, 32 *ACTCAT*-Motive. Als Kontrolle diente *Arabidopsis thaliana\_full*, ein Datensatz der die 1000bp Promotorregionen fast aller Gene aus *Arabidopsis* enthält. Die Bootstrap-Analysen wurden mit jeweils mit 1000 Clustern aus je 50 Promotoren durchgeführt. Die roten Linien zeigen die Häufigkeit des untersuchten Motivs in der Kontrollgruppe, die blaue Linie die Häufigkeit des Motivs in den Promotoren der aktivierten Gene (X-Achse: Häufigkeit des Motivs im Pseudo-Kluster; Y-Achse: Zahl der Pseudokluster).

Als Vergleich diente eine Kontrollgruppe, welche die 1000bp Promotorregionen fast aller Gene aus *Arabidopsis* enthält. Während alle Basen etwa gleich häufig vor dem *ACGT*-Motiv auftraten (nicht gezeigt), fand sich an der Position hinter dem *ACGT*-Motiv sowohl in absoluten Zahlen als auch relativ zur Kontrolle am häufigsten ein Guanosin (Abbildung 5.32; Von den 57 aktivierten Promotoren enthielten 47 zusammen 137 *ACGTG*-Motive). Verfolgt man dieses Vorgehen weiter, so ist die häufigste Base nach dem Guanosin ein weiteres Guanosin (23 Promotoren enthielten zusammen 35 *ACGTGG*-Motive), gefolgt von einem Cytosin. Dieses Motiv, *ACGTGGC*, findet sich in 15 der aktivierten Gene und tritt etwa dreimal häufiger auf als in der Kontrollgruppe. Diese Sequenz ist in der Literatur als ABA-responsive- (*ABRE*-) Element beschrieben, ein *cis*-Element, das für die Regulation verschiedener Gene durch das Phytohormon Abscisinsäure verantwortlich ist (Busk und Pages, 1998; Shen *et al.*, 2004; Straub *et al.*, 1994). In der Liste der aktivierten Gene (Tabelle 5.2) wurden diejenigen Gene, die dieses Motiv in ihrem Promotor enthalten, mit einem # gekennzeichnet. Tatsächlich wird ein Teil der Gene, die dieses Element in ihrem Promotor enthalten, wie zum Beispiel das LEA-Gen *AIL1*, ein *Trehalose-6-Phosphat Phosphatase*-Gen, eine *branched chain aminoacid transaminase (BCAT)* oder ein Gen das einen putativen Aminosäuretransporter codiert (*At2g41190*), deutlich durch ABA induziert.

Aufgrund des gehäuften Auftretens des *ABRE*-Motives wurde vermutet, *AtbZIP53* oder einer seiner Heterodimerisierungspartner könnte deutlich durch ABA induziert werden. Northern-Analysen zeigten jedoch keine Induzierbarkeit von *AtbZIP53* durch ABA (nicht gezeigt), und auch in veröffentlichten Mikroarray-Daten findet sich keine solche Induktion. Unter den potentiellen Heterodimerisierungspartnern zeigt nur *AtbZIP9* eine Induktion durch ABA, die zudem sehr schwach ist (nicht gezeigt).



**Abbildung 5.32: Analyse der -1 bis -1000 bp Promotorregionen der 57 am stärksten aktivierten Gene mit dem Programm POBO. A:** Häufigkeit des *ACGTA*-Motivs; **B:** Häufigkeit des *ACGTT*-Motivs; **C:** Häufigkeit des *ACGTC*-Motivs; **D:** Häufigkeit des *ACGTG*-Motivs; **E:** Häufigkeit des *ACGTGG*-Motivs; 47 der 57 aktivierten Promotoren enthielten *ACGTG*-Motive, 15 *ACGTGGC* Motive. Kontrolle und Bootstrap-Analysen wie oben beschrieben. Rote Linien: Häufigkeit des Motivs in der Kontrollgruppe; Blaue Linien: Häufigkeit des Motivs in den Promotoren der aktivierten Gene (X-Achse: Häufigkeit des Motivs im Pseudo-Kluster; Y-Achse: Zahl der Pseudokluster).



#### 5.6.4 Verifikation von einzelnen in dem Mikroarrayexperiment durch *AtbZIP53* induzierten Genen in Northern Analysen

Für einen Teil der am stärksten regulierten Gene wurden die Mikroarray Daten in Northern Analysen reproduziert (Abbildung 5.33). Hierfür wurden neu Pflanzen unter denselben Bedingungen angezogen, so dass es sich hier auch um ein weiteres biologisches Replikat handelt.

Da aufgrund der Heterodimerisierungsdaten sowie der in Protoplasten-Assays mit dem *ProDH cis*-Element erhaltenen Daten angenommen werden kann, dass auch andere Gruppe C/S1 *AtbZIP*-Transkriptionsfaktoren an der Regulation von putativen Zielgenen von *AtbZIP53* beteiligt sind, wurde die Expression der untersuchten Gene auch in Linien mit einer veränderten Expression von *AtbZIP1*, *9*, und *63* untersucht. Desweiteren ist auf den Filtern RNA aus einer *AtbZIP10* Überexpressions- und einer *atbzip10* Mutante aufgetragen. Die beiden Samenspeicherprotein-Gene *CRU3* und *2S1* zeigen eine deutliche Aktivierung in *AtbZIP53*, *9* und *63* Überexpressionslinien, die mit der Stärke der Überexpression korreliert. Jedoch lässt sich in der *AtbZIP9*-Überexpressionslinie 6-3 keine Aktivierung erkennen.

Für die drei stark in Pollen exprimierten Gene *ProDH*, *ASN1* und *T6PP* konnte die Aktivierung im *35S:AtbZIP53* Hintergrund ebenfalls reproduziert werden. Die *ProDH* zeigt in diesen Proben einen hohe Hintergrundaktivität, so dass die Aktivierung weniger deutlich ist, dafür lässt sich aber eine Repression in der *atbzip53* Mutante und der *atbzip1/atbzip53* Doppelmutante erkennen. *ASN1* zeigt neben der deutlichen Aktivierung in der *AtbZIP53* Überexpressionslinie auch eine leichte Aktivierung in der stärkeren *AtbZIP63* Überexpressionslinie. Dies entspricht Daten von Dr. Jesús Vicente-Carbajosa, der in einer Transkriptomanalyse einer *35S:AtbZIP63* Linie ebenfalls eine Aktivierung der *ASN1* zeigen konnte (persönliche Mitteilung).

Die Seneszenz-induzierten Gene *PR1* und *Gols2* zeigen auch die erwartete Aktivierung in der starken *AtbZIP53*-Überexpressionslinie, jedoch sind beide auch in den sehr schwachen Überexpressionslinien HA9 22 und HA53 21.4 aktiviert. Dies wirft die Frage auf, ob diese Unterschiede auf zufällige Schwankungen zurückzuführen sind. Für das Seneszenz-induzierte Gen *PEPCK* ließ sich die Induktion durch *AtbZIP53* reproduzieren, eine leichte Aktivierung ist auch in der schwachen *AtbZIP53*-Überexpressionslinie sowie der *AtbZIP10*-Überexpressionslinie zu erkennen.

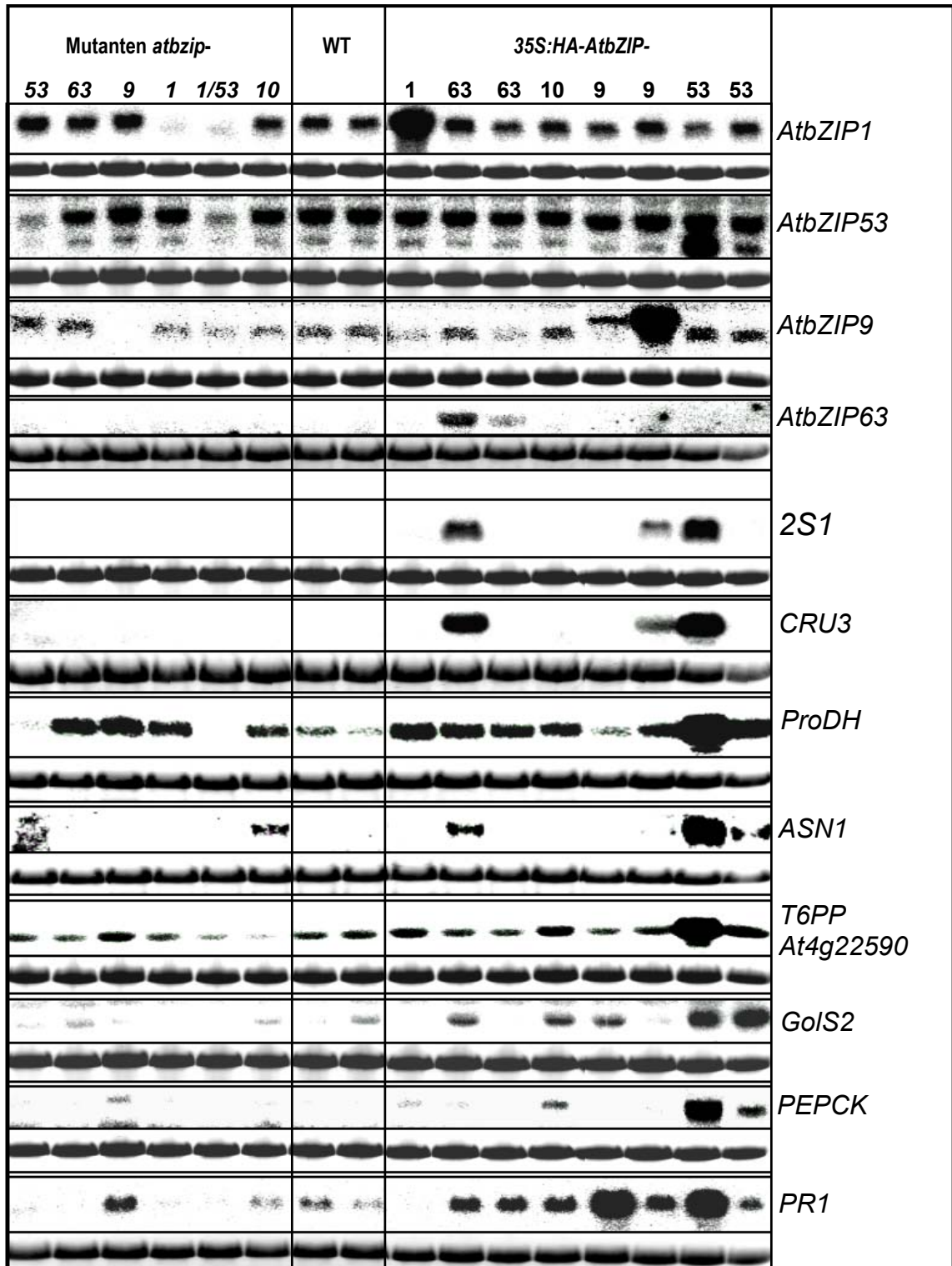


Abbildung 5.33: Northern Analysen der Expression von in dem Mikroarrayexperiment aktivierten Genen in verschiedenen *AtbZIP*-Überexpressionslinien und *atbzip*-Mutanten. Die Pflanzen wurden auf MS-Medium mit 2% Saccharose unter Langtag-Bedingungen angezogen und nach zwei Wochen etwa 8 Stunden nach Beginn der Lichtphase komplett mit Wurzeln geerntet. Jede Probe repräsentiert etwa 100 Pflanzen von einer Petrischale. Unter jedem Northern ist ein Bild der Etidiumbromid Färbung des verwendeten RNA-Gels als Ladeabgleich gezeigt.

### 5.6.5 *ASN1* ist ein direktes Zielgen von *AtbZIP53*

Für die *ProDH* wurde bereits durch ChIP-Experimente gezeigt, dass sie ein direktes Zielgen von *AtbZIP53* ist. Im folgenden sollten weitere direkte Zielgene von *AtbZIP53* identifiziert werden. Ein Kandidat dafür war die *Glutamin-abhängige Asparagin Synthetase (ASN1)*, da sowohl die Überexpression von *AtbZIP53* als auch die Überexpression von *AtbZIP63* zu ihrer Induktion führt, so dass sie möglicherweise von *AtbZIP53/AtbZIP63* Heterodimeren reguliert wird. Des Weiteren zeigt *ASN1* ein hohes Maß an Koregulation mit diesen Genen. *ASN1* wird durch Zucker reprimiert (Thum *et al.*, 2003), durch Dunkelheit induziert (Fujiki *et al.*, 2001), ist an der Samenentwicklung beteiligt (Lam *et al.*, 2003), und außerdem wird für *ASN1* eine Funktion in der Seneszenz vermutet (Lin und Wu, 2004).

Im Promotor von *ASN1* befinden sich in den 356 Basenpaare in 5' Richtung vor dem Transkriptionsstart 3 potentielle Bindemotive für bZIP-Transkriptionsfaktoren, 2 *G-Box* und ein *C-Box* Motiv. Für die ChIP-Analyse wurden zwei Primer zu beiden Seiten von diesen Motiven gewählt (*ASN1chip for* und *ASN1chip rev*). Die folgende Analyse durch quantitative PCR wurde mit dem selben immunoprecipitierten Chromatin wie in den entsprechenden Experimenten zur *ProDH* durchgeführt. Dabei konnte eine deutliche Anreicherung von Fragmenten des *ASN1*-Promotors gezeigt werden, so dass es sich bei *ASN1* wahrscheinlich um ein direktes Zielgen handelt (Abbildung 5.34).

	Input		ChIP $\alpha$ -HA					
	-	+	-	+	-	+	-	+
35S: <i>AtbZIP53</i>	-	+	-	+	-	+	-	+
ASN1-Primer								
PCR-Zyklen	25		35		38		41	
Kontroll-Primer								
PCR-Zyklen			38		41		44	

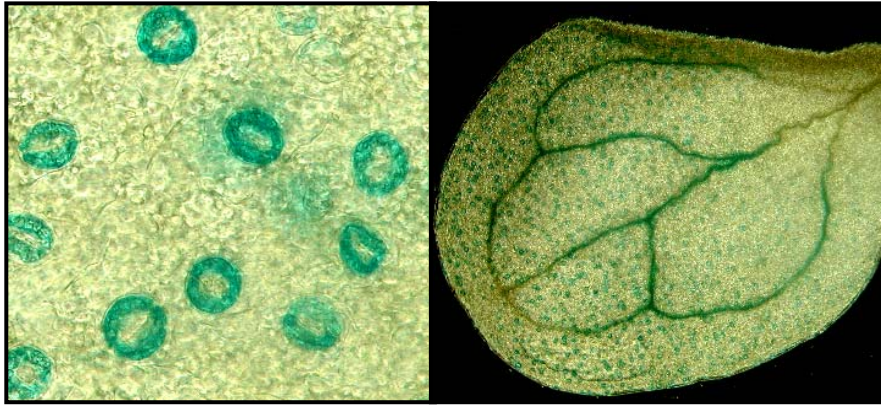
**Abbildung 5.34: Nachweis der direkten Bindung von *AtbZIP53* an den Promotor von *ASN1* durch ChIP.** Für die präzipitierten Chromatin-Fragmente wurde die Vernetzung aufgehoben, und die Menge von enthaltenen *asn1*-Promotorfragmenten über eine quantitative PCR mit den Primern *ASN1chip for* und *ASN1chip rev* ermittelt. Der Abgleich des DNA-Hintergrundes erfolgt über eine quantitative PCR mit den Kontrollprimern *AtcwINV2gstFOR* und *AtcwINV2gstREV*.

## 5.7 **AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 sind an der Antwort auf abiotischen Stress beteiligt**

Für Gruppe S1 Homologe aus unterschiedlichen Pflanzenspezies wird eine Beteiligung an der Antwort auf abiotischen Stress vermutet. Viele von ihnen zeigen eine Induktion durch Kälte (Aguan *et al.*, 1993, 223; Ito *et al.*, 1999; Kusano *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2001) oder Salz (Kusano *et al.*, 1995). Für die *ProDH* hingegen, die in *35S:AtbZIP53* und *35S:AtbZIP1* Pflanzen eine erhöhte Expression zeigt, wird eine Funktion in der Erholung von abiotischem Stressen vermutet (Hare und Cress, 1997), und es wurde eine Repression durch abiotischen Stress gezeigt (Kiyosue *et al.*, 1996; Verbruggen *et al.*, 1996). Für Pflanzen mit einer durch ein Antisense-Konstrukt reprimierten Expression der *ProDH* wurde eine erhöhte Resistenz gegen Salz- und Kältestress gezeigt (Nanjo *et al.*, 1999), die auf eine verstärkte Prolin-Akkumulation zurückgeführt wird. Es gibt also Hinweise für eine positive wie auch eine negative Funktion der in dieser Arbeit untersuchten AtbZIP-Transkriptionsfaktoren in der Antwort auf abiotischen Stress.

### 5.7.1 **AtbZIP53 wird in Schließzellen exprimiert**

Histochemische Färbungen von auf MS-Medium mit 2% Saccharose angezogenen *Pro<sub>AtbZIP53</sub>:GUS* Pflanzen zeigten eine deutliche GUS-Aktivität in Schließzellen (Abbildung 5.35). Viele abiotische Stresse, wie Trocken- oder Salzstress, führen zu einer Schließung der Stomata, um Wasserverluste zu vermeiden. Das Schließen der Stomata wird durch das Phytohormon Abscisinsäure (ABA) induziert, das bei Wasserstreß in den Wurzeln gebildet und in die Blätter transportiert wird, so dass dort der ABA-Gehalt steigt. Möglicherweise ist *AtbZIP53* also an der Regulation der Spaltöffnungen durch Wasserstreß beteiligt. Die deutlichsten Färbungen von Stomata fanden sich bei in Sterilkultur angezogenen Pflanzen. In Sterilkulturen herrscht eine sehr hohe Luftfeuchtigkeit und, während der Lichtphase, ein sehr niedriger CO<sub>2</sub>-Gehalt (Hempel, 1993). Möglicherweise ist einer dieser beiden Faktoren für die GUS-Aktivität in Stomata verantwortlich. Sollte *AtbZIP53* an der Regulation von Schließzellen beteiligt sein, könnten Pflanzen mit veränderter Expression von *AtbZIP53* Unterschiede in der Trockenstress-Resistenz zeigen.



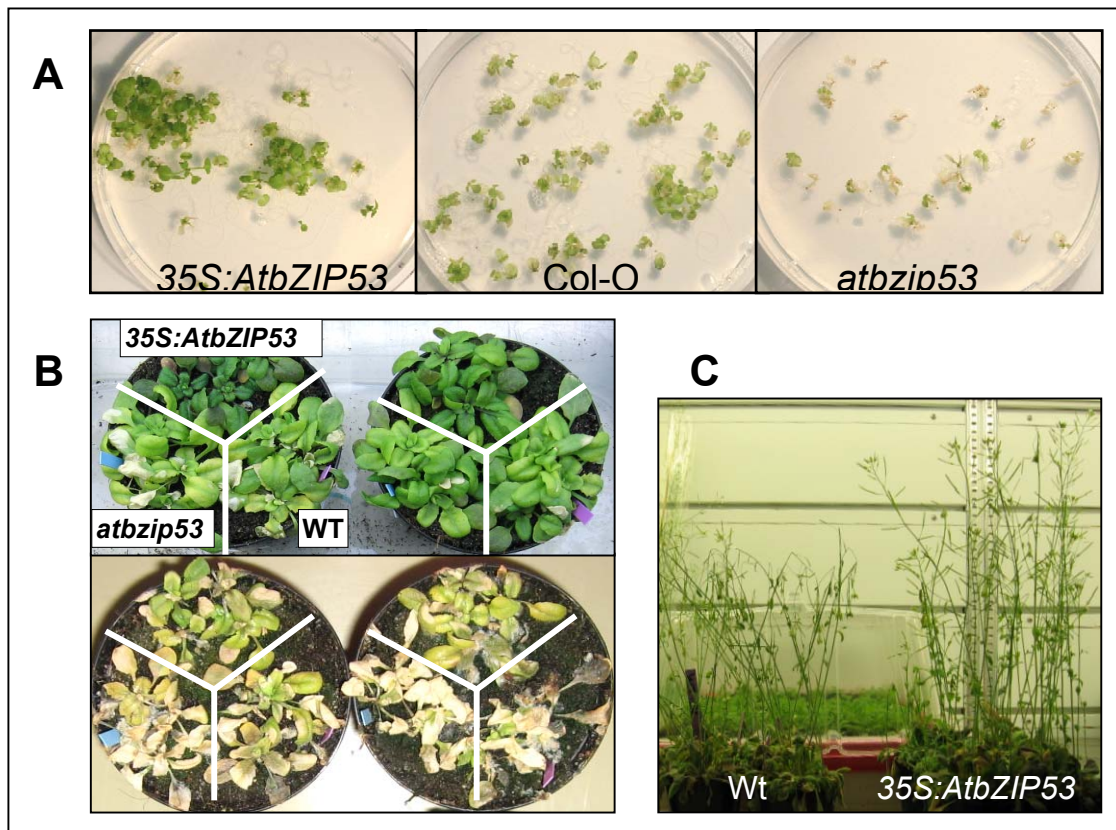
**Abbildung 5.35: Histochemische Färbungen von *Pro<sub>AtbZIP53</sub>:GUS* Pflanzen zeigen eine spezifische Expression in Schließzellen.** Zwei Wochen alte Pflanzen aus einer Sterilkultur auf MS-Medium mit 2% Saccharose wurden über Nacht mit 1mM Xgluc / 1mM Kaliumhexacyanoferrat gefärbt. Die spezifische Expression in Schließzellen ließ sich mit drei unabhängigen *Pro<sub>AtbZIP53</sub>:GUS* Linien reproduzieren.

### 5.7.2 Ektopische Expression von *AtbZIP53* vermittelt eine erhöhte Resistenz gegen Salzstress

*AtbZIP1*, *53*, *9* und *63* Überexpressions-Linien und Mutanten wurden phänotypisch auf eine veränderte Toleranz gegenüber Trocken- oder Salzstress hin charakterisiert. Hierzu wurden verschiedene Ansätze verfolgt. Das Verhalten unter Trockenstress wurde untersucht, indem auf Erde angezogene Pflanzen nicht weiter gegossen wurden. Hier ließen sich jedoch in zwei Wiederholungen keine klaren Unterschiede zwischen den transgenen Linien und den Wildtyp-Kontrollen feststellen (nicht gezeigt). Außerdem wurde die Transpirationsrate von *AtbZIP1* bzw. *AtbZIP53* Überexpressionspflanzen sowie den *atbzip1* und *atbzip53* Mutanten untersucht, indem ganze Pflanzen am Hypokotyl abgeschnitten wurden, und die Transpiration über die Abnahme des Gewichtes der Pflanze verfolgt wurde (nicht gezeigt). Auch hier zeigten sich keine Unterschiede. Desweiteren wurde die Transpirationsrate mit Hilfe eines Porometers gemessen. Jedoch zeigten sich auch hier keine deutliche Unterschiede (nicht gezeigt). In allen diesen Versuchen traten Schwankungen auf, sodass eine veränderte Transpirationsrate für die getesteten transgenen Linien nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann.

Zur Analyse der Keimung unter Salzstress wurden Samen von Wildtyp, *AtbZIP53*-Überexpressionspflanzen und der *atbzip53* Mutante auf MS-Medium mit 0,5%

Saccharose und 200mM NaCl zum Keimen ausgelegt. Samen der *AtbZIP53*-Überexpressionslinie zeigten gegenüber dem Wildtyp ein deutlich besseres Wachstum und grünere Blätter (Abbildung 5.36 A). Die Samen der *atbzip53* Mutante hingegen keimten deutlich schlechter, und die Keimlinge starben früh ab. Anschließend wurde das Verhalten von auf Erde angezogenen Pflanzen untersucht. Dazu wurden etwa zwei Wochen alten Pflanzen mit einer 500mM NaCl-Lösung gewässert. Die Wildtyp-Pflanzen und die *atbzip53* Mutante zeigten eine Woche nach Beginn des Salzstress eine deutliche Chlorosis und starben eine weitere Woche später ab, während dieser Prozess bei den *AtbZIP53*-Überexpressionspflanzen deutlich langsamer abließ (Abbildung 5.36 B). Parallel wurden auch sechs Wochen alte Pflanzen mit 500mM NaCl gewässert. Nach drei Tagen fingen die Infloreszenzen der Wildtyp-Pflanzen an



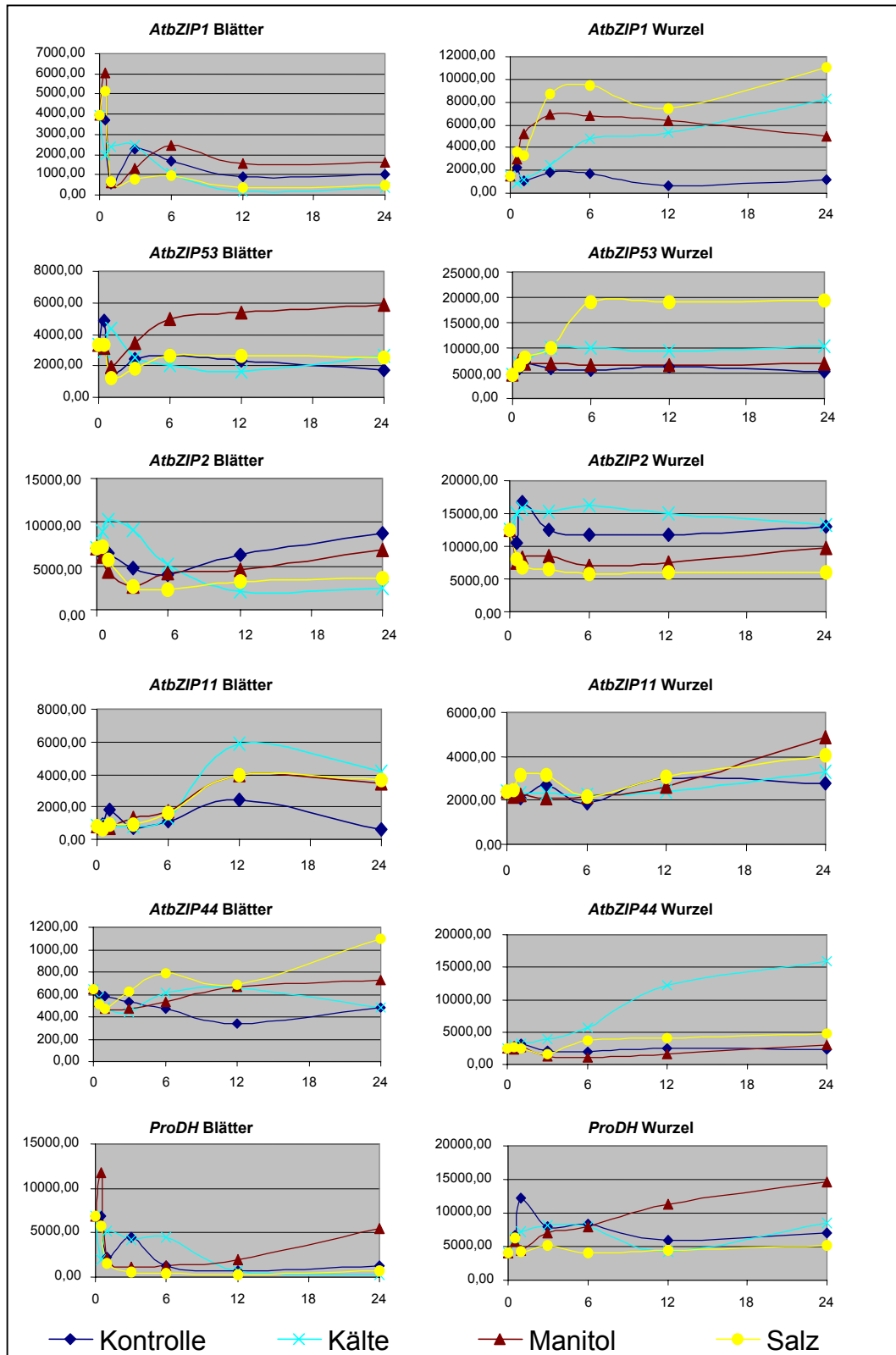
**Abbildung 5.36: Ektopische Überexpression von *AtbZIP53* führt zu einer erhöhten Toleranz gegen Salzstress.** **A:** Samen von Wildtyp-Pflanzen, einer *AtbZIP53* Überexpressionslinien und der *atbzip53* Mutante wurden in Sterilkultur auf 0,5 MS mit 200mM NaCl angezogen. Die *AtbZIP53* Überexpressionslinien zeigte eine erhöhte Resistenz gegen Salzstress. **B:** Wildtyp, eine *AtbZIP53* Überexpressionslinien und die *atbzip53* Mutante wurden zwei Wochen auf Erde angezogen und von da an mit einer 500mM NaCl-Lösung gewässert. Oberes Bild 7 Tage und unteres Bild 14 Tage nach Beginn des Salzstresses. **C:** 6 Wochen alte Pflanzen wurden mit einer 500 mM NaCl Lösung gewässert. Nach drei Tage waren die Infloreszenzen der Wildtyp-Pflanzen umgefallen, während die der *AtbZIP53*-Überexpressionspflanzen noch aufrecht standen

einzuknicken, während die der *AtbZIP53*-Überexpressionspflanzen noch aufrecht standen (Abbildung 5.36 C). Die Salzstressphänotypen wurden mehrfach reproduziert. *AtbZIP1*-Überexpressionslinien oder die *atbzip1* Mutanten sowie Pflanzen mit einer veränderten Expression von *AtbZIP9* oder *AtbZIP63* zeigten keine veränderte Resistenz gegen Salzstress.

### 5.7.3 *AtbZIP*-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 werden durch abiotischen Stress reguliert

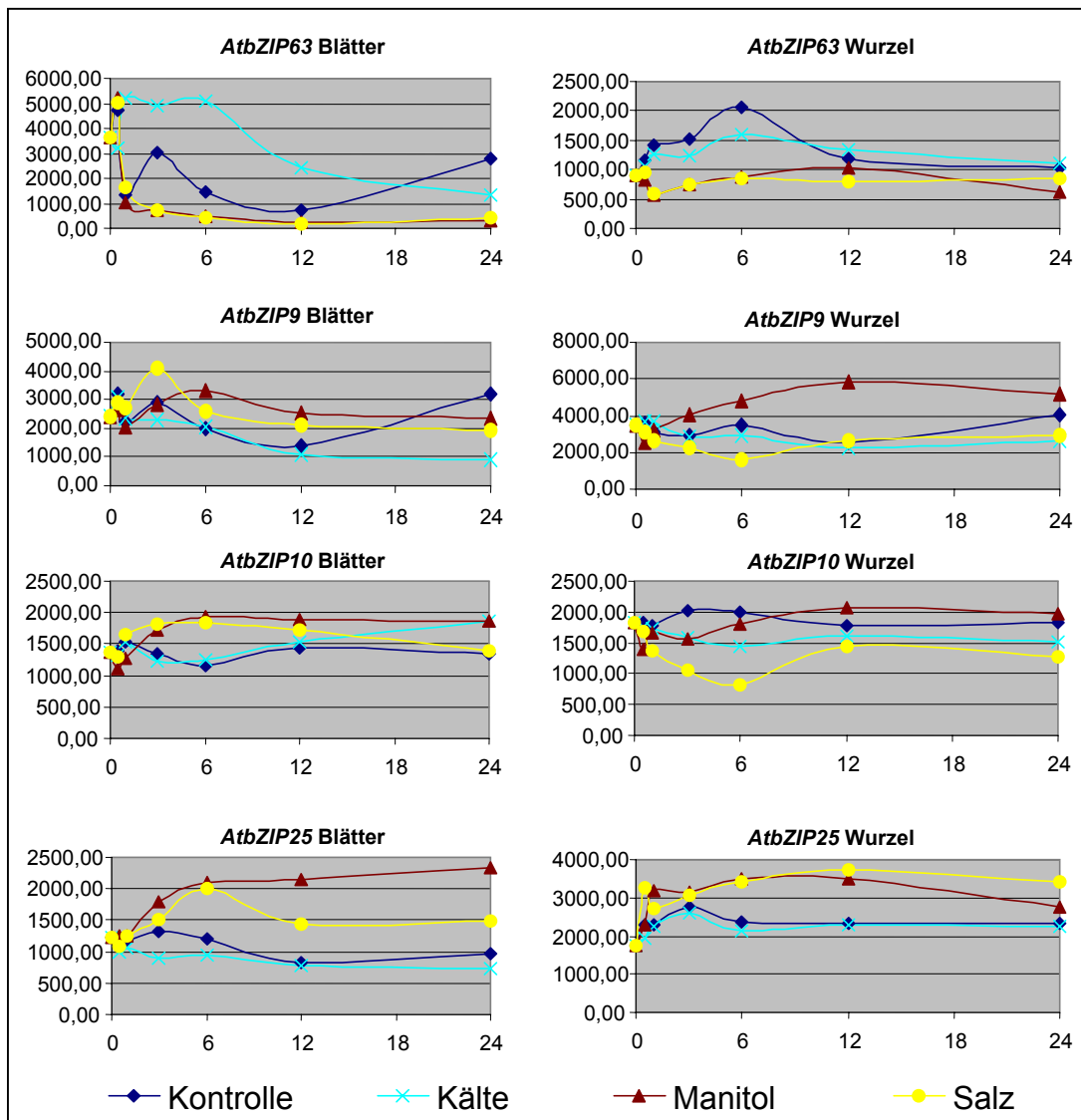
Änderungen des Transkriptoms unter abiotischem Stress wurden bereits mehrfach untersucht (Chen *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2005). Einer der interessantesten der hierzu verfügbaren Datensätze stammt aus dem AtGenExpress Projekt (<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/botanik/mcb/AFGN/atgenex.htm>). Hier wurden Expressionsprofile zu verschiedenen Zeitpunkten nach Kältestress, Salzstress, osmotischem Stress und verschiedenen weiteren Stressen erstellt, wobei das Transkriptom der Wurzeln und der grünen Pflanzenteile jeweils getrennt analysiert wurde. Auf den verwendeten Mikroarrays der Firma Affymetrix sind sämtliche *AtbZIP*-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 vorhanden, sodass sich aus diesen Daten Diagramme der Änderung der Transkriptmengen dieser Faktoren unter den verschiedenen Stressen erstellen lassen (Abbildung 5.37).

In der Tat zeigen mehrere *AtbZIP*-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 deutliche Veränderungen in der Transkription unter den getesteten Bedingungen. Desweiteren fällt auf, dass die Regulation in Blättern und Wurzeln oft deutlich unterschiedlich ist. So wird z.B. *AtbZIP1* in den Blättern durch Kälte deutlich reprimiert, während in den Wurzeln eine ebenso deutliche Induktion zu sehen ist. Für die Gruppe S1 *AtbZIP*-Transkriptionsfaktoren *BZI-3/tbzf* (Strathmann *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001), *mlip* (Kusano *et al.*, 1995) und *lip19* (Aguan *et al.*, 1993) wurde eine Induktion durch Kälte in Blättern beschrieben. Sie werden ihrer Sequenz nach zur Untergruppe der *tbzf*-ähnlichen *bZIP*-Transkriptionsfaktoren gezählt, zu der in *Arabidopsis* nur *AtbZIP1* und *AtbZIP53* gehören, die jedoch beide in Blättern nicht durch Kälte induziert werden.



**Abbildung 5.37a:** Kinetik der Expression von Gruppe S1 AtbZIP-Transkriptionsfaktoren sowie von der *ProDH* nach Kälte-, Salz- oder osmotischem Stress. Transkriptionsanalysen der Gruppe C AtbZIP-Transkriptionsfaktoren sowie nähere Erläuterungen auf der folgenden Seite.

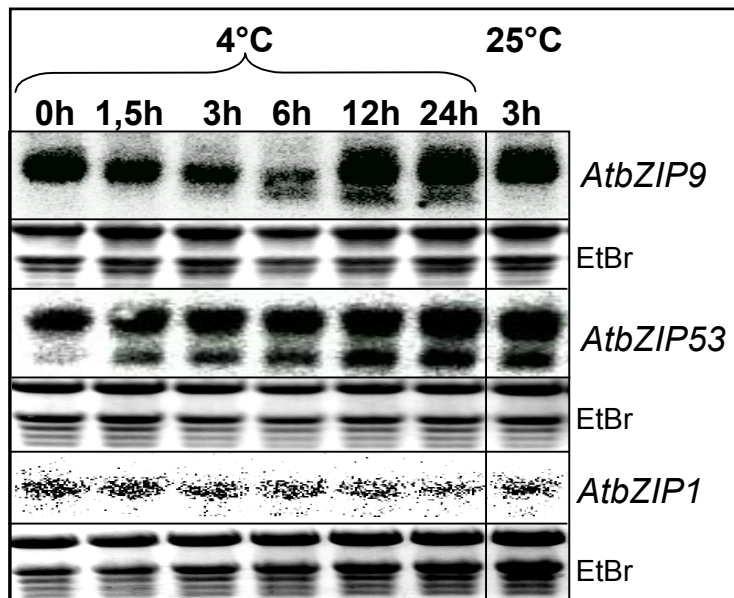




**Abbildung 5.37b: Kinetik der Expression von Gruppe S1 AtbZIP-Transkriptionsfaktoren sowie von der ProDH nach Kälte-, Salz- oder osmotischem Stress.** Die Diagramme basieren auf Daten aus dem AtGenExpress Projekt. Die Experimente wurden mit 16 Tage alten Pflanzen in hydroponischer Kultur durchgeführt. Der Kältestress erfolgte bei 4°C, der osmotische Stress durch Zugabe von 300mM Mannitol zum Hydroponikmedium, der Salzstress durch Zugabe von 150mM NaCl. Die Pflanzen wurden unter Langtagsbedingungen (16h L / 8h D) angezogen. Die Stress-Behandlungen starteten drei Stunden nach Beginn der Lichtphase. Die Kontrollpflanzen wurden parallel zu den gestressten Pflanzen behandelt, d.h. auch sie wurden parallel aus den Klimakammern und dem Hydroponikgefäß genommen und anschließend zurückgestellt.

Für den S1 bZIP-Transkriptionsfaktor *Rdlip* (Ito *et al.*, 1999) wurde unter Kältestress ebenfalls eine wurzelspezifische, kontinuierliche Induktion über 24 Stunden beschrieben, wie sie auch bei *AtbZIP1* zu sehen ist. Es scheint also als hätte sich die Kälteinduzierbarkeit von *tbzf*-ähnlichen AtbZIP-Transkriptionsfaktoren im Laufe der Evolution unterschiedlich entwickelt.

Die Regulation durch Kälte wurde mit auf Erde angezogenen Pflanzen reproduziert (Abbildung 5.38). Dabei zeigte *AtbZIP1*, wie in den AtGenExpress Daten, eine leicht Abnahme der Transkriptmenge unter Kältestress. *AtbZIP9* und *AtbZIP53* verhielten sich anders als in den AtGenExpress Daten, *AtbZIP9* zeigte eine transiente Repression, während *AtbZIP53* leicht induziert wurde. Interessanterweise wird vor allem ein kürzeres Transkript induziert. Da dieses Transkript in der *atbzip53* Mutante ebenso wie das längere nicht detektierbar ist, ist unwahrscheinlich, dass es sich um eine Kreuzhybridisierung handelt. Dagegen spricht auch, dass *AtbZIP1*, das Gen mit der größten Sequenzhomologie zu *AtbZIP53*, definitiv nicht von der *AtbZIP53*-Sonde erkannt wird (Siehe Abbildung 5.38). Es wäre als denkbar, dass es ein zweites, kürzeres, durch Kälte induzierbares Transkript von *AtbZIP53* gibt. Ein solches kürzeres, durch Kälte induzierbares Transkript wird auch mit der *AtbZIP9* Sonde detektiert.



**Abbildung 5.38: Northern Analyse der Expression von *AtbZIP1*, *AtbZIP53* und *AtbZIP9* nach Kältestress.** Es wurden auf Erde angezogene, 20 Tage alte Pflanzen verwendet. Zwei Stunden nach Beginn der Lichtphase wurde der Klimaschrank auf 4°C heruntergekühlt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils mehrere Pflanzen durch Abschneiden am Hypokotyl geerntet. Nach 24 Stunden wurde der Klimaschrank wieder auf 25°C gestellt, und 3 Stunden später eine weitere Probe geerntet. EtBr: Etidiumbromid-Färbung der verwendeten RNA-Gele zum Nachweis gleichmäßiger Beladung.

### 5.7.4 Die wurzelspezifische Induktion eines *Trehalosephosphat-Phosphatase*-Gens nach Salzstress wird durch *AtbZIP1* und/oder *AtbZIP53* vermittelt

Unter den im Mikroarray-Experiment durch *AtbZIP53* aktivierten Genen befinden sich mehrere, die ebenfalls durch Salzstress aktiviert werden. Der Vergleich der Kinetik der Aktivierung durch Salzstress von *AtbZIP1* bzw. *AtbZIP53* mit diesen Genen zeigte vor allem Parallelen zu dem LEA-Gen *AIL1* und einer Trehalose-6-phosphat Phosphatase. Beide werden wie *AtbZIP1* und *AtbZIP53* durch Salzstress nur in den Wurzeln induziert und erreichen nach etwa 6 Stunden ein Maximum (Abbildung 5.39).

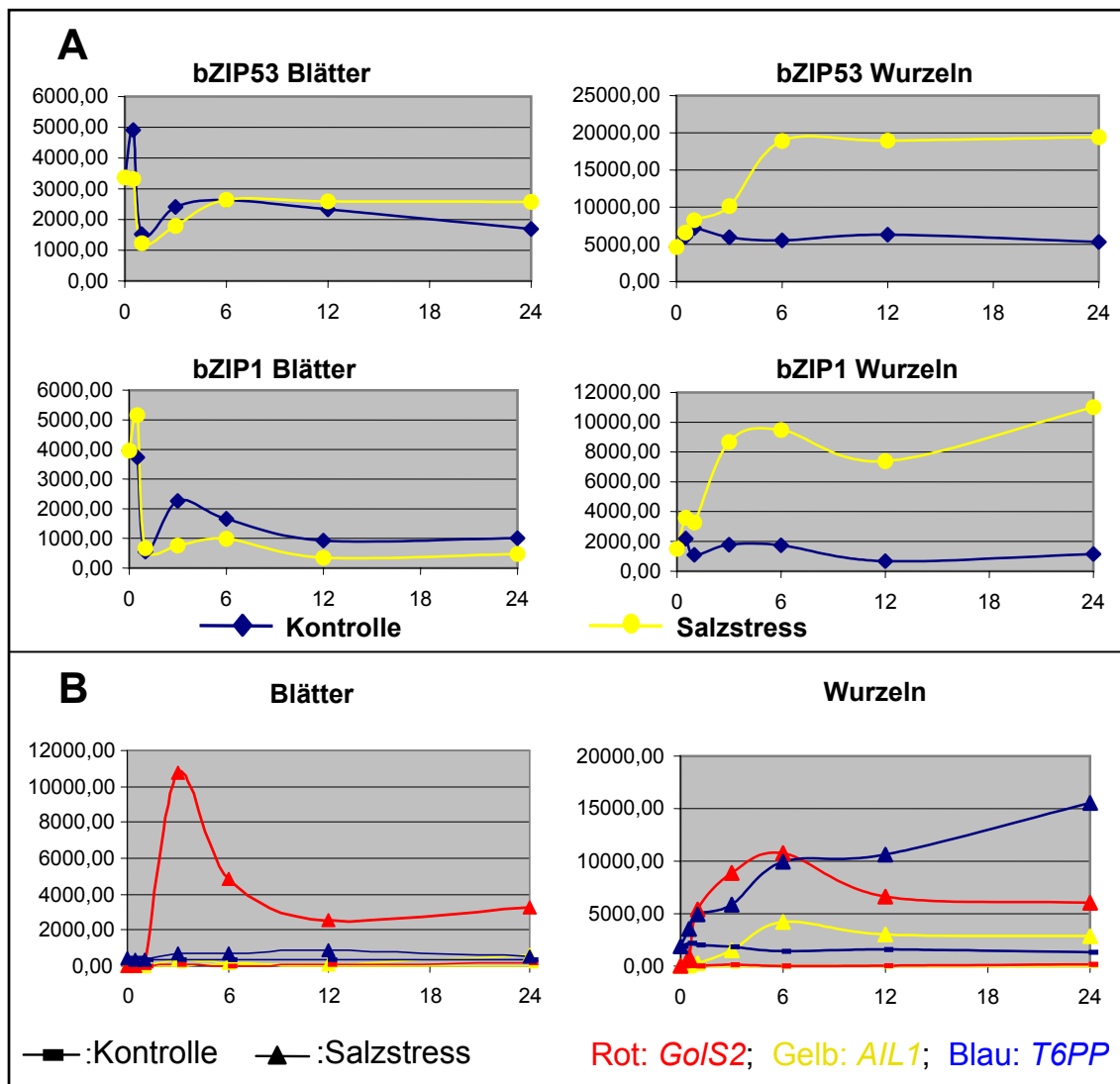
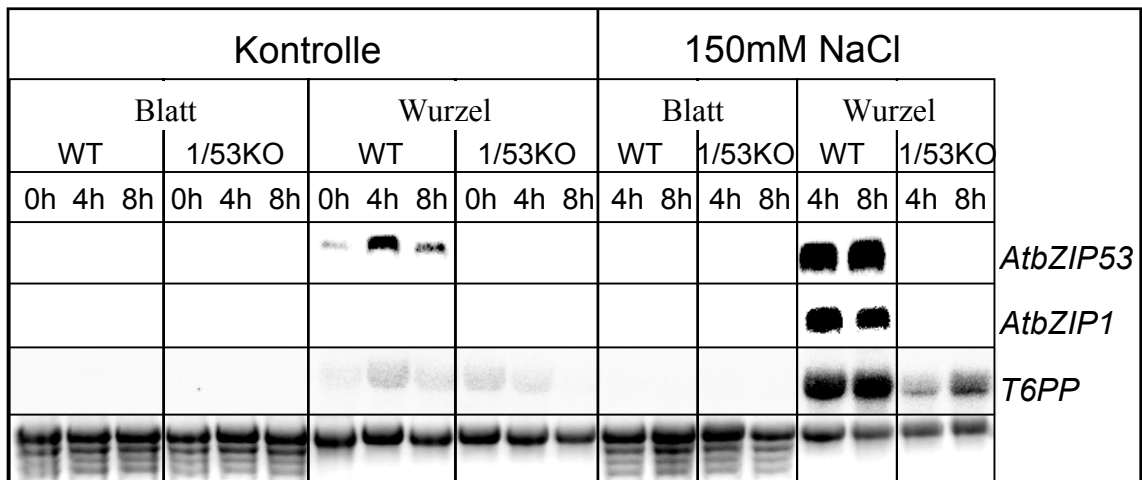


Abbildung 5.39: Kinetik der Salzstress-Induktion von *AtbZIP1*, *AtbZIP53*, sowie von putativen Zielgenen von *AtbZIP53*, einer Galactinol-Synthase (*GoIS2*; At1g56600), eines LEA-Gens (*AIL1*; At3g15670) sowie einer Trehalose-6-phosphat Phosphatase (*T6PP*; At4g22590). Die Diagramme basieren auf Daten aus dem AtGenExpress Projekt (siehe oben).

Andere Salzstress-assoziierte Gene, wie z.B. das einer *Galactinol-Synthase*, zeigen eine andere Kinetik, und keine wurzelspezifische Induktion. Im folgenden wurde untersucht, ob die Induktion dieser Gene in der *atbzip1/atbzip53* Doppelmutante reduziert ist. Die hierzu notwendigen Northern Analysen wurden von Katrin Dietrich im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt. Dabei konnte die wurzelspezifische, starke Induktion von *AtbZIP1*, *AtbZIP53* sowie des *Trehalose-6-phosphat Phosphatase- (T6PP)*-Gens reproduziert werden (Abbildung 5.40). Die Induktion der *T6PP* ist in der *atbzip1/atbzip53* Doppelmutante deutlich reduziert, was belegt, dass *AtbZIP1* und /oder *AtbZIP53* entscheidend an ihrer Induktion durch Salzstress beteiligt sind. Die Expression des LEA-Gens *AIL1* sollte ebenfalls untersucht werden, jedoch lieferten zwei unterschiedliche getestete Northern Sonden keine Signal.



**Abbildung 5.40: *AtbZIP1* und *AtbZIP53* werden nur in der Wurzel durch Salzstress induziert und sind essentiell für die Wurzel-spezifische Induktion einer *T6PP*.** Wildtyp (WT) und *atbzip1/atbzip53* Doppelmutanten (1/53KO) wurden in einer Hydroponik unter Kurztagsbedingungen angezogen. Die Salzstress-Behandlung erfolgte durch Zugabe von NaCl (Endkonzentration 150mM) kurz nach Beginn der Lichtphase. Wurzeln und grüne Pflanzenteile wurden getrennt geerntet. *T6PP*: *Trehalose-6-phosphat Phosphatase (At4g22590)*. Wt: Wildtyp; 1/53KO: *atbzip1/atbzip53* Doppelmutante. Die verwendeten Sonden sind links neben den Northern angegeben. EtBr: Etidiumbromid-Färbung der verwendeten RNA-Gele zum Nachweis gleichmäßiger Beladung.

## 5.8 AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 sind an der Samenentwicklung beteiligt

In dem Transkriptomanalyse Experiment mit *35S:AtbZIP53* Pflanzen wurde gezeigt, dass die Überexpression von AtbZIP53 zur Aktivierung von *12S* und *2S* Samenspeicherprotein-Genen führte. (Lara *et al.*, 2003) konnten nachweisen, dass AtbZIP10 und AtbZIP25 an ein *ACGT*-Element im Promotor eines dieser Gene, *2SI*, binden und dessen Transkription aktivieren können. Eine Beteiligung von AtbZIP10 und AtbZIP25 an der Regulation der anderen Samenspeicherprotein-Gene ist wahrscheinlich, da diese eine ähnliche Promotorstruktur aufweisen. Da in dieser Arbeit für AtbZIP10 und AtbZIP25 eine bevorzugte Bildung von Heterodimeren mit AtbZIP53 gezeigt wurde, ist anzunehmen, dass AtbZIP10/53 bzw. AtbZIP25/53 Heterodimere an der Regulation von Samenspeicherprotein-Genen beteiligt sind.

### 5.8.1 AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppe S1 zeigen eine gegenläufige Expressionskinetik während der Samenentwicklung

Die Samenentwicklung lässt sich in zwei Phasen unterteilen. In der ersten Phase, in der Zellteilungen vorherrschen, entwickelt sich die Zygote und das Endosperm wird angelegt. Während der zweiten Phase findet kaum noch Zellteilung statt, der Samen lagert Nährstoffe ein und wird Austrocknungs-resistent. Sie endet mit Wasserentzug und der Samenruhe (Borisjuk *et al.*, 2004).

Expressionsdaten zu verschiedenen Stadien der Samenentwicklung stehen aus Mikroarrayexperimenten zur Verfügung (Schmid *et al.*, 2005). Anhand dieser Daten wurde die Expression von AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 sowie von in Samen exprimierten putativen Zielgenen von *AtbZIP53* verglichen (Abbildung 5.41). Für die Entwicklung vom späten globulären Stadium (Stadium 3) bis zum späten Herzstadium (Stadium 5) wurden ganze Schoten für die Transkriptomanalysen verwendet, für die weiteren Entwicklungsstadien nur Samen.

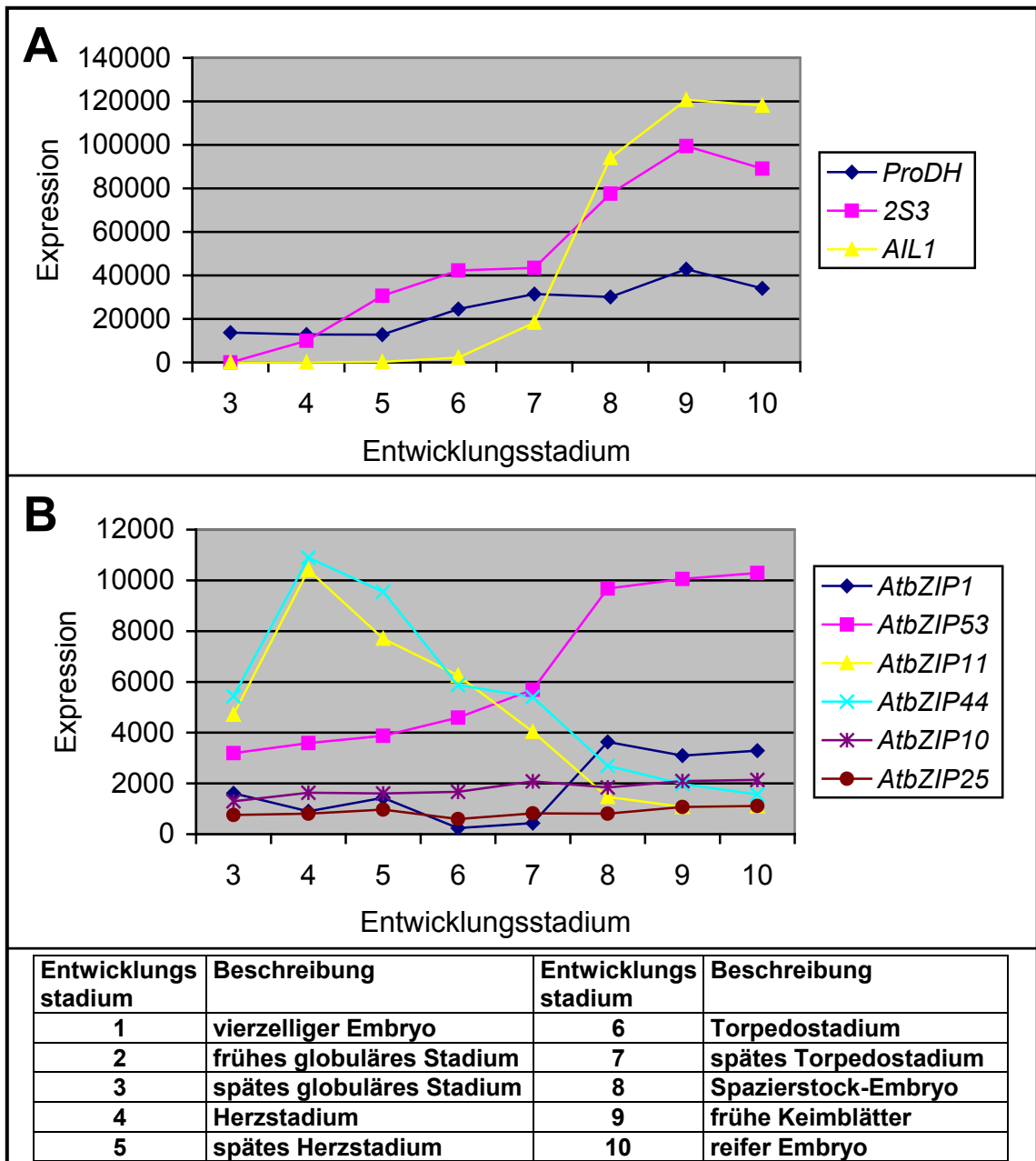
Das Transkript von *AtbZIP53* ist bereits in Stadium 3 nachzuweisen, und die Transkriptmenge steigt während der Samenentwicklung kontinuierlich an. Die von *AtbZIP53* in reifen Samen gemessene Transkription gehört zu den stärksten, die für

dieses Gen in Mikroarray-Datenbanken zu finden sind. Die Kinetik der Expression von *AtbZIP53* entspricht der von Samenspeicherprotein-Genen, von denen hier *2S3* als Beispiel gezeigt wird. *AtbZIP1* hingegen ist im Stadium 6 kaum exprimiert, die Expression steigt dann aber während der Samenreifung stark an, und entspricht mehr dem Expressionsmuster von LEA (late embryogenesis abundant) Genen, von denen hier *AIL1* als Beispiel gezeigt wird. Die Transkriptmenge der *ProDH* nimmt vergleichbar zu der von *AtbZIP53* während der Samenentwicklung zu, und im reifen Samen wird die *ProDH* stark exprimiert.

Interessanterweise sind die zur Gruppe S1 gehörenden Faktoren *AtbZIP11* und *44* zu Beginn der Samenentwicklung deutlich exprimiert, und die Expression nimmt während der Samenreifung ab. Sie sind also gegenläufig zu *AtbZIP1* und *53* reguliert. *AtbZIP10* und *AtbZIP25*, für die eine Beteiligung an der Samenentwicklung gezeigt wurde, zeigen nur eine sehr leichte Zunahme der Transkription, während sich die Transkriptmengen von *AtbZIP2*, *9* und *63* (nicht gezeigt) während der Samenentwicklung praktisch nicht ändern.

Für *AtbZIP10* und *AtbZIP25* wird vermutet, dass sie ABI3, ein ebenfalls an der Regulation von Samenspeicherprotein-Genen beteiligter Transkriptionsfaktor, als Koaktivator binden. Eine direkte Interaktion von *AtbZIP10* und *AtbZIP25* mit ABI3 konnte in "Yeast Two-Hybrid" Tests gezeigt werden (Lara *et al.*, 2003). Daher wurde getestet, ob *AtbZIP53* ebenfalls mit ABI3 interagiert. In "Yeast Two-Hybrid" Tests konnte zunächst keine Interaktion nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Jedoch konnte von der Arbeitsgruppe unseres Kollaborationspartners Dr. Jesus Vicente-Carbajosa in "Yeast Three-Hybrid" Tests gezeigt werden, dass *AtbZIP53* in Gegenwart von *AtbZIP10* mit ABI3 interagiert.

Ein an der Regulation von LEA-Genen beteiligter *AtbZIP*-Transkriptionsfaktor ist ABI5 (Lopez-Molina *et al.*, 2002). Daher wurde In "Yeast Two-Hybrid" Tests untersucht, ob *AtbZIP*-Transkriptionsfaktoren der Gruppe C und S1 mit ABI5 interagieren. Jedoch konnte auch hier keine Interaktion nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

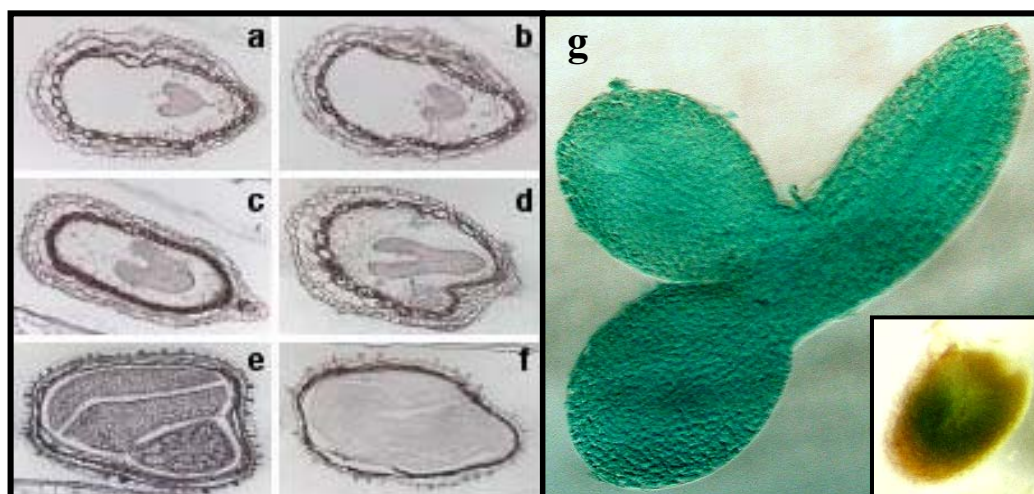


**Abbildung 5.41: Kinetik der Transkription von den AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 sowie von Samen-assoziierten putativen Zielgenen.** **A:** Kinetik der Transkription von den Genen *2S3*, *AIL1* und *ProDH* während der Samenentwicklung. **B:** Kinetik der Transkription von verschiedenen AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 während der Samenentwicklung. *AtbZIP2*, *9* und *63* werden in Samen nur sehr schwach exprimiert. Die Tabelle unter den Diagrammen listet die den in den Diagrammen angegebenen Zahlen entsprechenden Entwicklungsstadien auf. Die Diagramme basieren auf Daten aus Mikroarrayexperimenten von Schmid *et al* (2005), jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert aus 3 biologischen Replikaten.

### 5.8.2 *AtbZIP53* wird während der Samenreifung im Embryo und in der Aleuronschicht exprimiert

Die Expression von *AtbZIP53* während der Samenentwicklung wurde auch histologisch untersucht. Dazu wurden von dem Labor von Dr. Jesus Vicente-Carbajosa Schnitte von Samen verschiedener Entwicklungsstadien erstellt, und in diesen Schnitten über *in situ* Hybridisierungen das Transkript von *AtbZIP53* nachgewiesen (Abbildung 5.42 a-f). Während des Herz- und Torpedostadiums ist im Embryo noch kein Transkript nachzuweisen, dagegen zeigt sich im Torpedostadium schon eine Expression in der Aleuronschicht. Die Aleuronschicht zeichnet sich durch Protein- und Lipid-speichernde Organellen (Proteinbodies und Oleosomen) aus und dient dem Samen neben den Keimblättern als zusätzlicher Nährstoffspeicher. Im reifen Embryo ist das Transkript von *AtbZIP53* deutlich nachzuweisen. Die Transkripte von *AtbZIP10* und *AtbZIP25*, den Heterodimerisierungspartnern von *AtbZIP53*, konnten ebenfalls im Embryo und in der Aleuronschicht nachgewiesen werden (Lara *et al.*, 2003), die Faktoren sind in Samen also kolokalisiert.

Die Expression von *AtbZIP53* wurde darüber hinaus auch in histochemisch gefärbten Samen von *Pro<sub>AtbZIP53</sub>:GUS* Pflanzen untersucht. Auch hier zeigt sich eine deutliche Expression im reifen Embryo (Abbildung 5.42 g).



**Abbildung 5.42: Histologischer Nachweis der Expression von *AtbZIP53* in der Samenentwicklung.** Linke Seite, a-f: *in situ* Hybridisierungen von Samen in verschiedenen Entwicklungsstadien. a,b: Herzstadium; b,c: Torpedostadium; e,f: reifer Embryo. a,c,e: *AtbZIP53* antisense Sonde und b,d,f: *AtbZIP53* sense Sonde. Die Bilder der *in situ* Hybridisierungen wurden von Dr. Jesus Vicente-Carbajosa zur Verfügung gestellt. g: Histochemische Färbung eines reifen Embryos aus Samen einer *Pro<sub>AtbZIP53</sub>:GUS* Linie. Unten rechts ist ein gefärbter Embryo innerhalb der Samenschale gezeigt.



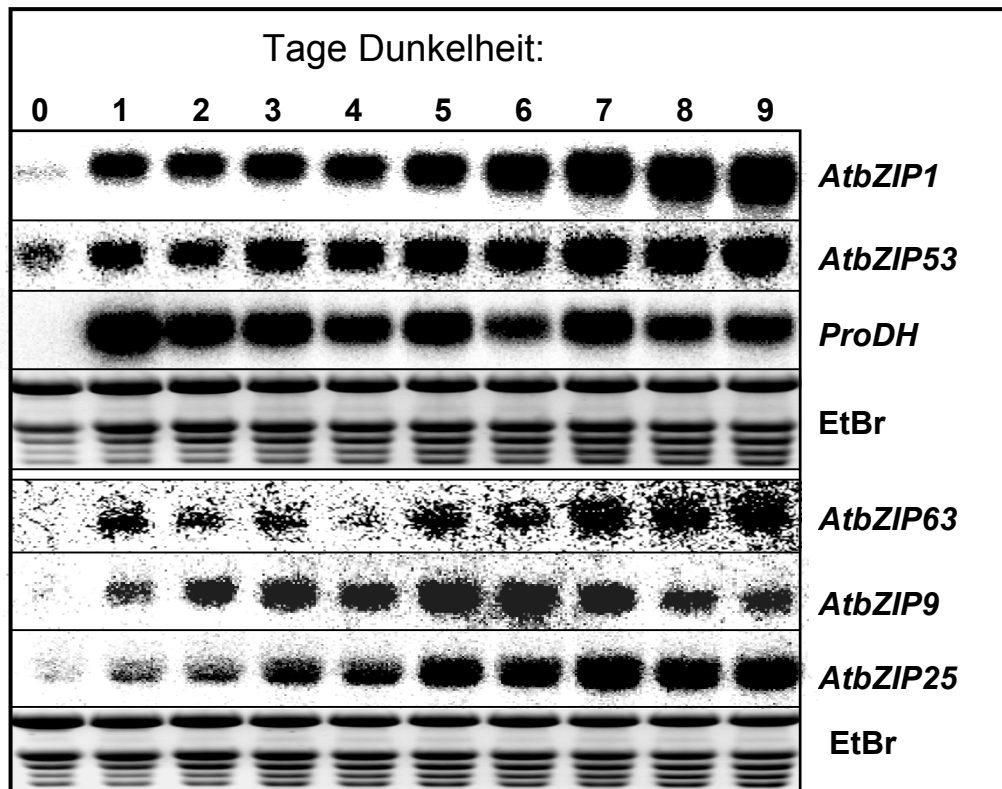
## 5.9 AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 sind Regulatoren natürlicher und induzierter Seneszenz

Bei der Untersuchung zur Regulation von Gruppe C/S1 AtbZIP-Transkriptionsfaktoren durch Zucker oder Osmolarität in Kapitel 5.4 zeigte sich, dass *AtbZIP1*, *53*, *9* und *63* deutlich durch Dunkelheit induziert werden. Dunkel-induzierte Gene sind häufig auch während der Seneszenz induziert (Fujiki *et al.*, 2001). Lin und Wu (2004) konnten in Mikroarray-Experimenten zu Dunkel-induzierter Seneszenz zeigen, dass 40% der 65 auf den verwendeten "Affymetrix whole genome arrays" vertretenen AtbZIP-Transkriptionsfaktoren während der Seneszenz induziert werden, während nur 3% reprimiert werden. Möglicherweise hat also die Klasse der bZIP-Transkriptionsfaktoren eine besondere Bedeutung in der Dunkel-induzierten Seneszenz. Für den Gruppe S1 bZIP-Transkriptionsfaktoren *tbzf* aus Tabak konnte ebenfalls eine Induktion während der Seneszenz gezeigt werden (Yang *et al.*, 2001). Daher wurde im folgenden die Funktion von AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 als Regulatoren natürlicher und induzierter Seneszenz untersucht.

### 5.9.1 *AtbZIP1*, *AtbZIP53*, *AtbZIP9*, *AtbZIP25* und *AtbZIP63* werden durch Seneszenz induziert

Um zu untersuchen, wie sich die Expression der AtbZIP-Transkriptionsfaktoren im Laufe der Dunkel-induzierten Seneszenz verändert, wurden 25 Tage alte, unter Langtagsbedingungen angezogene, *Arabidopsis* Col-O Wildtyp Pflanzen in einem Klimaschrank unter kontrollierter Temperatur und Luftfeuchtigkeit dunkelgestellt. Ausgelegt waren 7 Pflanzen pro Topf, wobei auf eine gleichmäßige Verteilung der Pflanzen geachtet wurde, um gegenseitige Beschattung zu vermeiden. Zu Beginn der Dunkel-Induktion (11 Stunden nach Beginn der Lichtphase) wurden alle Pflanzen eines Topfes geerntet, indem sie am Hypokotyl abgeschnitten wurden. Von nun an wurde alle 24 Stunden eine weitere Probe geerntet, bis die Pflanzen nach 9 Tagen anfangen abzusterben. Anschließend wurde die Expression von AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 in diesen Proben in Northern Analysen untersucht (Abbildung 5.43).

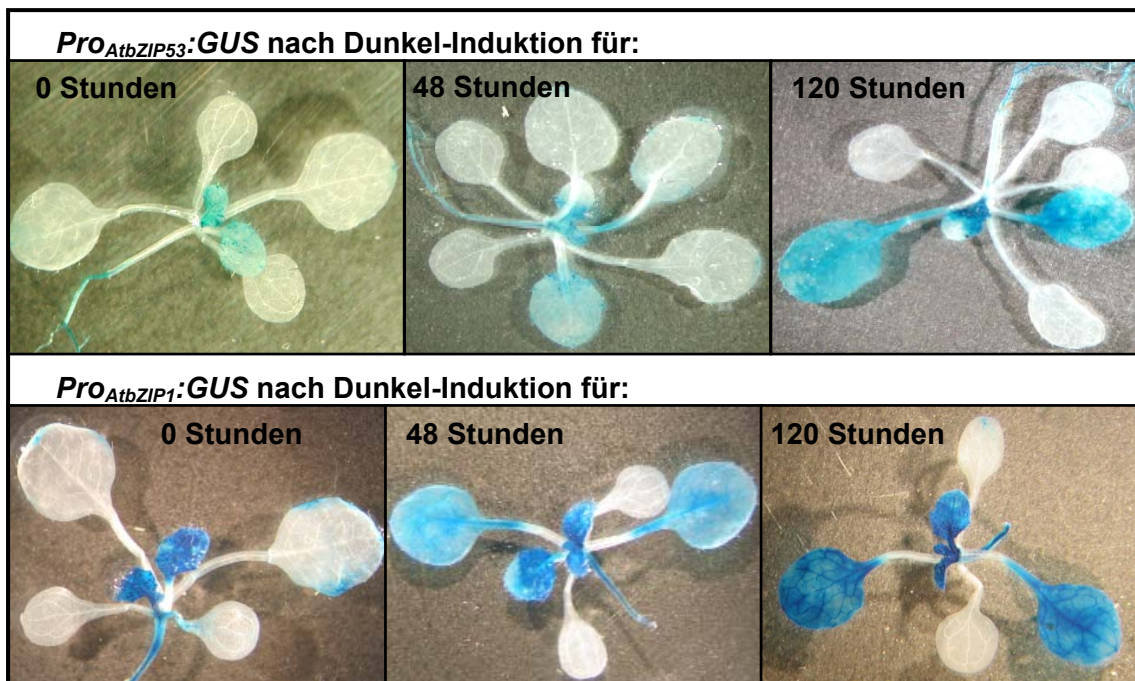
Alle fünf untersuchten Faktoren zeigen eine Induktion nach einem Tag Dunkelheit. Zu einem zusätzlichen Anstieg der Transkriptmengen kommt es im Verlauf der Dunkel-induzierten Seneszenz in den folgenden Tagen. Hier zeigen die verschiedenen *AtbZIP*-Transkriptionsfaktoren interessanterweise eine unterschiedliche Kinetik. Die Transkriptmenge von *AtbZIP9* steigt bis zum fünften Tag, an dem die Pflanzen beginnen eine Gelbfärbung zu zeigen, und sinkt danach wieder. *AtbZIP25* und *AtbZIP53* erreichen am siebten Tag ein Maximum, jedoch steigt die Transkriptmenge von *AtbZIP25* bis hierhin kontinuierlich an, während *AtbZIP53* bereits nach einem Tag deutlich induziert ist, und der weitere Anstieg vergleichsweise gering ist. *AtbZIP63* wird zwar nach einem Tag Dunkelheit induziert, danach sinkt die Transkriptmenge jedoch wieder bis zum vierten Tag, um in der Endphase der Seneszenz wieder zu steigen.



**Abbildung 5.43: Northern Analysen der Kinetik der Transkription von *AtbZIP*-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 während der Dunkel-induzierten Seneszenz.** 25 Tage alte, unter Langtagsbedingungen angezogene *Arabidopsis* Pflanzen wurden in einem Klimaschrank unter kontrollierter Temperatur und Luftfeuchtigkeit dunkelgestellt. Der Null-Zeitpunkt (Beginn der Dunkel-Induktion) wurde 11 Stunden nach Beginn der Lichtphase geerntet. Die Pflanzen wurden im Dunkeln geerntet, indem sie am Hypokotyl abgeschnitten wurden. Alle 24 Stunden wurde eine weitere Probe geerntet, bis die Pflanzen nach 9 Tagen anfangen abzusterben. Aus dem geernteten Material wurde RNA extrahiert und in Northern Analysen auf die Transkripte der verschiedenen *AtbZIP*-Transkriptionsfaktoren sowie der *ProDH* untersucht. Ein Transkript von *AtbZIP10* konnte nicht detektiert werden. EtBr: Etidiumbromid-Färbung der verwendeten RNA-Gele zum Nachweis gleichmäßiger Beladung.

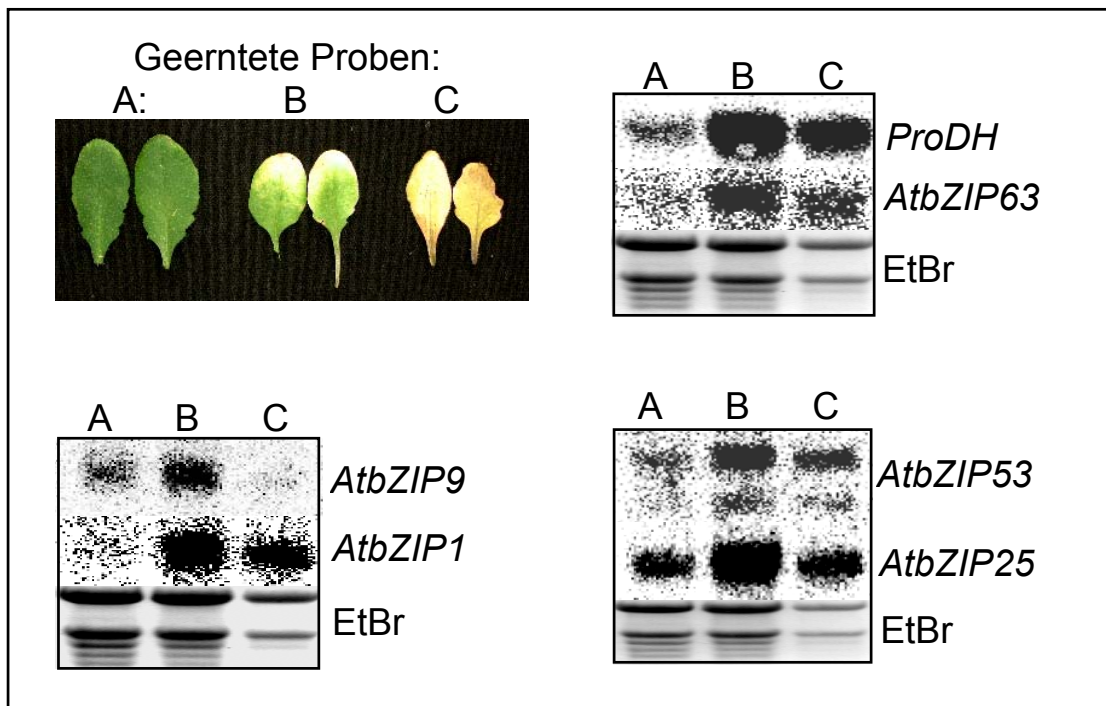
Die Expression von *AtbZIP1* steigt bis zum letzten Tag kontinuierlich an. Im Vergleich zu den *AtbZIP*-Transkriptionsfaktoren wurde auch die Transkription der *ProDH* analysiert. Hier ist zwar eine deutliche Dunkel-Induktion zusehen, aber keine weitere Induktion durch Dunkel-induzierte Seneszenz.

Um zu überprüfen, in welchen Geweben die Dunkel-Induktion von *AtbZIP1* und *AtbZIP53* stattfindet, wurden *Pro<sub>AtbZIP1</sub>:GUS* und *Pro<sub>AtbZIP53</sub>:GUS* Linien dunkelgestellt und zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet und gefärbt. Die Pflanzen wurden unter Langtagsbedingungen angezogen. Damit alle Proben parallel gefärbt werden konnten, und die Pflanzen in vergleichbaren Entwicklungsstadien waren, wurden die Pflanzen zeitlich versetzt ausgelegt, so dass alle Pflanzen, unabhängig von der Dauer der Dunkel-Induktion, gleich viele Tage im Licht gewachsen waren. Nach 20 Tagen im Licht wurden die Pflanzen für bis zu 5 Tage in Dunkelheit gestellt, und anschließend histochemisch gefärbt. Sowohl *Pro<sub>AtbZIP1</sub>:GUS* als auch *Pro<sub>AtbZIP53</sub>:GUS* Linien zeigen im Laufe der Dunkel-Induktion, entsprechend zu den Northern-Daten, einen deutlichen Anstieg der GUS-Aktivität (Abbildung 5.44). Dabei steigt die auch bei Licht vorhandene GUS-Aktivität in den jüngsten Blättern, und es kommt zu einer steigenden GUS-Aktivität in den älteren, größten Blättern. In noch älteren, aber kleineren Blättern, z.B. den Keimblättern, ist kein Anstieg der GUS-Aktivität zu sehen.



**Abbildung 5.44: Histochemische Färbung von *Pro<sub>AtbZIP53</sub>:GUS* und *Pro<sub>AtbZIP1</sub>:GUS* Pflanzen während Dunkel-induzierter Seneszenz.** Die Kontrolle (0 Stunden) wurde 9 Stunden nach Beginn der Lichtphase gleichzeitig mit Pflanzen, die für 48 oder 120 Stunden dunkelgestellt waren, geerntet und 20 Minuten in 90% Aceton fixiert. *Pro<sub>AtbZIP53</sub>:GUS* Linien wurden in 2mM X-Gluc / 1mM Kalium-Hexacyanoferrat gefärbt, *Pro<sub>AtbZIP1</sub>:GUS* Linien in 1mM X-Gluc / 1mM Kalium-Hexacyanoferrat.

Das Transkriptom Dunkel-induzierter Seneszenz hat viele Gemeinsamkeiten mit dem von natürlicher Seneszenz, es existieren aber auch klare Unterschiede. Um zu untersuchen, ob die bZIP-Transkriptionsfaktoren an einem allgemeinen oder einem für die Dunkel-Induktion spezifischen Signalweg beteiligt sind, wurde ihre Expression während der natürlichen Seneszenz in Northern-Analysen untersucht. Dazu wurden von etwa 7 Wochen alten, blühenden Pflanzen grüne, zu etwa 50% gelbe und vollständig gelbe Blätter geerntet und RNA extrahiert. Für die vollständig gelben Blätter war die RNA-Ausbeute sehr niedrig, sodass von diesen Proben entsprechend weniger RNA für die Northern Analysen verwendet wurde. *AtbZIP1*, *AtbZIP53*, *AtbZIP25* und *AtbZIP63* werden, ebenso wie ihr Zielgen *ProDH*, im Verlauf der natürlichen Seneszenz induziert (Abbildung 5.45). Während die Expression von *AtbZIP1*, *53*, *25* und der *ProDH* auch noch in der letzten Phase der Seneszenz, in der die Zellen beginnen abzusterben, deutlich nachweisbar ist, ist *AtbZIP9* in den vollständig gelben Blättern nicht mehr zu detektieren.



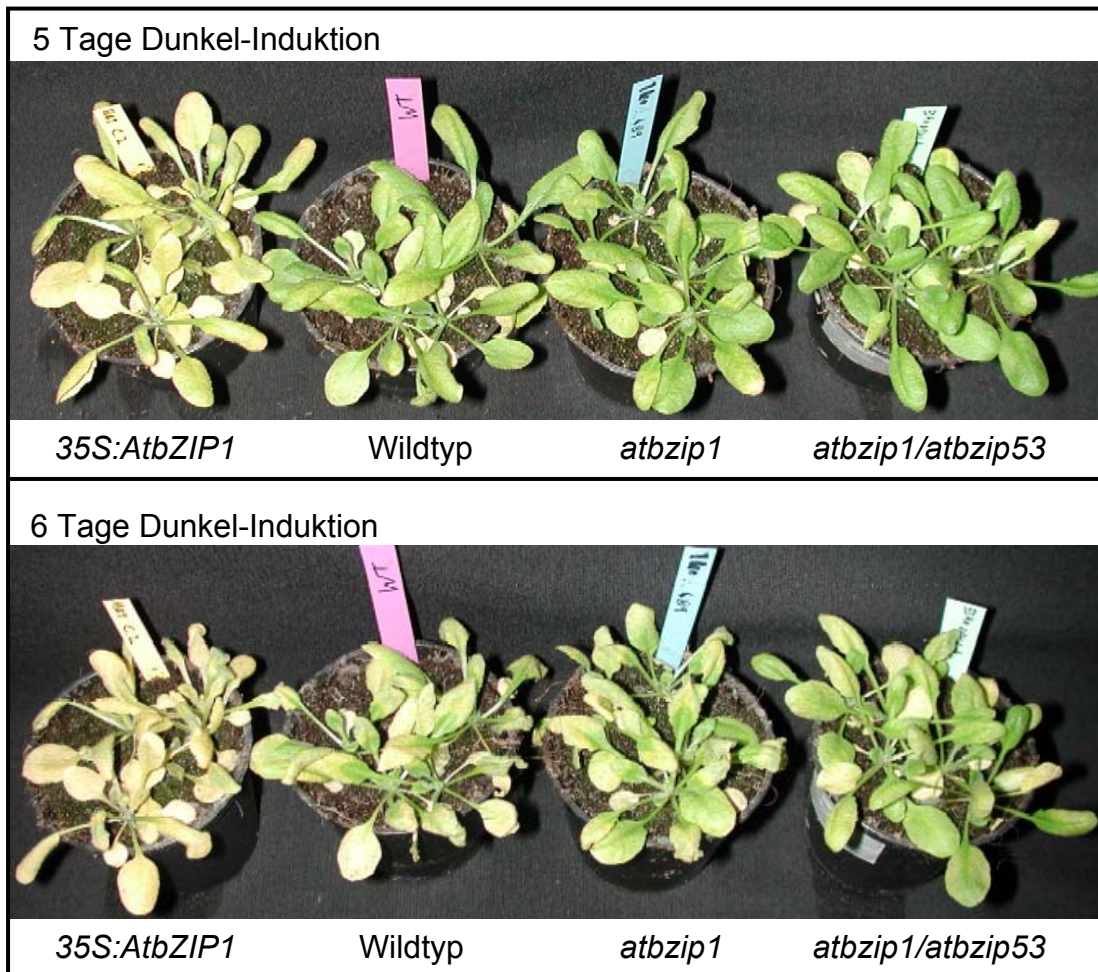
**Abbildung 5.45:** Northern Analyse zeigen, dass *AtbZIP1*, *AtbZIP53*, *AtbZIP9*, *AtbZIP25* und *AtbZIP63*, ebenso wie ihr Zielgen *ProDH*, im Verlauf der natürlichen Seneszenz induziert werden. Geerntet wurden (A) grüne, (B) zu etwa 50% gelbe und (C) vollständig gelbe Blätter. Die RNA-Ausbeute aus gelben Blättern war sehr niedrig, so dass hier nur 2 µg statt der sonst üblichen 10 µg RNA aufgetragen wurden. EtBr: Etidiumbromid-Färbung der verwendeten RNA-Gele zum Nachweis gleichmäßiger Beladung.

### 5.9.2 35S:*AtbZIP1* Linien zeigen ein rascheres Eintreten in die Dunkel-induzierter Seneszenz

Die natürliche Seneszenz ist ein Prozess, der sich über einen langen Zeitraum erstreckt, und der nicht bei allen Blättern gleichzeitig eintritt. Dunkel-Induktion wird häufig als Methode genutzt, um eine Synchronisierung des Seneszenz-Prozesses zu erreichen (Lin und Wu, 2004). Daher wurden verschiedene transgene Linien mit einer veränderten Expression von *AtbZIP1*, *53*, *9* oder *63* dunkelgestellt, um sie auf unterschiedliche Seneszenzphänotypen hin zu untersuchen. Für den Versuch wurden mehrere Samen pro Topf ausgelegt, und nach einer Woche wurden, bis auf vier gleichmäßig verteilte, gleich weit entwickelte Keimlinge, alle übrigen Keimlinge entfernt. So sollten möglichst vergleichbare Bedingungen erreicht werden. Nach weiteren zwei Wochen wurden die Pflanzen dunkelgestellt.

Bereits nach 3 Tagen Dunkelheit zeigten die Pflanzen der 35S:*AtbZIP1* Linie eine deutliche Gelbfärbung, während die anderen Pflanzen alle noch grün waren. Nach 5 Tagen waren die Blätter der *AtbZIP1*-Überexpressionspflanzen fast vollständig gelb, während sich bei Wildtyp Pflanzen erst eine beginnende Gelbfärbung zeigte (Abbildung 5.46). Die *atbzip1* und *atbzip1/atbzip53* Mutanten hingegen zeigten eine leicht verzögerte Seneszenz, wobei der Unterschied am sechsten Tag Dunkelheit noch deutlicher wurde. In der Doppelmutante war dabei die Seneszenz noch etwas stärker verzögert als in *atbzip1*.

Diese Phänotypen wurden mit verschiedenen *AtbZIP1*-Überexpressionslinien, sowohl mit als auch ohne HA-tag, sowie mit beiden zur Verfügung stehenden *atbzip1* Mutanten mehrfach reproduziert. Dabei wurden Pflanzen verschiedener Altersstufen verwendet, wobei sich zeigte, dass die beobachteten Phänotypen nicht altersabhängig sind. Die *AtbZIP9* oder *AtbZIP63* Überexpressionslinien bzw. Mutanten zeigten hingegen keinen Seneszenzphänotyp.

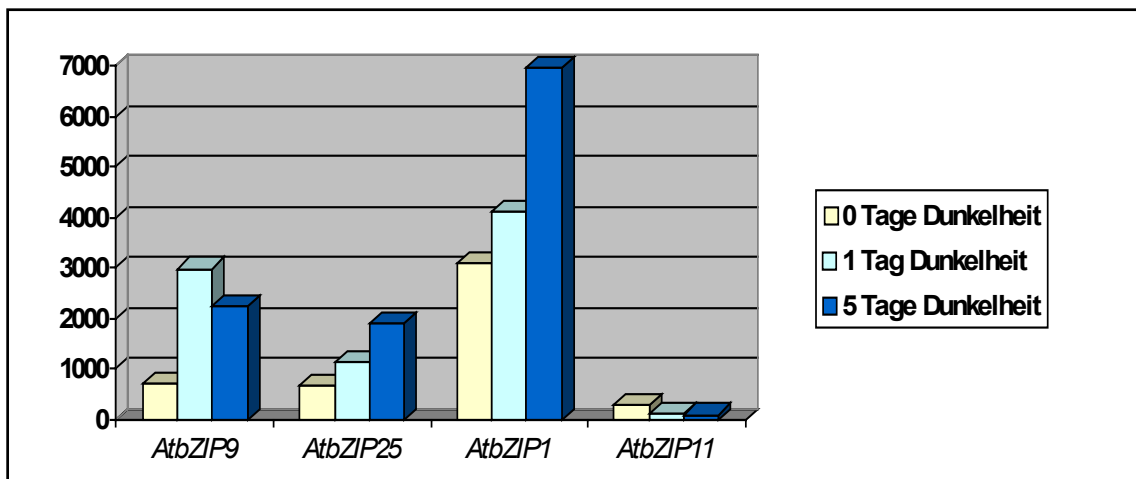


**Abbildung 5.46: Überexpression von *AtbZIP1* führt zu einem früheren Einsetzen Dunkel-induzierter Seneszenz.** Je sechs Töpfe mit Wildtyp Pflanzen, einer *AtbZIP1* Überexpressionslinie sowie den Mutanten *atbzip1* und *atbzip1/atbzip53* wurden 3 Wochen auf Erde angezogen und dann dunkelgestellt. Die Bilder zeigen je einen repräsentativen Topf mit Pflanzen der verschiedenen Linien nach fünf bzw. sechs Tagen Dunkel-Induktion.

### 5.9.3 Transkriptionelle Regulation von *AtbZIP*-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 in Mikroarray-Experimenten zur Seneszenz

Um zusätzliche Daten zur Regulation durch Seneszenz, insbesondere zur Regulation der noch nicht untersuchten Gruppe S1 Mitglieder *AtbZIP1*, *11* und *44* zu erhalten, wurde die Expression der *AtbZIP*-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 in publizierten Mikroarray-Experimenten zur Seneszenz untersucht. Solche Daten stehen zu Dunkel-induzierter Seneszenz (Lin und Wu, 2004), natürlicher Seneszenz (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005), und einer durch Zuckerverarmung in die Seneszenz übergegangenen Zellkultur (Swidzinski *et al.*, 2002) zur Verfügung.

Die Daten zur Dunkel-induzierten Seneszenz wurden unter anderen Bedingungen als die in dieser Arbeit gezeigten gewonnen. Es wurden zwar etwa gleich alte Pflanzen verwendet, jedoch wurden diese unter Kurztagsbedingungen angezogen, und zu Beginn der Lichtphase geerntet. Durch ihre diurnale Regulation sind zu diesem Zeitpunkt *AtbZIP1* und *AtbZIP63* wesentlich stärker exprimiert als in den für die Northern-Analysen geernteten Proben, durch die Anzucht unter Kurztag und die damit verbundene geringere Zucker-Synthese in den Pflanzen wird dieser Effekt möglicherweise nochmals verstärkt. Auch wenn die Induktionen durch die Probennahme des Nullzeitpunktes am Ende einer 16 Stunden langen Dunkelphase kleiner ausfallen, findet sich auch hier eine Induktion von *AtbZIP9*, *AtbZIP25* und *AtbZIP1* (Abbildung 5.47). *AtbZIP11*, dass im Gegensatz zu den anderen AtbZIP-Genen durch Licht und Zucker induziert wird, wird im Lauf der Dunkel-induzierten Seneszenz reprimiert.

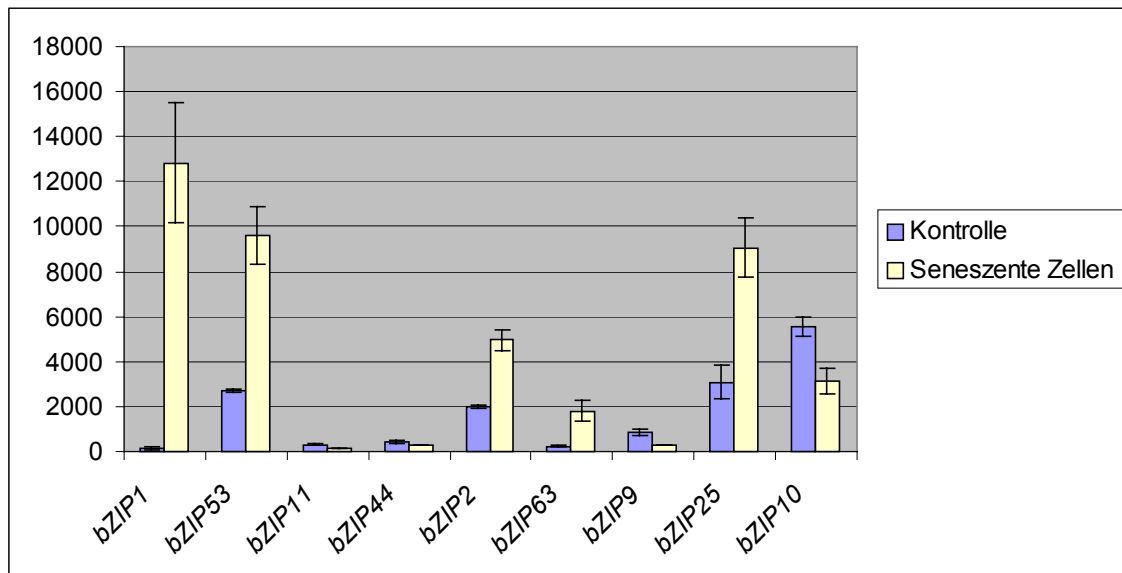


**Abbildung 5.47: Induktion von *AtbZIP9*, *AtbZIP25* und *AtbZIP1* sowie Repression von *AtbZIP11* durch Dunkel-induzierte Seneszenz.** Die Daten stammen aus Transkriptomanalysen von (Lin und Wu, 2004) und wurden mit 22 Tage alten, unter Kurztag-Bedingungen angezogenen *Arabidopsis* Pflanzen gewonnen. Der Nullzeitpunkt wurde eine Stunde nach Beginn der Lichtphase geerntet.

In einem andern Ansatz wurde in einer Zellkultur Seneszenz induziert, d.h. die Zellen wurden über 14 Tage nicht in neues Zellkulturmedium umgesetzt, sodass ein Verhungern der Zellen zu einem Eintreten in die Seneszenz führt (Swidzinski *et al.*, 2002). Diese Form der Seneszenz ist der Dunkel-induzierten Seneszenz ähnlich, da beide letztlich auf Zuckerverarmung zurückzuführen sind, während es sich bei der natürlichen Seneszenz um ein entwicklungsbiologisches Programm handelt. Dementsprechend findet sich hier auch eine zur Dunkel-induzierten Seneszenz vergleichbare Regulation der AtbZIP-Transkriptionsfaktoren, d.h., *AtbZIP1*, 53, 63 und

25 sind induziert, während *AtbZIP11* reprimiert wird. Die hier zu sehende Repression von *AtbZIP9* wird darauf zurückzuführen sein, dass der untersuchte Zeitpunkt in der Endphase der Seneszenz liegt, in der die Zellen bereits Symptome von programmiertem Zelltod (Zusammenbruch der Vakuolen, DNA-Degradation) zeigen. In den Northern Analysen wurde gezeigt, dass die Transkriptmenge von *AtbZIP9* in der zweiten Hälfte der Dunkel-induzierten Seneszenz sinkt.

Besonders stark ist in diesem Experiment die Aktivierung von *AtbZIP1*. Während die Expression dieses Gens in der normalen Zellkultur kaum zu messen ist, ist die Expression in der seneszenten Zellkultur die stärkste, die in den über 1500 in der Genevestigator-Datenbank verfügbaren Mikroarray-Experimenten je für *AtbZIP1* gemessen wurde.

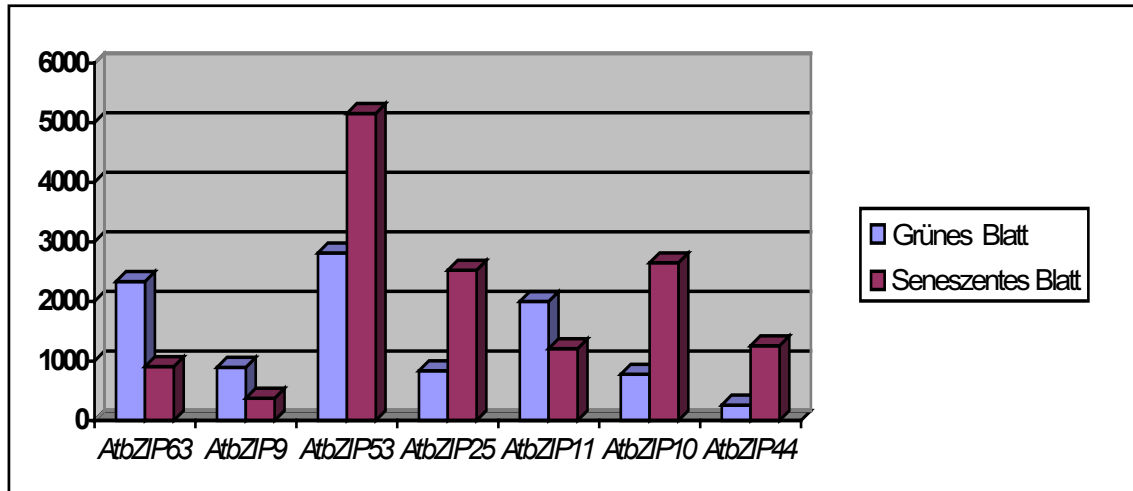


**Abbildung 5.48: Unterschiede der Expression von C/S1 AtbZIP-Transkriptionsfaktoren zwischen einer gesunden und einer seneszenten Zellkultur.** *Arabidopsis* Zellkulturen wurden nicht weiter mit Saccharose versorgt, so dass es zu einem Eintritt in die Seneszenz kam. Als Kontrolle diente eine gesunde Zellkultur (Swidzinski *et al.*, 2002). Der Versuch umfasst zwei biologische Replikate, in dem Diagramm sind Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt. Auf der X-Achse sind die gemessenen absoluten Signalstärken wiedergegeben. Ratios Kontrolle / Seneszenz Zellen: *AtbZIP1*: 84,9; *AtbZIP53*: 3,5; *AtbZIP11*: 0,4; *AtbZIP 2*: 2,5; *AtbZIP63*: 7,6; *AtbZIP 9*: 0,3; *AtbZIP25*: 2,9.

Die natürliche Seneszenz zeigt neben vielen gemeinsamen Eigenschaften auch deutliche Unterschiede zur durch Verhungern induzierten Seneszenz (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005). Diese werden auch in der Regulation der C/S1 AtbZIP-Transkriptionsfaktoren deutlich. Wird *AtbZIP10* in den durch Zuckermangel verursachten Formen der Seneszenz nicht reguliert, findet sich in der natürlichen Seneszenz eine deutliche



Induktion. Das gleiche gilt für *AtbZIP44*. Im Gegensatz dazu werden die stark durch Zuckermangel induzierten Faktoren *AtbZIP1* und *AtbZIP63* in der natürlichen Seneszenz nicht induziert, für *AtbZIP63* findet sich sogar eine Repression. Allen Formen der Seneszenz gemeinsam ist hingegen die Induktion von *AtbZIP25*.



**Abbildung 5.49: Unterschiede in der Expression von AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 zwischen grünen und seneszenten Blättern (natürliche Seneszenz).** Die verwendeten Daten stammen aus dem AtgenExpress Projekt (grüne Blätter: ATGE\_10; senescente Blätter: ATGE\_25), gezeigt wird jeweils der Mittelwert aus drei biologischen Replikaten.

## 5.10 Analyse der Transkriptome von *35S:AtbZIP1* und *atbzip1/atbzip53* Pflanzen

Da AtbZIP1 und AtbZIP53 Transkriptionsfaktoren sind, ist zu erwarten, dass die gezeigten Seneszenz-Phänotypen letztlich auf der veränderten Transkription ihrer Zielgene beruhen. Um differentiell regulierte Gene zu identifizieren, wurde das Transkriptom von *AtbZIP1* überexprimierenden Pflanzen mit dem des Wildtyps nach jeweils zwei Tagen Dunkelinduktion verglichen. Dieser frühe Zeitpunkt wurde gewählt, um die Detektion von Genen zu minimieren, die indirekt durch das schnellere Voranschreiten der Seneszenz in *AtbZIP1* überexprimierenden Pflanzen reguliert werden.

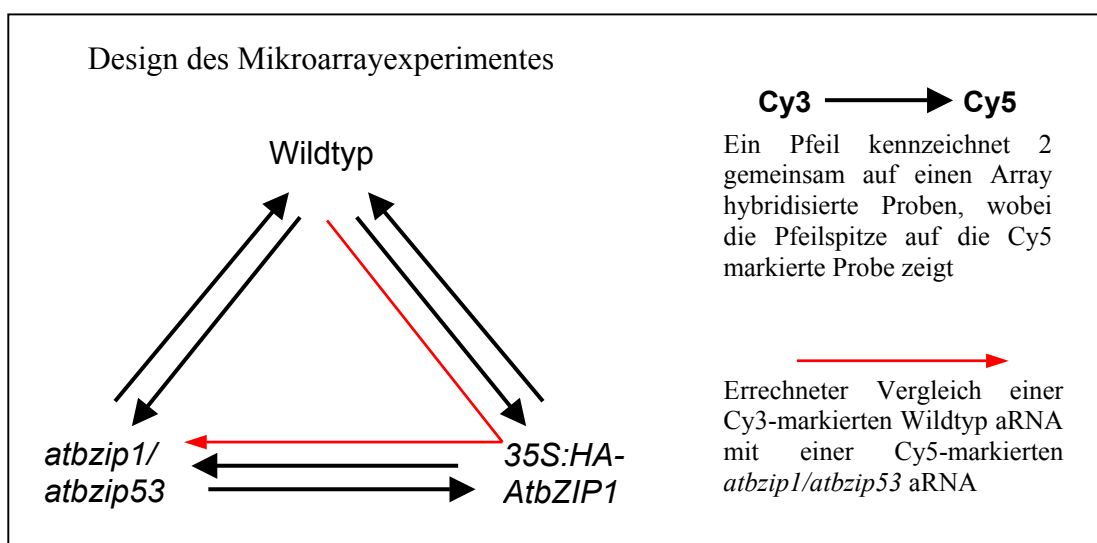
Parallel wurde auch das Transkriptom der *atbzip1/atbzip53* Doppelmutante unter den selben Bedingungen mit dem des Wildtyps verglichen. Die bisherige Erfahrung im Rahmen dieser Arbeit war, dass *atbzip*-Mutanten geringere Unterschiede zum Wildtyp zeigten als die entsprechenden Überexpressionslinien, was möglicherweise auf eine Redundanz zwischen den AtbZIP-Transkriptionsfaktoren zurückzuführen ist. Daher wurde die *atbzip1/atbzip53* Doppelmutante, und nicht eine entsprechende Einzelmutante gewählt. Auf diese Weise wird Redundanz unwahrscheinlicher, und für die identifizierten Gene mit differentieller Expression lässt sich in folgenden Northern Analysen, die zur Reproduktion ohnehin notwendig sind, untersuchen, ob diese Unterschiede durch *atbzip1* oder *atbzip53* verursacht werden, und ob die *atbzip1/atbzip53* Doppelmutante einen verstärkten Effekt auf die Expression hat, was eine Redundanz belegen würde. Die in diesem Kapitel gezeigten Mikroarray Experimente wurden im Gegensatz zu dem aus Kapitel 5.6 nicht in Madrid, sondern im Transkriptomanalyse-Labor in Göttingen durchgeführt.

Für die Transkriptomanalysen wurden Wildtyp-Samen, Samen der *35S:HA-AtbZIP1* Linie C.2 und Samen der *atbzip1/atbzip53* Doppelmutante ausgelegt, und nach einer Woche wurden, bis auf sechs gleichmäßig verteilte, gleich weit entwickelte Keimlinge, alle übrigen Keimlinge entfernt, um möglichst vergleichbare Bedingungen zu erhalten. Nach 20 Tagen wurden die Pflanzen dunkelgestellt, und nach 48 Stunden Dunkelheit geerntet. Dabei wurden für jede Linie vier biologische Replikate geerntet, die jeweils 18 Pflanzen umfassten. Aus den Proben wurde nach dem Trizol-Protokoll RNA extrahiert und diese mit dem RNeasy-Kit von Qiagen aufgereinigt. Die Qualität der RNA wurde

im Bioanalyser überprüft (nicht gezeigt), und im Anschluss wurde die RNA zu Aminoallyl-aRNA amplifiziert. Auf dringendes Anraten des Göttinger Transkriptomanalyse-Labors hin wurden nicht verschiedene biologische Replikate auf verschiedene Arrays hybridisiert, sondern die biologischen Replikate wurden vereinigt, und anschließend wieder in vier identische Proben aufgeteilt, sodass die Analysen letztlich nur mit vier technischen Replikaten durchgeführt wurden. Die anschließende Kopplung der Fluoreszenzfarbstoffe Cy3 bzw. Cy5 an die aRNA fand so statt, dass je zwei Proben mit Cy3 und zwei Proben mit Cy5 gekoppelt wurden, um mögliche Effekte durch die Kopplung mit den unterschiedlichen Farbstoffen auszugleichen (dye swap). Für die Hybridisierung wurden 1,5 µg Cy-aRNA je Probe verwendet, was einer Inkorporation von 100-300 pmol/µg Farbstoff entspricht.

Die Hybridisierung fand nach einem Dreiecksschema statt, so dass jede mögliche Kombination von Proben mit dye swap auf zwei Arrays hybridisiert wurde. Rechnerisch lassen sich dann Daten für zwei weitere Replikate für jede Kombination von Proben gewinnen, in dem die Daten aus den beiden anderen Kombinationen integriert werden (Siehe Abbildung 5.50, der rote Pfeil zeigt beispielhaft den rechnerischen Vergleich einer Wildtyp-Probe mit einer *atbzip1/atbzip53* Probe).

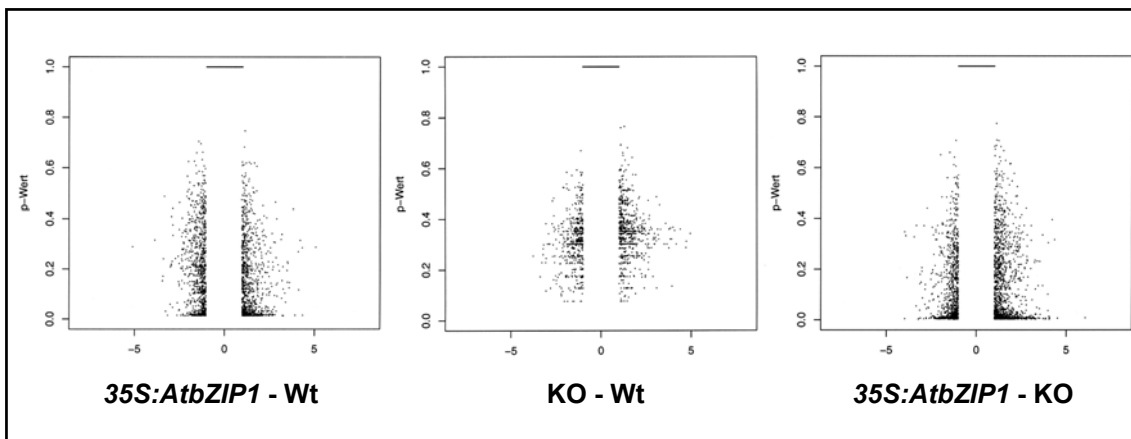
In Abbildung 5.51 ist für jede Kombination der verglichenen Proben der Grad der differentiellen Expression (der Logarithmus des Verhältnisses der für das jeweilige Gen gemessenen Signalstärke zwischen zwei verglichenen Proben, kurz logRatio) gegen die statistische Signifikanz dieses logRatios (p-Wert) aufgetragen. Die statistische



**Abbildung 5.50: Schema des Mikroarrayexperiment Designs.** Vier Wildtyp aRNAs, vier aRNAs der Doppelmutante *atbzip1/atbzip53* und vier *35S:HA-AtbZIP1* aRNAs wurden entsprechend dem Schema auf sechs Arizona whole genome Arrays hybridisiert.

Signifikanz errechnet sich aus den Schwankungen zwischen den technischen Replikaten. Für den Vergleich der Wildtyp aRNA-Proben mit aRNA-Proben aus ektopischen *AtbZIP1* Überexprimierern sieht man, dass unter den statistisch signifikant differentiell exprimierten Genen (p-Wert < 0,05), die in der Überexpressionslinie aktivierten Gene überwiegen (positives logRatio). Dies entspricht den Beobachtungen bei der Transkriptomanalyse von *35:AtbZIP53* Pflanzen, und ist ein Hinweis auf die Fähigkeit von *AtbZIP1* die Transkription zu aktivieren.

Entsprechend sieht man bei dem Vergleich von aRNA-Proben der *atbzip1/atbzip53* Doppelmutante mit Wildtyp aRNA-Proben, dass reprimierte Gene überwiegen. Die p-Werte fallen hier insgesamt schlechter aus, was auf ein deutlich geringeres Maß an differentiell regulierten Genen schließen lässt, eventuell aber auch Folge eines technischen Fehlers ist. Bei dem direkten Vergleich von der Überexpressionslinie mit der Doppelmutante finden sich die meisten signifikant regulierten Gene.



**Abbildung 5.51: Auftragung des Logarithmus des Verhältnisses der Signalstärke zwischen zwei verglichenen Proben (logRatio; X-Achse) gegen die statistische Signifikanz dieses Wertes (p-Wert; Y-Achse).** LogRatios mit einem Betrag kleiner 1 wurden auf den p-Wert 1 (nicht signifikant) gesetzt. Wt-35S:AtbZIP1: Auftragung der Werte aus dem Vergleich von Wildtyp aRNA-Proben mit aRNA-Proben aus ektopischen *AtbZIP1* Überexprimierern. Wt-KO: Auftragung der Werte aus dem Vergleich von aRNA-Proben der *atbzip1/atbzip53* Doppelmutante mit Wildtyp aRNA-Proben. 35S:AtbZIP1-Wt: Auftragung der Werte aus dem Vergleich von aRNA-Proben des ektopischen *AtbZIP1* Überexprimierers mit aRNA-Proben der *atbzip1/atbzip53* Doppelmutante.

### 5.10.1 Viele der Gene mit einer erhöhten Expression in der *35S:AtbZIP1* Linie werden durch Seneszenz induziert

Für die Identifizierung von in der *35S:AtbZIP1* Linie im Vergleich zum Wildtyp signifikant stärker exprimierten Genen wurden als Schwellenwerte ein p-Wert von

höchstens 0,05 und ein Unterschied in der Signalstärke (logRatio) von mindestens 2 festgesetzt, was einem vierfach stärkeren Signal entspricht. Um herauszufinden, ob die in der *35S:HA-AtbZIP1* Linie stärker exprimierte Gene möglicherweise eine Funktion in der Seneszenz erfüllen, wurde überprüft, für welche dieser Gene bereits eine Induktion durch verschiedene Formen von Seneszenz gezeigt wurde. Dazu wurde die Gruppe der stärker exprimierten Gene mit veröffentlichten Expressionsprofilen zu natürlicher Seneszenz (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005), Dunkel-induzierter Seneszenz (Lin und Wu, 2004) und einer durch Zuckerverarmung seneszenten Zellkultur (Swidzinski *et al.*, 2002) verglichen. Tatsächlich wurde die Mehrheit der im *35S:HA-AtbZIP1* Hintergrund stärker exprimierten Gene auch während verschiedener Formen von Seneszenz induziert. Von den 50 untersuchten Genen werden 22 durch Dunkel-induzierte Seneszenz induziert, 23 in seneszenten Zellkulturen und 19 während der natürlichen Seneszenz. Dabei werden 12 Gene durch alle drei Formen der Seneszenz induziert (vier der in Tabelle 5.4 aufgeführten 54 Gene sind nicht auf den Affymetrix-Arrays vorhanden, mit denen die Seneszenz-Expressionsprofile erstellt wurden. Daher lässt sich über diese Gene keine Aussage treffen.).

**Tabelle 5.4: In *35S:AtbZIP1* Pflanzen stärker als im Wildtyp exprimierte Gene.** Die Spalte 35S/Wt gibt den Logarithmus des Quotienten der für *35S:AtbZIP53* und Wildtyp Pflanzen erhaltenen Signale (logRatio) wieder, die Spalte p-Wert die statistische Signifikanz dieser Werte (je niedriger der p-Wert, desto zuverlässiger die Daten). In der Spalte KO/Wt wird zusätzlich das logRatio der Expression zwischen der *atbzip1/atbzip53* Doppelmutante und dem Wildtyp wiedergegeben. Für jedes Gen wurde anhand von veröffentlichten Expressionsprofilen (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005; Lin und Wu, 2004; Swidzinski *et al.*, 2002) untersucht, durch welche Formen der Seneszenz es induziert wird. Anhand dieser Daten wurden die Gene dem unter der Tabelle wiedergegebenen Farbkode zugeordnet: Gene, welche eine ACGTTAC Konsensussequenz enthalten (siehe Tabelle 5.6), wurden mit einem # gekennzeichnet.

AGI	Beschreibung	35S/ Wt	P- Wert	KO/ Wt
At4g15210	beta-amylase (BMY1) / 1,4-D-glucan maltohydrolase (EC 3.2.1.2)	4,4	0,013	2,5
At3g04320	trypsin and protease inhibitor family / Kunitz family protein	3,9	0,013	-0,6
At1g55020	lipoxygenase (LOX1)	3,3	0,012	-0,7
At4g22470	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family	3,2	0,012	-0,6
At4g38050#	xanthine/uracil permease family protein	2,9	0,03	1,8
At5g43580#	protease inhibitor, putative similar to SP P19873 Inhibitor of trypsin and hageman factor (CMT1-V) { <i>Cucurbita maxima</i> };	2,8	0,016	-0,6
At2g02990#	ribonuclease 1 (RNS1) (EC 3.1.27.1)	2,8	0,047	-0,8
At2g43510#	trypsin inhibitor, putative similar to SP P26780	2,7	0,037	-0,5
At1g70670#	caleosin-related family protein	2,7	0,017	-0,5
At3g16150#	L-asparagine amidohydrolase, similar to L-asparaginase (EC 3.5.1.1)	2,7	0,025	-0,8
At4g22590#	trehalose-6-phosphate phosphatase, putative	2,7	0,015	-1
At3g04720#	Hevein-like protein precursor; PR4	2,7	0,015	-1
At4g08300#	nodulin MtN21 family protein similar to MtN21 GI:2598575	2,6	0,012	-0,4
At4g16260#	glycosyl hydrolase family 17 protein similar to glucan endo-1,3-beta-glucosidase, SP:P52407 from [ <i>Hevea brasiliensis</i> ]	2,6	0,019	-1,2
At2g29350#	sag13; short chain alcohol dehydrogenase; tropinone reductase	2,6	0,017	-1,4

At4g07450	hypothetical protein	2,5	0,03	2
At4g30420#	nodulin MtN21 family protein similar to MtN21 GI:2598575;	2,5	0,033	1,7
At1g26380	FAD-binding domain-containing protein similar to SP P30986 reticuline oxidase precursor (Berberine-bridge-forming enzyme)	2,5	0,044	-0,5
At1g32450	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	2,5	0,032	-0,5
At1g30700	FAD-binding domain-containing protein similar to SP P30986 reticuline oxidase precursor (Berberine-bridge-forming enzyme)	2,5	0,012	-1,3
At1g32350#	Alternative oxidase 1a, mitochondrial precursor from Arabidopsis thaliana [SP Q39219], alternative oxidase 2,	2,5	0,015	-1,3
At5g09790	PHD finger family protein / SET domain-containing protein	2,4	0,031	1,2
At5g49380#	hypothetical protein contains Pfam domain, PF04802	2,4	0,032	1
At3g07600#	heavy-metal-associated domain-containing protein identical to residues 23 to 179 of farnesylated protein ATPF4 GB:AAD09508	2,4	0,025	-0,3
At1g61820	glycosyl hydrolase family 1 protein; 6-phospho- $\beta$ -galactosidase; similar to beta-mannosidase enzyme (GI:17226270)	2,4	0,047	-0,3
At4g34950#	similar to nodulin-like protein [Arabidopsis thaliana] GI:3329368	2,4	0,014	-0,4
At5g40690	expressed protein	2,3	0,015	-0,1
At5g24770	vegetative storage protein 2 (VSP2)	2,3	0,049	-0,6
At3g25950	hypothetical protein	2,3	0,042	-0,8
At1g74010#	strictosidine synthase family protein similar to [SP P15324];	2,3	0,017	-0,9
At3g63470	serine carboxypeptidase, putative similar to SP P52711 Serine carboxypeptidase II-3 precursor (EC 3.4.16.6) Hordeum vulgare;	2,3	0,012	-1
At1g73610	similar to family II lipase EXL6, EXL4 [Arabidopsis thaliana]	2,2	0,03	-0,1
At5g10625	expressed protein	2,2	0,017	-0,1
At5g45630	expressed protein	2,2	0,014	-0,6
At2g29470#	glutathione S-transferase, putative	2,2	0,028	-0,6
At2g39030#	GCN5-related N-acetyltransferase family protein (EC 2.3.1.110)	2,2	0,013	-1,9
At1g55390	DC1 domain-containing protein	2,1	0,021	1
At3g28210#	zinc finger (AN1-like) family protein	2,1	0,034	0,4
At3g05400	similar to sugar-porter proteins 1 & 2 GI:14585699, GI:14585701,	2,1	0,032	0,1
At4g11320#	cysteine proteinase, putative contains similarity to GI:435619,	2,1	0,042	-0,3
At1g66570	similar to sucrose-proton symporter SUC1 [Arabidopsis thaliana]	2,1	0,025	-0,3
At2g22880#	VQ motif-containing protein contains PF05678: VQ motif	2,1	0,012	-0,3
At1g73260	trypsin and protease inhibitor family protein / Kunitz family protein	2,1	0,032	-0,4
At2g36310#	inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase family protein	2,1	0,017	-0,4
At3g49620	2-oxoacid-dependent oxidase, putative (DIN11)	2,1	0,012	-0,6
At2g16660	nodulin family protein similar to nodulin-like protein GI:3329368,	2,1	0,013	-0,7
At3g26840	esterase/lipase/thioesterase family protein	2,1	0,012	-0,8
At3g09440#	heat shock cognate 70 kDa protein 3 (HSC70-3) (HSP70-3)	2,1	0,013	-1
At4g21990	5'-adenylylsulfate reductase (APR1) / PAPS reductase homolog (PRH19) identical to [Arabidopsis thaliana] GI:2738756	2,1	0,023	-1,1
At3g46080#	zinc finger (C2H2 type) family protein	2,1	0,012	-1,1
At5g49450#	AtbZIP1	2,1	0,012	-3,9
At2g32200#	hypothetical protein	2	0,016	-0,3
At4g37150	similar to ethylene-induced esterase GI:14279437	2	0,018	-0,3
At1g13520	expressed protein	2	0,048	-0,7

Durch alle Formen der Seneszenz induziert	12 Gene
In seneszenten Zellkultur und durch dunkelinduzierter Seneszenz induziert	9 Gene
Durch natürliche und dunkelinduzierte Seneszenz induziert	2 Gene
Durch natürliche Seneszenz induziert	5 Gene
Durch dunkelinduzierte Seneszenz induziert	2 Gene
In seneszenten Zellkultur induziert	5 Gene
In seneszenten Zellkultur und durch natürliche Seneszenz induziert	1 Gene

Viele der bekannten Seneszenz-assoziierten Gene sind am Katabolismus beteiligt, unter ihnen finden sich Proteasen, RNasen, oder Lipasen (Buchanan-Wollaston und Ainsworth, 1997; Weaver *et al.*, 1998). Solche Gene finden sich auch in der Liste der im *35S:AtbZIP1* Hintergrund stärker exprimierten Gene. Interessanterweise findet sich auch eine Gruppe von fünf Seneszenz-induzierten Protease-Inhibitor Genen in der Liste. Die Funktion von Protease-Inhibitoren im Zusammenhang mit der Seneszenz ist noch nicht untersucht wurde, für sie wurde in Pflanzen bisher vor allem eine Funktion in der Pathogenabwehr gezeigt (Garcia *et al.*, 2004; Ingvarsson, 2005; Kim *et al.*, 2005). Jedoch werden diese Protease-Inhibitoren sehr deutlich durch verschiedene Formen der Seneszenz induziert, was ein deutlicher Hinweis auf ihre Bedeutung in der Seneszenz ist.

**Tabelle 5.5: In *35S:AtbZIP1* Pflanzen stärker exprimierte Proteasen werden in hohem Maße durch verschiedenen Formen der Seneszenz induziert.** Dis1d: Ein Tag Dunkel-induzierte Seneszenz, Dis5d: Fünf Tage Dunkel-induzierte Seneszenz (Lin und Wu, 2004); Zellkultur: Durch Zuckerverarmung seneszente Zellkultur (Swidzinski *et al.*, 2002); ATGE: Daten zur natürlichen Seneszenz aus dem AtGenExpress Projekt; OE-Wt: Aktivierung im *35S:AtbZIP1* Hintergrund, diese Arbeit; KO-Wt: Repression in der *atbzip1/atbzip53* Doppelmutante, diese Arbeit.

AGI	Beschreibung	DIS1d	DIS5d	Zell-Kultur	ATGE	35S/Wt	KO/Wt
At1g73260	trypsin and protease inhibitor family / Kunitz family protein	15,4	80,4	229,6	128,4	2,1	-0,4
At2g43510	trypsin inhibitor, putative similar to SP P26780	1,8	13,9	8,9	14,2	2,7	-0,5
At5g43580	protease inhibitor, putative similar to SP P19873 Inhibitor of trypsin and hageman factor (CMTI-V) { <i>Cucurbita maxima</i> };	2,8	65,3	140,6	0,2	2,8	-0,6
At3g04320	trypsin and protease inhibitor family / Kunitz family protein	1,8	1150,8	1,3	10,5	3,9	-0,6
At4g22470	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family	1,5	10,8	4,5	0,7	3,2	-0,6

Um zu überprüfen, ob die Gruppe der in *35S:AtbZIP1* Pflanzen aktivierten Gene eine ähnliche Gewebespezifität zeigt, wie sie bei den in *35S:AtbZIP53* Pflanzen aktivierten Genen beobachtet wurde, wurde ihre Expression mit dem Metaanalyser Programm der Genevestigator Software (Zimmermann *et al.*, 2004) analysiert (Abbildung 5.52). Dieses Programm fasst Daten mehrerer Mikroarray-Experimente zusammen, und ermöglicht so die Expression einzelner Gene in verschiedenen Geweben miteinander zu vergleichen. Für jedes Gen werden die stärksten gemessenen Expressionen dunkelblau, die schwächsten weiß dargestellt. Insgesamt zeigt sich ein uneinheitliches Bild.

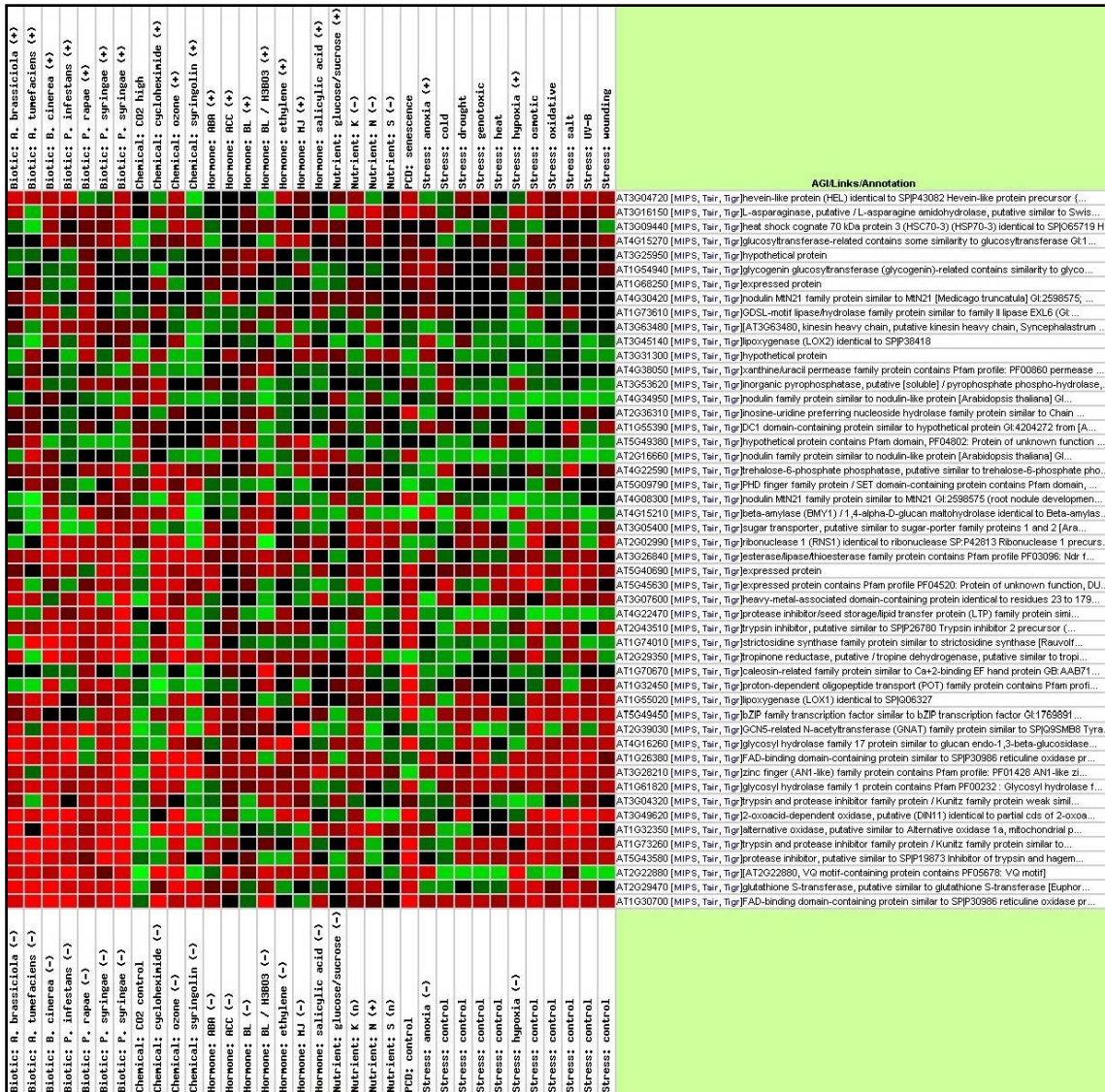


**Abbildung 5.52: Genevestigator-Analyse der gewebespezifischen Expressionsmuster der in den 35S:AtbZIP1 Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp am stärksten aktivierten Gene.** Je dunkler das Blau, desto stärker ist die Expression in dem jeweiligen Gewebe. Für die Darstellung wurden Kallus und Zellkultur von der Liste der Gewebe ausgeschlossen, verwendete Einstellungen für die Berechnung der Cluster waren Euclidean und Average.

Während sich wie bei den für *AtbZIP53* durchgeführten Analysen auch hier ein Gruppe von stark in Pollen exprimierten Genen findet, gibt es kaum stark in Samen exprimierte Gene. Dagegen fällt die Gruppe der stark in Wurzeln exprimierten Gene deutlich größer aus als bei *AtbZIP53*.

Ähnlich zu Analyse der gewebespezifischen Expression wurde mit Genevestigator auch eine Analyse der Stressregulation der in *35S:AtbZIP1* Pflanzen aktivierten Gene durchgeführt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind hier nur Experimente gezeigt, in denen ein Großteil der Gene eine deutliche Regulation zeigt. Auffallend ist, dass etwa die Hälfte aller Gene durch verschiedene Arten von Pathogenen induziert werden, am deutlichsten durch Infektion mit *Pseudomonas syringae*. Unter "PCD: senescence" sind Mikroarray Daten von einer durch Zuckerverarmung in die Seneszenz übergegangenem





**Abbildung 5.53: Übersicht über die Regulation der in 35S:AtbZIP1 Pflanzen aktivierten Gene unter verschiedenen Stressbedingungen.** Die Beschriftungen oben bezeichnen das jeweilige Experiment, rechts sind die aktivierten Gene aufgeführt. Ist ein Feld rot, ist das Gen im Experiment stärker exprimiert, ist es grün, so ist das Gen im Experiment schwächer exprimiert. Je heller die Farben sind, desto stärker ist die Differenz zwischen Experiment und Kontrolle. Schwarze Felder bedeuten eine gleichstarke Expression in Experiment und Kontrolle.

Zellkultur zu finden (Swidzinski *et al.*, 2002). Eine sehr starke Induktion von AtbZIP1 in diesem Experiment wurde bereits unter 5.9.3 und in Abbildung 5.48 gezeigt. Hier wird neben *AtbZIP1* selbst auch etwa die Hälfte der in 35S:AtbZIP1 Pflanzen am stärksten aktivierten Gene deutlich induziert. Viele dieser Gene werden auch durch Salzstress und unter oxidativem Stress nach Ozon-Behandlung oder durch 10mM Methyl-Viologen (hier als "Stress: oxidative" beschriftet) induziert.

Durch hohe CO<sub>2</sub>-Konzentrationen und Behandlung mit Syringolin wird hingegen die Mehrheit der Gene reprimiert. Durch Behandlung mit Syringolin kann eine

hypersensitive Antwort ausgelöst werden, die programmierten Zelltod zur Folge hat. Das hier die Mehrheit der Gene reprimiert ist, zeigt dass die unter "PCD: senescence" gezeigten Induktionen in der seneszenten Zellkultur eher auf die Seneszenz, nicht auf den programmierten Zelltod zurückzuführen sind. Eine überwiegende Repression findet sich auch bei Kälte-Behandlung.

### 5.10.2 Die Promotoren von in der 35S:AtbZIP1 Linie stärker exprimierten zeigen ein gehäuftes Auftreten eines ACGTTAC-Motivs

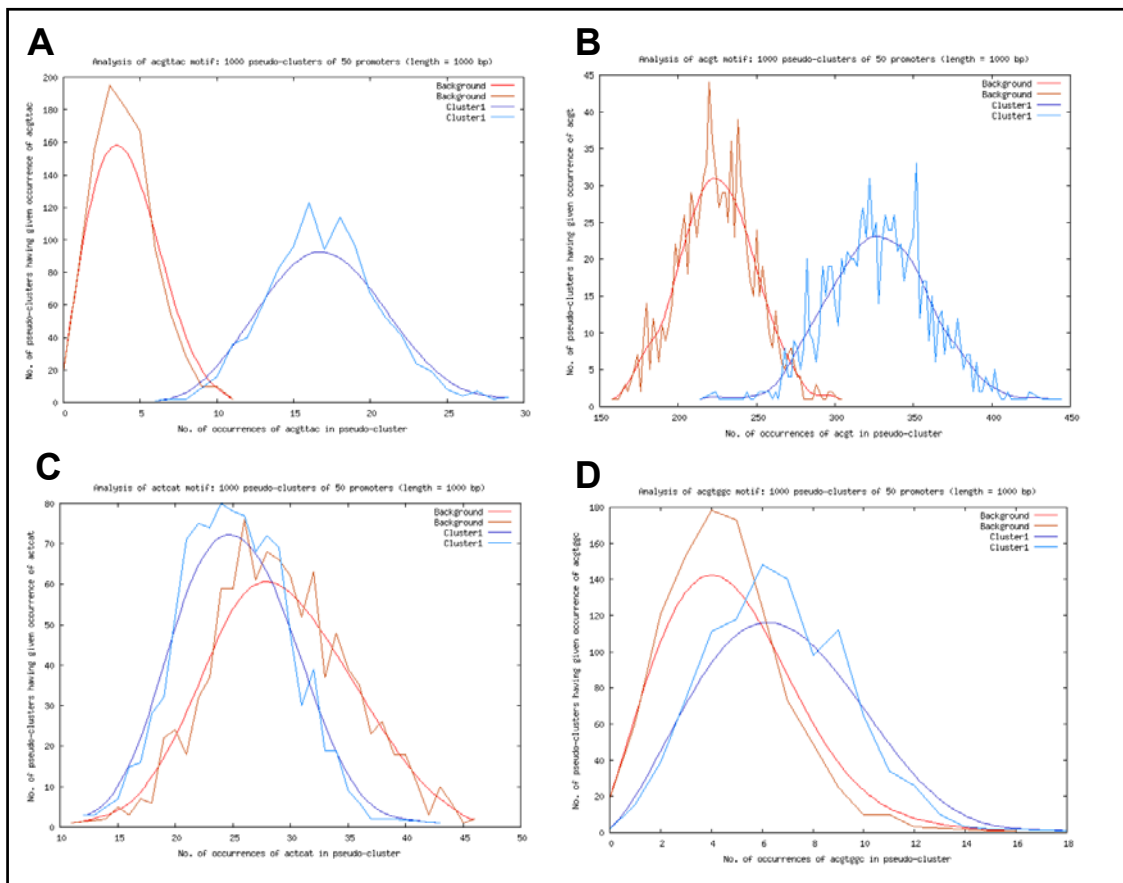
Da AtbZIP1 wahrscheinlich als Heterodimer seine Zielgene reguliert, und die von AtbZIP1 gebundenen *cis*-Elemente wahrscheinlich auch von dem Heterodimerisierungspartner abhängen, wird es schwierig sein ein konkretes Bindeelement zu identifizieren (Matsushima-Hibiya *et al.*, 1998). Aussagen über mögliche *cis*-Elemente anhand der Arraydaten werden zusätzlich erschwert, da die Gruppe der dort aktivierten Gene wahrscheinlich nur zu einem Teil direkte Zielgene beinhaltet.

Zunächst wurden die -1 bis -1000 bp Promotorregionen der in 35S:HA-AtbZIP1 Pflanzen am stärksten aktivierten Gene mit dem Programm Bioprospector analysiert (Liu *et al.*, 2001). Die Suche lieferte ein ACGTTAC Motiv, das die Kernbindesequenz von AtbZIP-Transkriptionsfaktoren, ACGT, beinhaltet (Tabelle 5.6). Es könnte sich also möglicherweise wirklich um ein Bindemotiv von AtbZIP1 handeln.

**Tabelle 5.6: Mit Hilfe des Programms Bioprospector identifiziertes Motiv, das gehäuft in den Promotoren der im 35S:AtbZIP1 Hintergrund aktivierten Gene auftritt.** In Zeile 1 ist die Konsensus-Sequenz wiedergegeben, in den folgenden Zeilen, mit welcher Häufigkeit die Basen an den entsprechenden Positionen auftreten. Gene, welche die ACGTTAC Konsensussequenz enthalten, wurden in der Liste der aktivierten Gene (Tabelle 5.4) mit einem # gekennzeichnet. Der Promotor von AT3G04720 (*Hevein-like protein precursor*) enthält 2 ACGTTAC Motive.

<b>Konsensus:</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>C</b>
% A	100	0	0	0	0	78	0
% C	0	78	0	9	0	0	100
% G	0	22	100	0	0	22	0
% T	0	0	0	91	100	0	0

Die relative Häufigkeit des *ACGTTAC* Motivs wurde im folgenden mit dem Programm POBO analysiert. Dazu wurden die -1 bis -1000 Basenpaare Promotorregionen der 38 in *35S:HA-AtbZIP1* Pflanzen am stärksten aktivierten Gene verwendet. Tatsächlich findet sich das Motiv deutlich häufiger als im Durchschnitt aller -1 bis -1000 Basenpaare Promotorregionen aus *Arabidopsis* (Abbildung 5.54). Entsprechend tritt auch das *ACGT*-Motiv gehäuft auf, während dies bei dem *ACTCAT* Motiv aus dem *ProDH* Promotor oder dem *ABRE*-Motiv, dass in den Transkriptomanalysen der *35S:AtbZIP53* Pflanzen identifiziert wurde, nicht der Fall ist. In der Literatur wurde ein *ACGTTAC* Motiv bisher nicht beschrieben.



**Abbildung 5.54:** Analyse der -1 bis -1000 bp Promotorregionen der in *35S:HA-AtbZIP1* Pflanzen am stärksten aktivierten Gene mit dem Programm POBO. A: Häufigkeit des *ACGTTAC*-Motivs; B: Häufigkeit des *ACGT*-Motivs; C: Häufigkeit des *ACTCAT*-Motivs; D: Häufigkeit des *ACGTGGC*-Motivs. Als Kontrolle diente *Arabidopsis\_thalian\_full*, ein Datensatz der die 1000bp Promotorregionen fast aller Gene aus *Arabidopsis* enthält. Die Bootstrapping-Analysen wurden mit jeweils 1000 Clustern aus je 50 Promotoren durchgeführt. Die roten Linien zeigen die Häufigkeit des untersuchten Motivs in der Kontrollgruppe, die blauen Linien die Häufigkeit des Motivs in den Promotoren der aktivierten Gene (X-Achse: Häufigkeit des Motivs im Pseudo-Kluster; Y-Achse: Zahl der Pseudokluster).

### 5.10.3 Gene mit einer im Vergleich zum Wildtyp reduzierten Expression in der *atbzip1/atbzip53* Doppelmutante

Für die Identifizierung von in der *atbzip1/atbzip53* Doppelmutante im Vergleich zum Wildtyp signifikant schwächer exprimierten Genen wurden als Schwellenwerte ein p-Wert von höchstens 0,1 und ein Unterschied in der Signalstärke (logRatio) von mindestens -1 festgesetzt, was einer halbierten Signalstärke entspricht (Tabelle 5.7). Wie zu erwarten, gehören einige der in der Doppelmutante am stärksten reprimierten Gene auch zu den in *AtbZIP1* Überexprimierern am stärksten aktivierten Gene. Bei anderen Genen, wie zum Beispiel dem deutlich reprimierten F-box Protein At1g58090, ist die Repression möglicherweise auf die Mutation von *AtbZIP53* zurückzuführen. Hier bleiben die Ergebnisse der entsprechenden Northern-Analysen abzuwarten, die im Rahmen der Dissertation aus zeitlichen Gründen nicht mehr durchführbar waren. Auch unter den in der *atbzip1/atbzip53* Doppelmutante reprimierten Genen finden sich viele während der Seneszenz induzierte Gene, die den bei dieser Mutante beobachteten Phänotyp eines verzögerten Eintretens in die Dunkel-induzierte Seneszenz erklären könnten.

**Tabelle 5.7: In der *atbzip1/atbzip53* Doppelmutante schwächer als im Wildtyp exprimierte Gene.** Die Spalte KO/Wt gibt den Logarithmus des Quotienten der für *35S:AtbZIP53* und Wildtyp Pflanzen erhaltenen Signale (logRatio) wieder, die Spalte p-Wert die statistische Signifikanz dieser Werte (je niedriger der p-Wert, desto zuverlässiger die Daten). In der Spalte 35S/Wt wird zusätzlich das logRatio der Expression zwischen *35s:AtbZIP1* Pflanzen und dem Wildtyp wiedergegeben. Für jedes Gene wurde anhand von veröffentlichten Expressionsprofilen (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005; Lin und Wu, 2004; Swidzinski *et al.*, 2002) untersucht, durch welche Formen der Seneszenz sie induziert werden. Anhand dieser Daten wurden die Gene dem unter der Tabelle wiedergegebenen Farbkode zugeordnet:

AGI	Beschreibung	KO/ Wt	p- Wert	35S/ Wt
At5g49450#	AtbZIP1	-3,9	0,135	2,1
At1g58090#	F-box family protein	-2,9	0,173	-2,9
At5g49590#	hypothetical protein	-2,5	0,178	1,6
At3g62420#	AtbZIP53	-2,4	0,128	-0,4
At5g52290	hypothetical protein	-2,1	0,201	-3,3
At2g39030#	GCN5-related N-acetyltransferase (GNAT) family protein	-1,9	0,106	2,2
At5g38900#	DSBA oxidoreductase family protein contains Pfam profile: PF01323 DSBA-like thioredoxin domain	-1,7	0,128	1,5
At2g31081	Clavata3 / ESR-Related-4 (CLE4)	-1,6	0,227	-2,5
At2g35980#	harpin-induced family protein (YLS9) / similar to harpin-induced protein hin1 ( GI:1619321) [Nicotiana tabacum];	-1,5	0,092	1,8
At3g55970#	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) similar to leucoanthocyanidin dioxygenase, Malus domestica, SP P51091;	-1,5	0,128	1,7
At4g26260#	myo-inositol oxygenase	-1,5	0,128	1,2
At2g29350	sag13; short chain alcohol dehydrogenase; tropinone reductase	-1,4	0,239	2,6
At3g05950#	similar to germin-like protein GLP6 [SP P92997]	-1,4	0,173	1,7

At1g02930	glutathione S-transferase	-1,4	0,076	1,6
At1g15520#	ABC transporter family protein similar to ABC1 protein GI:14331118 from [Nicotiana plumbaginifolia]	-1,4	0,128	0,5
At1g30700	FAD-binding domain-containing protein similar to SP P30986	-1,3	0,099	2,5
At1g32350#	similar to Alternative oxidase 1a, mitochondrial precursor from Arabidopsis thaliana [SP Q39219]	-1,3	0,173	2,5
At1g47510#	endonuclease/exonuclease/phosphatase family protein	-1,3	0,173	1
At1g20850#	cysteine endopeptidase, papain-type (XCP2)	-1,3	0,095	0,5
At3g15356	legume lectin family protein	-1,3	0,076	0,3
At4g16260#	glycosyl hydrolase family 17 protein similar to glucan endo-1,3-beta-glucosidase,	-1,2	0,201	2,6
At1g54890#	LEA protein-related similar to late embryogenesis abundant protein (EMB7) GI:1350543 from [Picea glauca]	-1,2	0,261	1,8
At2g43570#	chitinase, putative similar to chitinase class IV GI:722272	-1,2	0,178	0,9
At5g46230#	expressed protein	-1,2	0,185	0,6
At2g07751	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 3, putative	-1,2	0,227	-1,6
At4g21990	5'-adenylylsulfate reductase (APR1) / PAPS reductase homolog (PRH19)	-1,1	0,128	2,1
At3g46080#	zinc finger (C2H2 type) family protein	-1,1	0,159	2,1
At3g45140#	lipoxygenase (LOX2) identical to SP P38418	-1,1	0,203	2
At4g36820#	hypothetical protein contains Pfam domain, PF04678:	-1,1	0,173	1,7
At1g02920#	glutathione S-transferase, putative	-1,1	0,085	1,7
At2g18690#	expressed protein	-1,1	0,076	1,6
At2g38860	protease1 (pfpl)-like protein GI:13122288	-1,1	0,076	1,1
At1g55265	Kelch repeat containing F-box protein, identical to At1g55270	-1,1	0,113	0,9
At5g22300	nitrilase 4 (NIT4) (EC 3.5.5.1) {Arabidopsis thaliana}	-1,1	0,076	0,8
At4g03070#	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase (AOP1.2) identical to GI:16118887	-1,1	0,252	-1,7
At4g22590#	trehalose-6-phosphate phosphatase	-1	0,223	2,7
At3g04720#	Hevein-like protein precursor; similar to SP P09762 Wound-induced protein WIN2 precursor	-1	0,173	2,7
At3g63470	similar to SP P52711 Serine carboxypeptidase II-3 precursor (EC 3.4.16.6) Hordeum vulgare;	-1	0,146	2,3
At1g17745	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase / 3-PGDH identical to SP O04130	-1	0,226	1,3
At2g44670#	similar to senescence-associated protein SAG102 (GI:22331931)	-1	0,106	1,1
At3g58070	zinc finger (C2H2 type) family protein	-1	0,175	-2,4

Durch alle Formen der Seneszenz induziert	6 Gene
In seneszenten Zellkultur und durch Dunkel-induzierte Seneszenz induziert	2 Gene
Durch natürliche und Dunkel-induzierte Seneszenz induziert	5 Gene
Durch natürliche Seneszenz induziert	3 Gene
Durch Dunkel-induzierte Seneszenz induziert	1 Gen
In seneszenten Zellkultur induziert	3 Gene
In seneszenten Zellkultur und durch natürliche Seneszenz induziert	2 Gene

Eine Analyse der in der Doppelmutterante reprimierten Gene mit der Genevestigator Software zeigte keine klare Anhäufung von bestimmten gewebespezifischen Expressionsmustern. Jedoch findet sich in dieser Gruppe, wie schon bei den in *35S:AtbZIP1* Pflanzen aktivierten Genen, eine deutliche Anhäufung von Genen, die durch biotischen Stress aktiviert werden (Abbildung 5.55). Ebenso finden sich auch viele durch Ozon oder Salzstress induzierte Gene, sowie viele in Gegenwart von hohen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen reprimierte Gene.

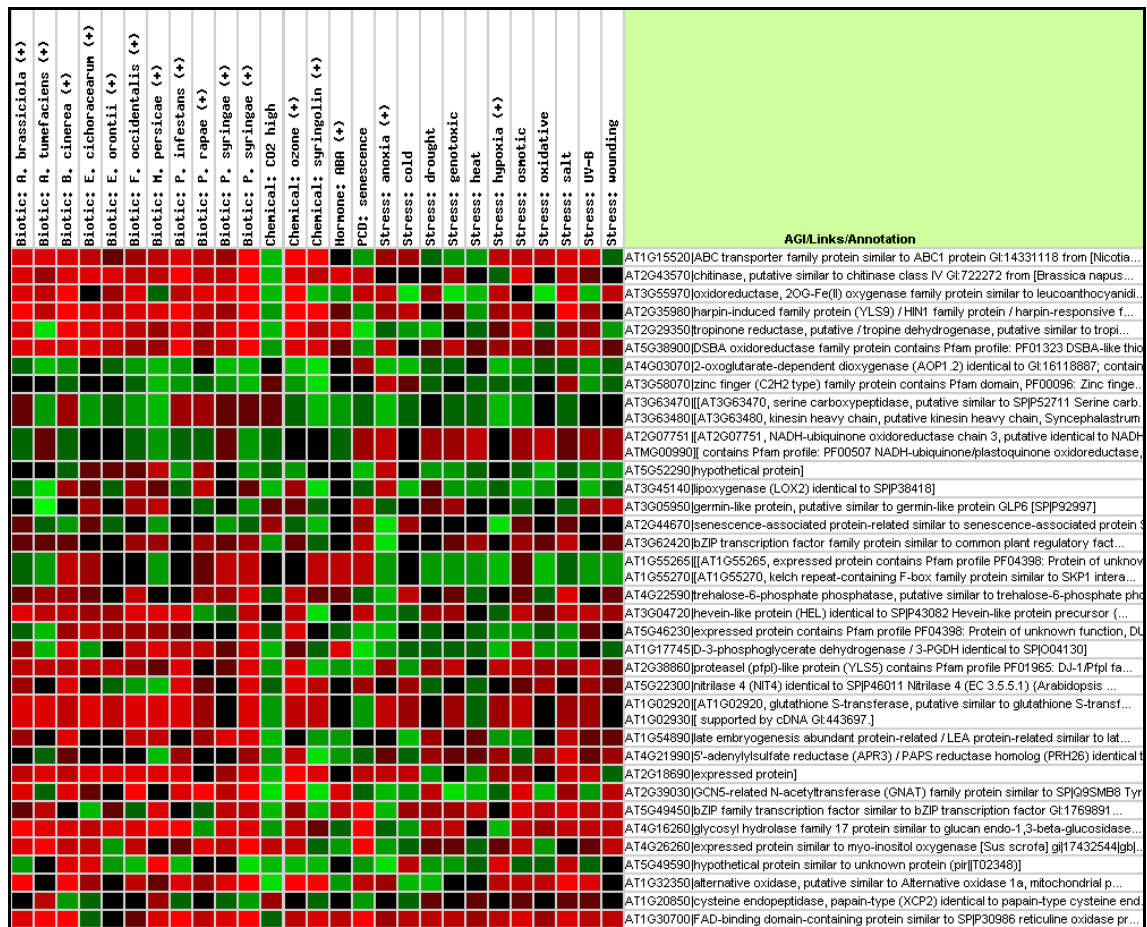


Abbildung 5.55: Übersicht über die Expression der in *35S:AtbZIP1* Pflanzen aktivierten Gene unter verschiedenen Stressbedingungen. Die Beschriftungen oben bezeichnen das jeweilige Experiment, rechts sind die verschiedenen Gene aufgeführt. Ist ein Feld rot, ist das Gen im Experiment stärker exprimiert, ist es grün, so ist das Gen im Experiment schwächer exprimiert. Je heller die Farben sind, desto stärker ist die Differenz zwischen Experiment und Kontrolle. Schwarze Felder bedeuten eine gleichstarke Expression in Experiment und Kontrolle.

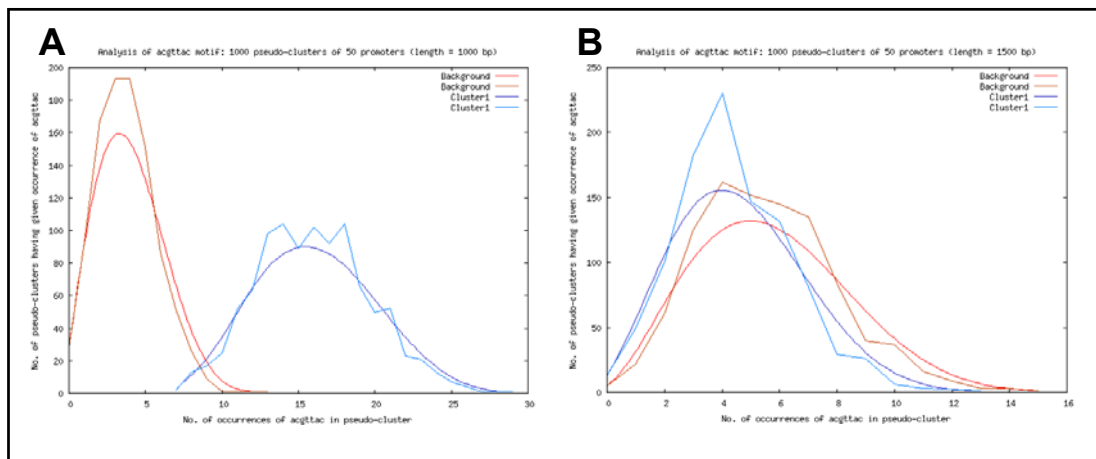
#### 5.10.4 Analyse der Promotoren von Genen mit einer reduzierten Expression in der *atbzip1/atbzip53* Doppelmutante

Eine Analyse der -1 bis -1000 Basenpaare Promotorregionen der in der Doppelmutante reprimierten Gene mit dem Programm Bioprosector zeigte, wie schon bei der vorherigen Analyse, ein gehäuftes Auftreten eines *ACGTTAC* Motivs (Tabelle 5.8). Diese Anhäufung wurde durch eine Analyse mit dem Programm POBO bestätigt (Abbildung 5.56). Eine Häufung von *ACGTGGC* Motiven wurde auch in dieser Gruppe nicht gefunden, *ACTCAT* Motive traten nur wenig häufiger auf. Um zu kontrollieren, ob dieses Motiv auch in den Promotorregionen der in Kapitel 5.6 durch *AtbZIP53*

aktivierten Gene gehäuft auftritt, wurden diese ebenfalls mit POBO auf die Häufigkeit des *ACGTTAC* Motivs untersucht. Jedoch war hier keine Häufung zu finden.

**Tabelle 5.8: Mit Hilfe des Programms Bioprosector wurde ein *ACGTCAT*-Motiv identifiziert, das gehäuft in den Promotoren der in der *atbzip1/atbzip53* Doppelmutante reprimierten Gene auftritt. In Zeile 1 ist die Konsensus-Sequenz wiedergegeben, in den folgenden Zeilen, mit welcher Häufigkeit (in %) die Basen an den entsprechenden Positionen auftreten. Gene, welche die *ACGTTAC* Konsensussequenz enthalten, wurden in der Liste der reprimierten Gene (Tabelle 5.7) mit einem # gekennzeichnet.**

<b>Konsensus:</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>C</b>
% A	86	0	0	0	45	100	0
% C	5	100	0	0	0	0	100
% G	9	0	100	0	0	0	0
% T	0	0	0	100	54	0	0



**Abbildung 5.56: A: Häufigkeit des *ACGTTAC*-Motivs in den  $-1$  bis  $-1000$  bp Promotorregionen der in der *atbzip1 atbzip53* Doppelmutante reprimierten Gene; B: Häufigkeit des *ACGTTAC* Motivs in den  $-1$  bis  $-1000$  bp Promotorregionen der in *35S:AtbZIP53* Pflanzen aktivierten Gene.** Als Kontrolle diente *Arabidopsis thaliana* full, ein Datensatz der die 1000bp Promotorregionen fast aller Gene aus *Arabidopsis* enthält. Die Bootstrap-Analysen wurden mit jeweils mit 1000 Klustern aus je 50 Promotoren durchgeführt. Die roten Linien zeigen die Häufigkeit des untersuchten Motivs in der Kontrollgruppe, die blaue Linie die Häufigkeit des Motivs in den Promotoren der aktivierten Gene (X-Achse: Häufigkeit des Motivs im Pseudo-Kluster; Y-Achse: Zahl der Pseudo-Kluster).

## 6 Diskussion:

### 6.1 AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 bilden ein Heterodimerisierungsnetzwerk

In dieser Arbeit konnten in Hefe für alle AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppe S1 eine starke Protein-Protein Interaktion mit allen Faktoren der Gruppe C gezeigt werden. Interaktionen fanden sich auch zwischen den Gruppe S1 Mitgliedern AtbZIP1 und AtbZIP11 bzw. 44, jedoch waren diese Interaktionen deutlich schwächer als die mit Faktoren der Gruppe C. "Yeast Two-Hybrid" (Y2H) Untersuchungen konnten am Beispiel von AtbZIP53 zeigen, dass Mutationen, welche die  $\alpha$ -helikale Struktur der bei bZIP-Proteinen für die Heterodimerisierung verantwortlichen Zipper-Domäne brechen, zu einem Ausbleiben der Interaktion führen. Es kann also angenommen werden, dass es sich bei den gezeigten Interaktionen um Zipper-vermittelte Heterodimerisierungen handelt.

Aufgrund ihrer starken Aktivierungseigenschaften konnten AtbZIP9 und AtbZIP10 im Y2H System nicht als Bindedomäne verwendet werden. Daher fehlen hier Daten zur Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen sowie zu ihrer Fähigkeit zur Homodimerisierung. Um diese Daten zu erhalten, und um die gezeigten Dimerisierungen zu verifizieren, wurde versucht, Interaktionen mit dem RTA (repressed transactivator) System zu quantifizieren (Hirst *et al.*, 2001). Das RTA System ist eine Y2H-Variante, die speziell für Proteine mit starken Aktivierungseigenschaften gedacht ist. Es verwendet statt der GAL4-AD eine Repressordomäne. Ein über die GAL4-BD an den Promotor eines Reportergens gebrachten Proteins mit Aktivierungseigenschaften aktiviert zunächst das Reportergen. Kommt es zu einer Interaktion mit einem an die Repressordomäne fusionierten Protein, so wird diese Aktivierung des Reportergens messbar reprimiert. Leider ließen sich mit diesem System bekannte Interaktionen nicht reproduzieren. Da diese Methode seit ihrer Publikation vor über vier Jahren nur einmal zitiert wurde, ist anzunehmen, dass das RTA System nur begrenzt funktioniert.

Dafür konnten exemplarisch Interaktionen zwischen AtbZIP53 und AtbZIP10 von Caroline Mayer durch ein System zum Nachweis von Protein-Protein Interaktionen *in*



*planta*, der bimolekularen Fluoreszenz–Komplementation, bestätigt werden (persönliche Mitteilung).

Während anhand der “Yeast Two-Hybrid“ Daten zunächst keine Bildung von Homodimeren zu erkennen war, wird für den Gruppe C Faktor AtbZIP63 in der Literatur die Fähigkeit zur Homodimerisierung beschrieben (Walter *et al.*, 2004). Die in dieser Publikation im Hefe-System gezeigte Interaktion ist jedoch sehr schwach. Bei genauerer Betrachtung zeigte sich, dass sie in den eigenen Daten ebenfalls zu erkennen war, jedoch angesichts der etwa 20-fach stärkeren Interaktion mit Gruppe S1 Faktoren zunächst als Hintergrund eingestuft wurde. Da die Homodimerisierung von AtbZIP63 jedoch auch durch bimolekulare Fluoreszenz–Komplementation bestätigt werden konnte, ist eine biologische Relevanz nicht auszuschließen (Walter *et al.*, 2004).

Bimolekulare Fluoreszenz–Komplementation sowie Ko-Immunopräzipitation sind beides Methoden, welche die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen *in planta* erlauben. Ein Nachteil dieser beiden Methoden ist, dass sie nicht dazu geeignet sind, Interaktionsstärken zu quantifizieren. Dass dies von Nachteil ist zeigt das oben zitierte Beispiel von AtbZIP63.

Um quantitative Daten über die Heterodimerisierungen *in planta* zu erhalten, wurde das Y2H-System von Andrea Ehlert in Mesophyll-Protoplasten übertragen. Dabei wird ein Reporterplasmid, das ein unter Kontrolle der Gal4-UAS stehendes GUS-Reportergen enthält, gemeinsam mit Effektorplasmiden für die Expression von an die GAL4-AD bzw. GAL4-BD fusionierten AtbZIP Proteinen transient in die Mesophyll-Protoplasten transformiert, und nach einer Inkubation wird die Expression des Reportergens enzymatisch gemessen (Ehlert *et al.*, zur Veröffentlichung eingereicht).

Bei einer Reproduktion der Interaktionsdaten aus Hefe in Protoplasten-Assays konnten die bereits in Hefe gezeigten spezifische Heterodimerisierungen zwischen AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 bestätigt werden.

Zusätzlich wurden auch weitere, allerdings deutlich schwächere Interaktionen innerhalb der einzelnen Gruppen gemessen. Innerhalb der Gruppe C zeigte AtbZIP10 eine Interaktion mit Atbzip63 und AtbZIP9, innerhalb der Gruppe S1 wurde eine Interaktion von AtbZIP53 mit AtbZIP2, 11 und 44 festgestellt. Diese schwächeren Interaktionen innerhalb der Gruppe S1 unterscheiden sich von den in Hefe gefundenen (diese Arbeit), wo AtbZIP1 mit AtbZIP11 oder AtbZIP44 interagiert. Ob diese Interaktionen von biologischer Relevanz sind bleibt somit abzuwarten.

Aufgrund des sehr langen Leucin-Zippers mit acht heptameren Wiederholungen, der nur bei bZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S vorkommt, gilt eine Interaktion mit zu anderen Gruppen gehörenden bZIP-Transkriptionsfaktoren als wenig wahrscheinlich (Deppmann *et al.*, 2004).

Interaktionen von AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C oder S mit zu anderen Gruppen gehörenden Faktoren wurden bisher nur exemplarisch für verschiedene Gruppen getestet. Signifikante Interaktionen wurden dabei nicht gefunden, sodass die Interaktionen spezifisch für die Gruppen C und S zu sein scheinen. Jedoch wurde für Petersilie in Gel-Retardationsanalysen eine Heterodimerisierung des zur Gruppe C gehörenden bZIP-Proteins CPRF2 mit dem zur Gruppe G gehörenden bZIP-Protein CPRF3 gezeigt (Armstrong *et al.*, 1992). Daher sollte, wenn über die Funktion der Gruppe C/S1 AtbZIP-Transkriptionsfaktoren spekuliert wird, die mögliche Existenz weiterer Heterodimerisierungspartner berücksichtigt werden. Die in Gel-Retardationsanalysen gezeigte Interaktion findet in Gegenwart von DNA statt, und unterscheidet sich dadurch von den im Y2H-System beobachteten Interaktionen. Vielleicht beeinflusst die Bindung an DNA die Dimerisierungseigenschaften von bZIP-Proteinen, sodass manche Homo- oder Heterodimere möglicherweise nur bei gleichzeitiger Bindung an DNA auftreten.

## **6.2 Bisher unbekannte Strukturmerkmale der Zipper-Domäne sind für die Spezifität von C/S1 Heterodimerisierungen verantwortlich**

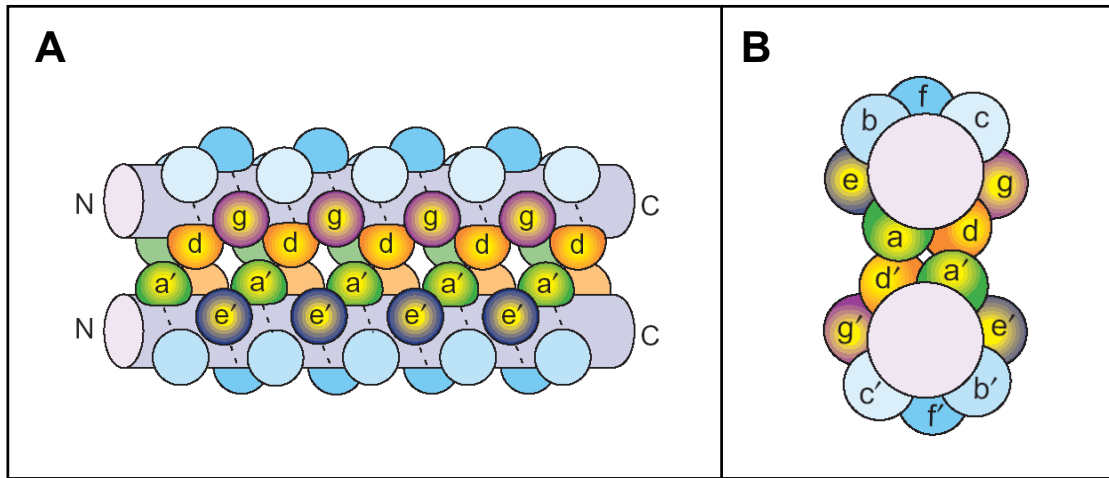
Viele Publikationen befassen sich damit, welche Strukturmerkmale für die Spezifität von bZIP-bZIP Heterodimerisierungen verantwortlich sind. Mehrfach wurde die Bedeutung von elektrostatische Wechselwirkungen zwischen positiv oder negativ geladenen Aminosäureresten, die sich am Rand der hydrophoben Interaktionsfläche befindenden, gezeigt (Alber, 1992; Cohen und Curran, 1990; Vinson *et al.*, 2002; Vinson *et al.*, 1993). Solche Aminosäure-Paare finden sich in den nach (McLachlan und Steward, 1975) e und g' bzw. g und e' genannten Positionen (zu den Positionsbezeichnungen siehe Abbildung 6.1). Zusätzlich sind die Aminosäuren in den Positionen a und d für die Spezifität der Heterodimerisierung verantwortlich. Für

Zipper-Domänen mit Asparagin in der Position a wurde eine bevorzugte Dimerisierung mit anderen Zipper-Domänen, die in der selben heptameren Wiederholungen an Position a ebenfalls ein Asparagin enthalten, gezeigt (Acharya *et al.*, 2002; Zeng *et al.*, 1997).

Gruppe C und S1 bZIP Proteine enthalten Asparagine in Position a der heptameren Wiederholungen 2 und 5 (Abbildung 6.2). Dieser Aspekt unterstützt die gefundenen C-S1 Heterodimerisierungen, erklärt jedoch nicht, warum es kaum zu S1-S1 oder C-C Interaktionen oder Homodimerisierungen kommt. Der Versuch, dies durch elektrostatische Interaktionen zwischen Aminosäuren in den Positionen g und e zu erklären scheitert, da in C/S1 Heterodimeren weniger anziehende g-e Paare vorhanden sind als in den entsprechenden Homodimeren. So könnten zum Beispiel Gruppe C Faktoren als Homodimere in den heptameren Wiederholungen 6 und 7 anziehende D↔R und K↔E Paare bilden, die sie mit S1 Faktoren nicht bilden können (in Abbildung 6.2 durch den roten Kasten hervorgehoben). Bei ihrem Versuch, eine Voraussage der Heterodimerisierungen zwischen *Arabidopsis* bZIP-Transkriptionsfaktoren zu machen, kommen (Deppmann *et al.*, 2004) daher zu dem Schluss, das C/S1 Heterodimere gegenüber den entsprechenden Homodimeren weniger favorisiert werden. Da die experimentellen Daten dem widersprechen, sind wohl andere, bisher unbekannte Faktoren für die Spezifität der C/S1 Interaktion verantwortlich. Gerade diese beiden heptameren Wiederholungen 6 und 7, für die eine bevorzugte Homodimerisierung vorausgesagt wurde, könnten für die Spezifität der Heterodimerisierung verantwortlich sein, da sie innerhalb der Gruppe C bzw. S1 stark konserviert sind, sich aber untereinander und zu denen der Gruppen S2 und S3 unterscheiden (Abbildung 6.2; durch einen roten Kasten hervorgehoben). C/S1 Heterodimerisierung scheinen konserviert zu sein, da für BZI-1 aus Tabak (Gruppe C) auch eine Heterodimerisierung mit den S1 bZIP-Proteinen CPRF6 und CPRF7 aus Petersilie gezeigt werden konnte (Strathmann, 2003). Die heptameren Wiederholung 6 und 7 sind nicht nur innerhalb der Gruppen C und S1 konserviert, sondern auch zwischen verschiedenen Spezies, was ein weitere Hinweis auf ihre Bedeutung ist. Diese ließe sich experimentell überprüfen, in dem man testet, ob durch Austausch der heptameren Wiederholung 6 und 7 zwischen zwei Faktoren der beiden Gruppen die Heterodimerisierungsspezifität geändert wird.

Im Gegensatz zu den anderen AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 ließe sich für AtbZIP1 durch die Abstoßung zwischen den g-e Paare E↔E und R↔K in

den heptameren Wiederholungen 1 und 3 zumindest eine bevorzugte Heterodimerisierung erklären. AtbZIP1 zeigt auch sonst Unterschiede in den für die



**Abbildung 6.1:** Skizze der Coiled Coil Struktur von bZIP-Proteinen, in der Ansicht von der Seite (A) und entlang der Achse (B). Die Berührungsfläche zwischen den beiden bZIP-Proteinen wird von den Aminosäuren in den Positionen a, d, e und f gebildet. Durch ein Apostroph wird angezeigt, zu welchem der beiden bZIP-Proteine die jeweilige Position gehört. Die Aminosäuren an Position a und d (dem Leucin) bilden ein hydrophobes Zentrum, die Aminosäuren an Position e und g können über elektrostatische Wechselwirkungen die Spezifität der Heterodimerisierung beeinflussen. N: N-Terminus; C: C-Terminus (nach Fong *et al.*, 2004).

	0	1 L	2	3	4	5 L	6 L	7	8
Gruppe C	gab <sup>c</sup> def	gab <sup>c</sup> def	gab <sup>c</sup> def	gab <sup>c</sup> def	gab <sup>c</sup> def	gab <sup>c</sup> def	gab <sup>c</sup> def	gab <sup>c</sup> def	gab <sup>c</sup> def
bZIP9	RIRRMNSNRESAKRSRRRQKE	YLVDLET QVDSLKG	DNSTLYK	QLIDATQ	QFRSAGT	NNRVLKS	DVETLRV	KVKLAED	LVARGSI*
bZIP10	KSRRLNSNRESARRSRRRQKE	QTSDLET QVNDLKG	EHS <sup>c</sup> SLK	QLSNMNH	KYDEAAV	GNRILKA	DIETLRA	KVKMAEE	TVKRV <sup>c</sup> TG*
bZIP25	RARRMLNSNRESARRSRRRQKE	QMNEFDT QVGQLRA	EHSTLIN	RLSDMNH	KYDAAAV	DNRILRA	DIETLRT	KVKMAEE	TVKRV <sup>c</sup> TG*
bZIP63	RVKRMLNSNRESARRSRRRQA	HLSELET QVSQLRV	ENSKLMK	GLTDVTQ	TFNDASV	ENRVLKA	NIETLRA	KVKMAEE	TVKRL <sup>c</sup> TG*
Gruppe S1	gab <sup>c</sup> def	gab <sup>c</sup> def	gab <sup>c</sup> def	gab <sup>c</sup> def	gab <sup>c</sup> def	gab <sup>c</sup> def	gab <sup>c</sup> def	gab <sup>c</sup> def	gab <sup>c</sup> def
bZIP1	KRRKRLNSNRESARRSRLLKQK	LMEDTTH EISSLER	RIKENSE	RCRAVKQ	RLDSVET	ENAGLRS	EKIWLSS	YVSDLEN	MIATTSI*
bZIP53	KRRKRLNSNRESARRSRMRKQK	QLGDLIN	EVTLLKN	DNAKITE	QVDEASK	KYIEMES	KNNVLRA	QASELTD	RLRSINS
bZIP2	KRRKRLNSNRESARRSRMRKQK	HVDDLTA	QINQLSN	DNRQILN	SLT <sup>c</sup> VTSQ	LYMKIQ	ENSVLTA	QMEELST	RLQSLNE
bZIP11	KRRKRLNSNRESARRSRMRKQK	LLDDLTA	QVNHLLK	ENTEIVT	SVSIT <sup>c</sup> TQ	HYLTVEA	ENSVLRA	QLDELNH	RLQSLND
bZIP44	KRRKRLNSNRESARRSRMRKQK	HLDDLTA	QVTHLRK	ENAQIVA	GIAVTTQ	HYVTIEA	ENDILRA	QVLELNH	RLQSLNE
Gruppe S2	gab <sup>c</sup> def	gab <sup>c</sup> def	gab <sup>c</sup> def	gab <sup>c</sup> def	gab <sup>c</sup> def	gab <sup>c</sup> def	gab <sup>c</sup> def	gab <sup>c</sup> def	gab <sup>c</sup> def
bZIP3	KQRRLNSNRESARRSRMRKQR	HLDELWS	QVAVLRS	ENHQLLD	KLNVQSD	NNDLVIQ	ENSSLKE	ENLELRQ	VITSMKK*LGGGIHD
bZIP42	KQRRLNSNRESARRSRMRKQR	HLDELWS	QVMWLRI	ENHQLLD	KLNNLSE	SHDKVLQ	ENAKLKE	ETFELKQ	VISDMQI*QSPFSCF
bZIP43	KQRRLNSNRESARRSRMRKQR	QVDELWS	QVMWLRD	ENHQLLR	KLNCVLE	SQEKVIE	ENVLKKE	ETTELKQ	MISDMQL*QNQSPFS
bZIP48	KQRRLNSNRESARRSRMRKQR	HLDELWS	QVIRLRN	ENNC <sup>c</sup> LID	KLNRVSE	TQNCVLK	ENSKLKE	EASDLRQ	LVCELKS* <sup>c</sup> NKNNNS
bZIP58	KQRRLNSNRESARRSRMRKQR	HLDELWS	QVIRLRT	DNHCLMD	KLNRVSE	SHELALK	ENAKLKE	ETSDLRQ	LISEIKS* <sup>c</sup> HNEDDNS
bZIP8	KRRRKVNSNRESARRSRMRKQR	HMEELWS	MLVQLIN	KNKSLVD	ELSQARE	CYEK <sup>c</sup> VIE	ENMKLRE	ENSKSRK* <sup>c</sup> MIGEIGL	NRFLSVE
bZIP70	RARRMVNSNRESARRSRMRKQK	QIEELQQ	QVEQLMM	LNHHLSE	KVINLLE	SNHQILQ	ENSQ <sup>c</sup> LKE	KVSSFHL	LMADVLI* <sup>c</sup> PMRNAES
bZIP75	RLRRMASNRESARRTRMRERM	MKEGLQM	QVKQLMA	YNQFLYN	KYISLLE	YNHQILQ	ENSQ <sup>c</sup> LKE	TVSSFHD	QYTISYG
Gruppe S3	gab <sup>c</sup> def	gab <sup>c</sup> def	gab <sup>c</sup> def	gab <sup>c</sup> def	gab <sup>c</sup> def	gab <sup>c</sup> def	gab <sup>c</sup> def	gab <sup>c</sup> def	gab <sup>c</sup> def
bZIP4	KRRRTISNRESAKRSRRK <sup>c</sup> KKK	RFEE <sup>c</sup> LTE	EVNRLNI	RNQLKLN	RLANVVS	CGNFI <sup>c</sup> SR	ENNRLKT	ESVCL <sup>c</sup> EI	RLLELYR
bZIP5	KRRKRLNSNRESAKRSREK <sup>c</sup> QK	HLEEMSI	QLNQLKI	QNQLKLN	QLRYVLY	HCQR <sup>c</sup> TKM	ENDRLLM	EHRILHD	KLLNIRQ
bZIP7	KRRKRLNSNRESAKRSRRK <sup>c</sup> QS	HIDNLRD	QVNRIDL	ENRELGN	RLRLVLH	QLQRVNS	DNRLVLT	EQEILRL	RLSEMRR* <sup>c</sup> ILII <sup>c</sup> RQL
bZIP6	KRRKRLNSNRESAKRSRRK <sup>c</sup> QR	HIDNLRD	EANRLGL	ENRELAN	RLRIVLY	NIALMCT	DNQ <sup>c</sup> L <sup>c</sup> LS	EQEILRR	RFL <sup>c</sup> EMRQ* <sup>c</sup> ILIFRQL

**Abbildung 6.2:** Aminosäuresequenzvergleich der bZIP-Domänen von den AtbZIP-Proteine der Gruppen C und S. Ein in der Gruppe S1, aber nicht in den Gruppen S2 und S3 konservierte Bereich, der möglicherweise für die Spezifität der C/S1 Heterodimerisierung verantwortlich ist, ist durch eine rote Umrandung gekennzeichnet. Die heptamere Wiederholung des Leucin-Zippers sind nach (McLachlan und Steward, 1975) mit den Buchstaben a-g gekennzeichnet und durchnummeriert. Das wahrscheinliche Ende der bZIP-Domäne ist durch einen roten Stern gekennzeichnet. Rot auf Grau: identische AS; Blau: konservierte AS; Schwarz auf Grau: ähnliche AS; Grün: schwache Ähnlichkeit.

Heterodimerisierungsspezifität relevanten Position a, e und g, was das im Vergleich zu den anderen Gruppe S1 Faktoren leicht abweichende Heterodimerisierungsverhalten erklären könnte (Ehlert *et al.*, zur Veröffentlichung eingereicht).

Ein anderer Ansatz, der Vorhersagen zur Heterodimerisierung über den Vergleich mit bekannten Interaktionen zwischen menschlichen bZIP-Proteinen versucht, ist ebenfalls nicht in der Lage, die C/S1 Heterodimerisierung vorherzusagen (Fong *et al.*, 2004).

Ein mögliche Erklärung für das Scheitern ist, dass die für die Vorhersagen genutzten Daten aus tierischen Systemen stammen. bZIP-Transkriptionsfaktoren mit langen Leucin-Zippen, wie man sie in Pflanzen in den Gruppen C und S findet, existieren in tierischen Organismen nicht (Deppmann *et al.*, 2004). Durch die langen Zipper-Domäne mit acht heptameren Wiederholungen existiert ein große Interaktionsfläche, die diverse Möglichkeiten zur Erzeugung von Spezifität lässt. Berechnet man die Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung von coiled-coil-Strukturen im Bereich des Leucin-Zippers mit dem „Coils“-Programm (Lupas, 1996), sieht man bei AtbZIP-Proteinen der Gruppen C und S1 einen deutlichen Rückgang der Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung einer coiled-coil Konformation im Bereich der 4. bis 5. Wiederholung. Bei den kurzen Zippeln der zu den anderen Gruppen gehörenden AtbZIP-Proteinen ist die Proteinsequenz des Zippers generell weniger flexibel, wahrscheinlich da die Aminosäuren dieses kurzen Bereichs für die Dimerbildung optimiert sein muss (Vinson *et al.*, 2002). Möglicherweise ist die Länge des Zippers und auch die Struktur demnach entscheidend für eine Interaktion und Dimerbildung.

### **6.3 AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 unterscheiden sich in ihren Aktivierungseigenschaften**

Die in Protoplasten erhaltene Daten zur Regulation des *ProDH*-Gens zeigten, dass alle AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 die Expression dieses Gens regulieren können. Eine denkbare Erklärung für diese Vielfalt an Regulatoren wäre, dass sie unterschiedliche Signale in die Regulation dieser Gene integrieren, die zu einer unterschiedlich starken Aktivierung der jeweiligen Zielgene führen. So ist bei der Regulation der Transkription von Zielgenen nicht nur entscheidend, ob ein Gen exprimiert wird, sondern auch, wie stark diese Expression ist. In dieser Arbeit konnte

gezeigt werden, dass die verschiedenen AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 in Hefe deutlich unterschiedliche Aktivierungseigenschaften haben. Die Aktivierungseigenschaften der bZIP-Proteine unterscheiden sich auch zwischen den Pflanzenspezies. Während *Arabidopsis* AtbZIP63 und AtbZIP53 in Hefe nicht aktivieren, zeigen ihre Homologe aus Tabak, BZI-1 und BZI-3, in Hefe deutliche Aktivierungseigenschaften. Für BZI-3 konnten Yang *et al.*, (2001) zeigen, dass der Carboxyterminus wichtig für die Genaktivierung ist. BZI-3 weist einen konservierten Carboxyterminus mit zahlreichen Prolinen auf, die aktivierend wirken können (Sprenger-Haussels und Weisshaar, 2000). Diese finden sich jedoch auch bei AtbZIP53, so dass sie alleine nicht für die Aktivierungseigenschaften verantwortlich sein können.

Die Aktivierungseigenschaften von Gruppe C/S1 AtbZIP-Transkriptionsfaktoren wurden von Andrea Ehlert im Rahmen ihrer Diplomarbeit auch in Protoplasten analysiert (Ehlert, 2004). Dabei fanden sich teils deutliche Unterschiede zu den in Hefe gemessenen Aktivierungseigenschaften. Während in Hefe die Gruppe C Faktoren AtbZIP9 und 10 starke Aktivierungseigenschaften zeigten, waren diese in Protoplasten nicht zu beobachten. Interessanterweise konnte dabei gezeigt werden, dass, obwohl weder AtbZIP10 noch AtbZIP53 alleine nennenswert aktivieren können, AtbZIP10/53 Heterodimere über ein starkes Aktivierungspotential verfügen. Dieser Effekt wurde sowohl unabhängig von der DNA-Bindung als auch bei Bindung an verschiedene *cis*-Elemente beobachtet, und wurde "heterodimer-induced transactivation" (HIT) genannt (Weltmeier *et al.*, zur Veröffentlichung eingereicht). HIT findet sich auch bei anderen Heterodimeren, z.B AtbZIP25/53 (Ehlert *et al.*, zur Veröffentlichung eingereicht).

Eine mögliche Erklärung scheint, dass beide bZIP-Proteine notwendig sind, um das Epitop einer Aktivierungsdomäne zu bilden, eine andere wäre, dass durch die Heterodimerisierung eine Interaktionsfläche gebildet wird, welche die Rekrutierung eines Koaktivators ermöglicht. Für AtbZIP10 und AtbZIP25 wurde eine schwache Interaktion mit ABI3 gezeigt, wobei für ABI3 in diesem Kontext eine Rolle als Koaktivator vermutet wird (Lara *et al.*, 2003). Inzwischen konnte in Hefe in einem "Yeast Three-Hybrid" System gezeigt werden, dass ABI3 deutlich mit AtbZIP10/53 Heterodimeren interagiert (Jesus Vicente-Carbajosa, persönliche Mitteilung). Damit scheint eine Erklärung des HIT-Mechanismus durch die spezifische Interaktion von Heterodimeren mit Koaktivatoren wie ABI3 möglich.

## 6.4 AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 sind Teil eines Zucker-abhängigen Signalweges

Die Tatsache, dass die Translation aller AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppe S1 spezifisch durch Saccharose reprimiert wird, legt eine Funktion des C/S1 Heterodimerisierungsnetzwerkes in den Transduktion von Zuckersignalen nahe (Wiese *et al.*, 2005). Eine deutliche Regulation findet sich auch auf der Transkriptionsebene. In dieser Arbeit konnte für *AtbZIP1*, *9* und *63* eine deutliche Repression durch Saccharose und Glukose gezeigt werden, und die gezeigten Transkriptomdaten bestätigen die bereits veröffentlichte Induktion von *AtbZIP11* durch Glukose und Saccharose (Rook *et al.*, 1998a; Rook *et al.*, 1998b).

Das Glukose-Analog 3-OMG wird von der Zelle aufgenommen wie Glukose, kann aber keine Hexokinase-abhängigen Signalwege aktivieren, und wird daher oft benutzt, um zwischen einer Regulation über Hexokinase-abhängige oder Hexokinase-unabhängige Signalwege zu unterscheiden (Xiao *et al.*, 2000). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Behandlung mit 3-OMG im Gegensatz zu Glukose nicht zu einer veränderten Transkription der AtbZIP-Transkriptionsfaktoren führte. Somit erfolgt die Übertragung des Zuckersignals zur Regulation der AtbZIP-Transkriptionsfaktoren wahrscheinlich über einen Hexokinase-abhängigen Signalweg. Bei den gezeigten Transkriptomdaten zur Glukoseregulation findet die Repression durch Glukose auch nach Vorbehandlung mit Cycloheximid statt, die Regulation erfolgt als über einen Signalweg, der keine Neusynthese von Proteinen benötigt. Das zudem bereits nach einer Stunde eine Abnahme der Transkriptmenge der durch Zucker reprimierten AtbZIP-Transkriptionsfaktoren zu sehen ist, spricht für einen kurzen Signalweg. Die transkriptionelle Aktivierung von *AtbZIP11* durch Glukose hingegen scheint die Neusynthese von Proteinen des Signalübertragungsweges zu benötigen, da sie nach Vorbehandlung mit Cycloheximid nicht mehr erfolgt.

Für *AtbZIP53* konnte in dieser Arbeit eine Regulation durch Veränderungen des osmotischen Wertes gezeigt werden. Jedoch führt Hypoosmolarität in Gegenwart einer externen Zuckerquelle zu einer schwächeren Induktion als Hypoosmolarität alleine. Dies weist auf eine Induktion von *AtbZIP53* sowohl durch Hypoosmolarität als auch durch Zuckermangel hin. Dass gleiche gilt auch für die *ProDH*, ein direktes Zielgen von *AtbZIP53*.

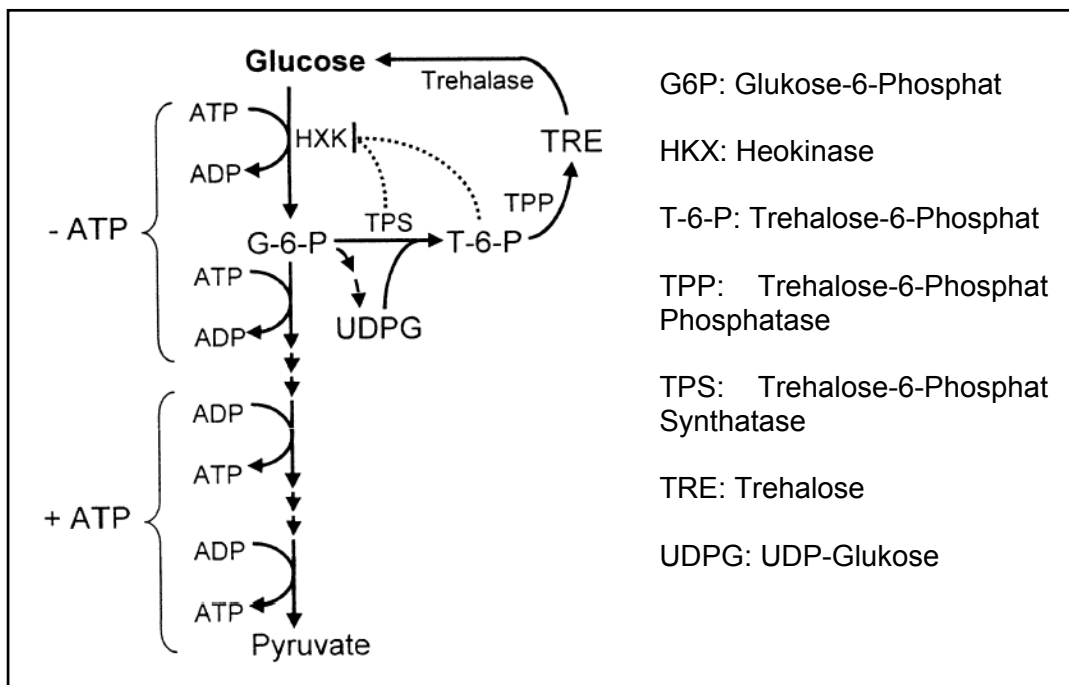
Für *AtbZIP1*, *53*, *9*, *25* und *63* wurde in dieser Arbeit eine deutliche Induktion durch Dunkelheit gezeigt. Diese steht wahrscheinlich in engem Zusammenhang mit der Zuckerregulation. Für viele DIN (dark-induced) Gene wurde eine Repression durch Glukose gezeigt, die über einen Hexokinase-abhängigen Signalweg erfolgt (Fujiki *et al.*, 2001b). Dunkelheit führt zu einer Abnahme der zellulären Zuckerkonzentration (Gibon *et al.*, 2004). Eine Induktion während der Dunkelheit kann also über Licht-abhängige Signale oder über Zucker-abhängige Signale erfolgen. Für die Transkription von *AtbZIP1*, *53*, *9* und *63* konnte gezeigt werden, dass sie nach Dunkelinduktion unabhängig von Licht durch Zucker reprimiert wird. Für die „*branched chain aminoacid transaminase*“ (*BCAT*), ein mögliches Zielgen, das in Mikroarrayexperimenten durch *AtbZIP1* und *AtbZIP53* (diese Arbeit) sowie auch durch *AtbZIP63* (Jesus Vicente-Carbajosa, persönliche Mitteilung) aktiviert wurde und somit ein mögliches direktes Zielgen darstellt, wurde eine Induktion nach Gabe von Photosynthese-Inhibitoren beschrieben, was ebenfalls für eine lichtunabhängige Regulation spricht (Fujiki *et al.*, 2002). Andererseits wird *AtbZIP25* zwar durch Dunkelheit induziert, aber nicht durch Zucker reprimiert, was hier eher für eine lichtabhängige Regulation spricht.

*AtbZIP11* wird bei Dunkelheit durch Glukose induziert, was eine lichtunabhängige Regulation durch Zucker belegt. Andererseits wird *AtbZIP11* in Keimlingen, bei denen die Bildung von Chloroplasten pharmakologisch verhindert wurde, weiter durch Licht induziert (Rook *et al.*, 1998b). Es muss also auch eine lichtabhängige, von der Photosynthese und der damit verbundenen Akkumulation von Zuckern unabhängige Regulation geben, sodass zumindest *AtbZIP11* sowohl durch Zucker als auch durch Licht reguliert wird. Eine Regulation durch Licht könnte auch posttranslational stattfinden, wie ist sehr detailliert für einen Gruppe C Faktor aus *Petersilie*, CPRF2, beschrieben worden ist. CPRF2 befindet sich bei Dunkelheit im Zytoplasma, und wird bei Licht in den Kern transportiert (Kircher *et al.*, 1999). Das Lichtsignal wird dabei über die Photochrome *phyA* und *pyhB* wahrgenommen (Kircher *et al.*, 1999), und führt zu einer Phosphorylierung von CPRF2, die wahrscheinlich für den folgenden Kerntransport verantwortlich ist. (Wellmer *et al.*, 1999). Viele durch Licht induzierte Gene, wie „*Chlorophyll a/b binding protein*“ Gene, enthalten G-Box oder C-Box Motive in ihren Promotoren, deren Bedeutung für die Licht-Regulation gezeigt wurde (Terzaghi und Cashmore, 1995). Es wird interessant sein zu untersuchen, in wie weit dies auch für *Arabidopsis* Gruppe C Faktoren zutrifft. Möglicherweise ist das C/S1 Netzwerk neben der in dieser Arbeit gezeigten Aktivierung von bei Dunkelheit



induzierten Genen auch an der Aktivierung von bei Licht induzierten Genen beteiligt. Dann ließe sich ein Model aufstellen, bei dem es im Zellkern, abhängig von den Licht- und Zuckerverhältnissen, zu einer Bildung von unterschiedlichen Heterodimeren käme, die eine gezielten Aktivierung oder Repression von für die Anpassung an diese Unterschiede wichtigen Zielgenen vermitteln würden. Dabei scheint vor allem die Regulation in Sink-Geweben von Bedeutung zu sein, da hier mit Hilfe der Promotor-GUS Fusionen eine vorwiegende Expression gezeigt werden konnte.

Sowohl *AtbZIP1* als auch *AtbZIP53* führen bei Überexpression zur Aktivierung von putativen *Trehalose-6-Phosphat Phosphatase-* (TPP-) Genen. Auch wenn die TPP Aktivität der von diesen Genen kodierten Enzyme noch nicht biochemisch nachgewiesen wurde, so konnte doch gezeigt werden, das sie spezifisch durch Trehalose-6-Phosphat (T-6-P) induziert werden, was ein deutlicher Hinweis darauf ist, das es sich wirklich um TPP handelt (Schluepmann *et al.*, 2004). T-6-P wurde in den letzten Jahren vermehrt als ein wichtiges Signalmolekül in der Kontrolle des Zuckernetabolismus in *Arabidopsis thaliana* diskutiert (Avonce *et al.*, 2005; Eastmond und Graham, 2003; Eastmond *et al.*, 2003). In Hefe wird angenommen, dass T-6-P als Inhibitor der Hexokinase fungiert und auf diese Weise den Fluss von Trehalose durch



**Abbildung 6.3: Modell des Trehalose-Metabolismus und seiner regulatorischen Wirkung in Hefe.** Trehalose-6-Phosphat(T-6-P) führt zu einer Inhibierung der Hexokinase, und auf diese Weise zu einem Sinken der Glykolyse-Rate (Thevelein and Hohmann, 1995). Eine verstärkte Trehalose-6-Phosphat Synthatase Aktivität führt zur Akkumulation von T-6-P und senkt die Glykolyse-Rate, eine verstärkte Trehalose-6-Phosphat Phosphatase Aktivität führt zum Abbau von T-6-P und steigert die Glykolyse-Rate.

die Glykolyse kontrollieren kann (Thevelein und Hohmann, 1995). Für *Arabidopsis thaliana* wird angenommen, dass T-6-P hier eine ähnliche Funktion hat (Schluepmann *et al.*, 2003). Da *AtbZIP1* und *AtbZIP53* in Gegenwart niedriger Zuckerkonzentrationen induziert werden, scheint es sinnvoll, dass sie unter diesen Bedingungen über einen Abbau von T-6-P den Fluss von Glukose durch die Glykolyse fördern. Interessanterweise konnte in einem Mikroarrayexperiment mit Pflanzen, die eine TPS aus *E.Coli* überexprimierten und auf diese Weise ein 3-fach höheren T-6-P hatten, eine deutliche Induktion der ProDH gezeigt werden (Schluepmann *et al.*, 2004). Möglicherweise existiert also eine Verbindung zwischen dem Trehalose- und dem Prolin-Metabolismus.

Die beiden durch *AtbZIP53* aktivierten Trehalose-6-Phosphat Phosphatasen (*TPP*) *At4g22590* und *At4g12430* werden stark in Pollen und bei Salzstress spezifisch in den Wurzeln exprimiert. Für die Induktion nach Salzstress konnte in dieser Arbeit eine Beteiligung von *AtbZIP53* und/oder *AtbZIP1* gezeigt werden. Diese Expressionsmuster deuten eher auf eine Funktion unter Wasserstress hin, wie sie in einzelnen Pflanzenspezies für die TPP gezeigt werden konnte (Bianchi *et al.*, 1993; Mueller *et al.*, 1995). Dabei dient das von der TPP synthetisierte Produkt, Trehalose, als kompatibler Osmolyt. Jedoch wurden in *Arabidopsis* bisher nur Spuren von Trehalose nachgewiesen, so dass eine solche Funktion hier unwahrscheinlich erscheint (Leyman *et al.*, 2001; Roessner *et al.*, 2000; Vogel *et al.*, 2001).

## **6.5 C/S1 Heterodimere vermitteln eine durch Zucker, Prolin und osmotische Signale regulierte Expression der *ProDH***

Als Reaktion auf Kälte, Salz oder Trocken-Stress akkumulieren viele Pflanzen Prolin (Delauney und Verma, 1993). Während der Erholung von abiotischem Stress kommt es zur Induktion einer Prolindehydrogenase, ein Enzym, welches den ersten Schritt der Degradation der Aminosäure Prolin katalysiert (Kiyosue *et al.*, 1996; Peng *et al.*, 1996; Verbruggen *et al.*, 1996). Für *AtbZIP53* wurde in dieser Arbeit die Bindung an den *ProDH*-Promotor durch ChIP nachgewiesen, und die Bindung von *AtbZIP1* an den *ProDH*-Promotor konnte von Katrin Dietrich im Rahmen ihrer Diplomarbeit durch ChIP ebenfalls gezeigt werden.

(Satoh *et al.*, 2002) konnten ein *cis*-Element identifizieren, das für die Induktion der *ProDH* bei Erholung von osmotischem Stress oder bei hypoosmolarem Stress verantwortlich ist. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Expression der *ProDH* über dieses Element durch C/S1 Heterodimere erfolgt. Dabei scheint *AtbZIP53* eine besonders wichtiger Regulator zu sein, da er wie die *ProDH* durch Hypoosmolarität und Prolin induziert wird. In Northern Analysen konnte gezeigt werden, dass die Induktion der *ProDH* durch die verwendete Hypoosmolaritätsbehandlung in der *atbzip53* Mutante reduziert ist. Das nur eine Reduktion zu sehen ist, ist dabei wahrscheinlich auf eine gewisse Redundanz zurückzuführen, da andere AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppe S1 ebenfalls die *ProDH* aktivieren können.

Neben der Hypoosmolarität wird die *ProDH* auch durch Zucker reguliert. Nach Inkubation in einer Saccharose-Lösung wird die *ProDH* stärker reprimiert als nach Inkubation in einer PEG-Lösung gleicher Osmolarität, und dies obwohl die Differenz des osmotischen Potentials bei Inkubation in der Saccharose-Lösung kleiner sein sollte, da Saccharose von der Pflanze aufgenommen werden kann. Diese verstärkte Repression ist spezifisch für Saccharose, und sie findet sich nicht für *AtbZIP53*. Da die Translation von Gruppe S1 Faktoren spezifisch durch Saccharose inhibiert wird, ist anzunehmen, dass diese posttranskriptionale Regulation für die verstärkte Repression der *ProDH* durch Saccharose verantwortlich ist. (Hellmann *et al.*, 2000) konnten zeigen, dass die Repression der *ProDH* durch Saccharose in der Mutante *rsr1* reduziert ist. Es wird daher interessant sein zu untersuchen, ob *rsr1* an Signalwegen beteiligt ist, die zu der transkriptionalen oder translationalen Regulation von AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 durch Zucker führen.

Von (Hare und Cress, 1997) wird ein möglicher Mechanismus für die Schutzfunktion von Prolin bei abiotischem Stress favorisiert, der über die Funktion als kompatibler Osmolyt hinausgeht. Prolin ist ein sehr guter Energieträger, die Prolin Biosynthese verbraucht viele Reduktionsäquivalente, und könnte unter Stress an der Wiederherstellung der terminalen Elektronenrezeptoren der Photosynthese beteiligt sein. Nach Ende des Stresses stellt der Abbau von Prolin diese Energie wieder zur Verfügung, die dann für die Regeneration der Pflanze zur Verfügung steht. (Abraham *et al.*, 2003) konnten zeigen, dass die Prolin Akkumulation nach Salzstress abhängig von Licht ist, was diese Modell unterstützt. Eine Funktion von Prolin als Energieträger könnte die Regulation durch Zucker erklären. Zu einer solchen Funktion von Prolin

passt auch, dass die *ProDH* ebenso wie die in dieser Arbeit untersuchten AtbZIP-Transkriptionsfaktoren durch Dunkelheit induziert werden.

Neben den bisher diskutierten Signalen muss es auch einen Prolin-abhängigen Signalweg geben. Eine Induktion durch Prolin war lange nur für die *ProDH* beschrieben, jedoch konnte in dieser Arbeit auch eine Induktion von *AtbZIP53* durch Prolin gezeigt werden. Des Weiteren wurden kürzlich einige Prolin-induzierte Gene mit Hilfe von zwei Subarrays, auf denen Gene für Membran- bzw. Chloroplasten-Proteine aufgetragen waren, identifiziert (Deuschle *et al.*, 2004). Das dabei am stärksten induzierte Gen war *ASN1*, das in dieser Arbeit durch ChIP als direktes Zielgen von *AtbZIP53* identifiziert wurde. Auch weitere, durch *AtbZIP53* deutlich aktivierte Gene werden durch Prolin induziert (Tabelle 6.1). Somit ist anzunehmen, dass *AtbZIP53* eine wichtige Rolle im Prolin-Signalweg spielt. Es wird spannend sein, zu sehen, welche Gene noch durch Prolin reguliert werden, wenn die ersten genomweiten Transkriptomanalysen hierzu veröffentlicht werden.

**Tabelle 6.1: Durch AtbZIP53 und Prolin induzierte Gene.** Die Daten zur Prolin-Induktion stammen von (Deuschle *et al.*, 2004).

Beschreibung	AGI-Code	Induktion durch Prolin (x-fach)
ASN1	At3g47340	21,35
ProDH	At3g30775	13,35
ankyrin repeat protein family	At1g10340	6,139
ankyrin repeat protein family	At5g54610	4,95
AtTIP3.1	At1g73190	2,74

## 6.6 AtbZIP53 ist möglicherweise Teil eines ABA-Signalweges

Promotor-Analysen der in dem Mikroarray-Experiment durch *AtbZIP53* aktivierten Gene zeigte eine Anreicherung dieses *ACGTGGC*-Motivs. Eine Bindung an dieses Motiv konnte außerdem für mehrere Homologe von *AtbZIP53* gezeigt werden, was dafür spricht, dass auch *AtbZIP53* an dieses Motiv bindet (siehe Tabelle 6.2). In der Literatur wurde dieses Motiv als *ABRE* (*abscisic acid response element*) beschrieben (Skriver *et al.*, 1991). *ABRE* sind zwar nicht über eine exakt konservierte Sequenz, sondern eher über die Funktion definiert (Zur Übersicht siehe (Busk und Pages, 1998), aber Expressionsstudien zeigen, dass vor allem *ABRE*, die die Sequenz *ACGTGGC* enthalten, eine starke ABA-Antwort vermitteln können (Shen und Ho, 1995; Vasil *et al.*, 1995).

Bindestudien der Tabak bZIP-Proteine BZI-1 (Gruppe C) und BZI-2, BZI-3 und BZI-4 (alle Gruppe S) zeigten, dass alle Faktoren in der Lage waren, alleine an dieses Element zu binden. Wurden jedoch Kotranslatate von BZI-1 und BZI-2, -3 oder -4 verwendet, zeigte sich eine bevorzugte Bindung des Heterodimers. Dies entspricht der in dieser Arbeit gezeigten bevorzugten Heterodimerisierung von bZIP-Proteinen der Gruppe C mit bZIP-Proteinen der Gruppe S1. Für AtbZIP10 und AtbZIP25 konnte in Gelretardationsanalysen die Bindung an ein *ABRE*-Element im Promotor des Speicherprotein-Gens Cruciferin gezeigt werden, der auch von AtbZIP53 aktiviert wird (Lara *et al.*, 2003). Da für die BZI-Proteine eine bevorzugte Bindung der Heterodimere an dieses Element gezeigt wurde, wird es wahrscheinlich von AtbZIP10/AtbZIP53 oder AtbZIP25/AtbZIP53 Heterodimeren gebunden.

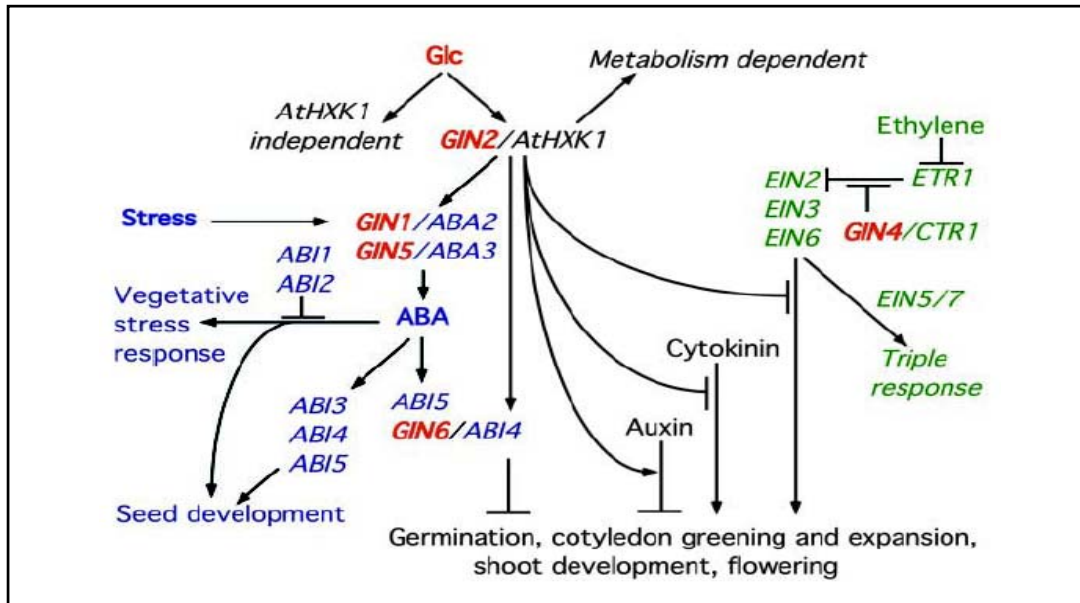
**Tabelle 6.2: Durch Gelretardationsanalyse (GRA) identifiziert Bindeelemente von zu AtbZIP53 Homologen Proteinen.** Anmerkungen: **1:** Wird in GRA bevorzugt durch BZI1-Heterodimere mit BZI-2, -3 und -4, aber auch durch die entsprechenden Homodimere gebunden. Bindung für BZI-1 durch ChIP bestätigt (Strathmann, 2003). **2:** Wird in GRA durch BZI-4 Homodimere, aber nicht durch andere BZI-Homodimere oder Heterodimere gebunden. Bindung von BZI-4 durch ChIP bestätigt. **3:** Das synthetische Bindeelement wurde durch Selex identifiziert, und wurde als C/G-Hybrid auch von (Skimizu *et al.*, 2005) verwendet. **4:** Wird in GRA durch Homodimere gebunden, die Bindung wird durch das G-box Element (Kusano *et al.*, 1998) kompetetiert. **5:** Wird in GRA durch Homodimere gebunden, die Bindung wird durch das G-box Element kompetetiert. **6:** Bindeelemente durch Selex identifiziert, die obere Zeile gibt variable Basen an. bZIP910 und bZIP911 binden nur Schlecht an die G-Box aus dem *CHS*-Promotor. **7:** Wird in GRA nur von dem OBF1/lip19 Heterodimer, nicht von den Homodimeren gebunden. **8:** Bindung durch ChIP und in Protoplasten-Assays gezeigt. **9:** Putative Bindestellen für AtbZIP53 in den Promotoren von in dieser Arbeit identifizierten möglichen Zielgenen, Bindung nicht gezeigt.

Faktor	Bindeelement	Ursprung	An-merkung	Publikation
BZI1,2,3,4	tgta <b>GACGT</b> Ggcga	<i>GH3</i> -Promotor	1	Strathmann, 2003
BZI-4	aaag <b>CACGT</b> Ggcac	<i>NIN88</i> -Promotor	2	Strathmann, 2003
tbzf/tbz17	tggt <b>GACGT</b> Ggcag	Selex, C/G-hybrid	3	Yang <i>et al.</i> , 2001
TBZ17	tggt <b>GACGT</b> Ggccg cggc <b>CACGT</b> Ggcca	<i>Histon H3</i> -Promotor G-Box		Kusano <i>et al.</i> , 1998
mlip15	tggt <b>GACGT</b> Ggccg	<i>Histon H3</i> -Promotor	4	Kusano <i>et al.</i> , 1995
CPRF6,7	attc <b>CACGT</b> Ggcca	<i>CHS</i> -Promotor	5	Rugner <i>et al.</i> , 2001
bZIP910	g c gat <b>GACGT</b> Ggca	Selex	6	Martinez-Garcia <i>et al.</i> , 1998
bZIP911	g gat <b>GACGT</b> Ggcc	Selex	6	Martinez-Garcia <i>et al.</i> , 1998
OsOBF1	tggt <b>GACGT</b> Ggccg	<i>Histon H3</i> -Promotor		Skimizu <i>et al.</i> , 2005
OBF1/lip19	tggt <b>GACGT</b> Ggcag	C/G-Hybrid	7	Skimizu <i>et al.</i> , 2005
AtbZIP53	ggat <b>GA GT</b> Ggatg	<i>ProDH</i> -Promotor	8	diese Arbeit
AtbZIP53	atcc <b>TACGT</b> Ggctc	<i>CRU3</i>	9	
AtbZIP53	aaga <b>CACGT</b> Ggcgt	<i>atper1</i>	9	
AtbZIP53	ttgct <b>TACGT</b> Ggcaa	<i>AIL1</i>	9	

Ein *ACGTGGC*-Motiv wurde auch als durch Licht aktiviertes Element des Chalconsynthese (*CHS*) Gens beschrieben (Sprenger-Haussels und Weisshaar, 2000). Jedoch zeigen viele der ein *ACGTGGC* Motiv enthaltenden, durch *AtbZIP53* aktivierten Gene eine Induktion durch ABA, nicht jedoch durch Licht, und *AtbZIP53* selbst wird durch Dunkelheit induziert. Eine Regulation von durch Licht aktivierten Elementen durch *AtbZIP53* ist daher sehr unwahrscheinlich. Entsprechend wurde für den Gruppe C Faktor BZI-1 aus Tabak gezeigt, dass er zwar *in vitro* an dieses Element binden kann, jedoch nicht *in vivo* an der Regulation der *CHS* beteiligt ist (Heinekamp *et al.*, 2002).

Neben der Bindung an das *ABRE*-Element gibt es weitere Hinweise auf eine Funktion von *AtbZIP53* in einem ABA-Signalweg. So wird die Expression der Samenspezifischen Gene, an der *AtbZIP53* beteiligt ist, über ABA gesteuert (Gubler *et al.*, 2005). Zudem konnte für *AtbZIP53* in dieser Arbeit eine spezifische Expression in Spaltöffnungen gezeigt werden, die durch ABA reguliert werden (Tallman, 2004). Außerdem ist ABA von zentraler Bedeutung in der Antwort auf Salzstress, und für *AtbZIP53* konnte in dieser Arbeit ebenfalls eine Funktion bei Salzstress gezeigt werden. Interessanterweise sind ABA-Signalwege auch eng mit Zuckersignalwegen verknüpft (Rolland *et al.*, 2002). So sind wichtige Mutanten des ABA-Signalweges, wie *aba2*, *aba3* oder *abi4*, gleichzeitig auch Mutanten der Glukose Signalübertragung (*gin1*, *gin5* und *gin6*; siehe Abbildung 6.4). Angesichts der Funktion der C/S1 *AtbZIP*-Transkriptionsfaktoren in der Zucker-Signaltransduktion wäre es also nicht überraschend, wenn sie auch Funktionen in einem ABA-Signalweg hätten.

Andererseits aktiviert *AtbZIP53* die *ProDH*, die durch ABA reprimiert wird. Zudem wird *AtbZIP53* selbst nicht durch ABA induziert. Möglicherweise ist für die ABA-abhängige Aktivierung der *ABRE*-Elemente ein Koaktivator wie ABI3 nötig, während dies bei dem *ACTCAT*-Motiv aus dem *ProDH*-Promotor nicht der Fall ist. Die Bedeutung von ABI3 für die Aktivierung des *ABRE*-Elementes wurde für Speicherprotein-Gene bereits gezeigt (Lara *et al.*, 2003). Für ein weiteres von *AtbZIP53* aktiviertes Gene, *AtPer1*, wurde gezeigt, dass ABI3 an der Aktivierung beteiligt ist, und dass diese über das in Tabelle 6.2 gezeigte *ABRE*-Element erfolgt (Haslekas *et al.*, 2003). Da ABI3 nicht an *ACGT*-Motive bindet, fungiert es hier wahrscheinlich wie bei den Speicherprotein Genen als Koaktivator an C/S1 Heterodimeren. Dasselbe gilt möglicherweise auch für die Regulation des in dieser Arbeit als wahrscheinliches Zielgen von *AtbZIP53* identifizierten LEA-Gens *AIL1*. Dieses Gen enthält zwei *ABRE*-Motive in seinem Promotor wird durch ABA induziert (Fujita *et al.*, 2005). In dieser



**Abbildung 6.4:** Übersicht über die Interaktionen zwischen Zucker- und Hormon-Signalwegen in *Arabidopsis* (nach Rolland *et al.*, 2002). Die Mutanten *gin1* und *aba2* sind allelisch und kodieren für eine Enzym der ABA-Biosynthese (Rook *et al.*, 2001). Die Mutanten *gin6*, *sun6*, *sis5*, und *isi3* sind allelisch zu *abi4*, einer ABA-insensitiven Mutante (Arenas-Huertero *et al.*, 2000; Huijser *et al.*, 2000; Rook *et al.*, 2001). Glukose aktiviert *Abi4*, ein Gen dass einen AP2 Transkriptionsfaktor kodiert (Finkelstein *et al.*, 1998). Die Aktivierung benötigt ABA, auch wenn *Abi4* nicht direkt durch ABA induziert wird (Arenas-Huertero *et al.*, 2000). Andere Mutanten, die kein ABA bilden können (*aba1-1*, *aba2-1*, und *aba3-2*), sind ebenfalls Glukose-insensitiv (Arenas-Huertero *et al.*, 2000; Huijser *et al.*, 2000; Laby *et al.*, 2000). Die *abi5* Mutante ist ebenfalls Glukose-insensitiv. Andere ABA-insensitive Mutanten (*abi1-1*, *abi2-1*, und *abi3-1*) zeigen keinen Glukose-insensitiven Phänotyp (Arenas-Huertero *et al.*, 2000; Huijser *et al.*, 2000; Laby *et al.*, 2000), sodass wahrscheinlich nur ein bestimmter ABA-Signalweg in die Zucker-Signaltransduktion involviert ist. (*gin*: Glukose-insensitiv; *abi*: ABA-insensitiv; *aba*: keine ABA-Synthese; *sun*, *sis* und *isi*: Saccharose-insensitiv)

Arbeit wurde gezeigt, dass *AIL1* wie *AtbZIP53* bei Salzstress spezifisch in der Wurzel induziert wird, und von unserem Kooperationspartner Jesus Vincente-Carbajosa konnte mittlerweile gezeigt werden, dass die Samen-spezifische Expression von *AIL1* in der *atbzip53* Mutante deutlich reduziert ist, was belegt, dass es sich wirklich um ein Zielgen von *AtbZIP53* handelt. In *Arabidopsis* wurde *AIL1* bisher kaum untersucht, jedoch ist es ein Homolog zu *HVA1* aus Gerste. Für *HVA1* wurde eine ABA-vermittelte Aktivierung über das *ACGTGGC* Motiv beschrieben, an der das *ABI3*-Homolog aus Gerste, *VP1*, beteiligt ist (Shen *et al.*, 2001). Zudem wird *HVA1*, wie *AtbZIP53* und *AIL1*, durch Salzstress induziert, und die Überexpression von *HVA1* führt zu einer erhöhten Salztoleranz (Xu *et al.*, 1996). Sollte *AIL1* ebenfalls eine erhöhte Salztoleranz bewirken, so könnte dies die erhöhte Salzresistenz von *35S:AtbZIP53* Pflanzen erklären. Durch Überexpression von *AtbZIP53* in einer *AIL1* Mutante und anschließender Analyse der Salzresistenz dieser Pflanzen ließe sich diese Hypothese experimentell überprüfen.

## 6.7 C/S1 Heterodimere regulieren die Expression von Samenspeicherprotein- und LEA-Genen.

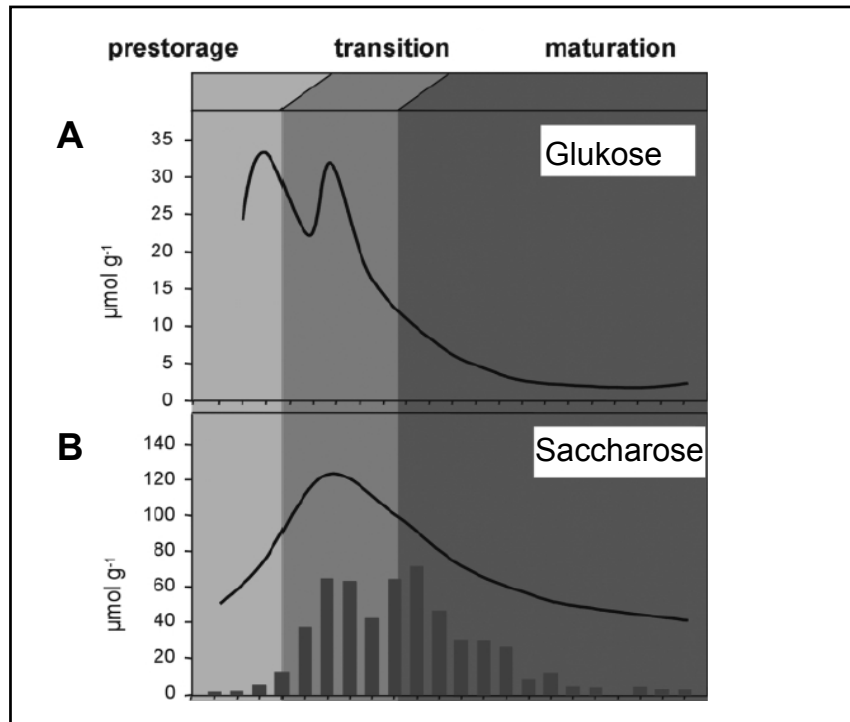
Die Samenentwicklung lässt sich in zwei Phasen unterteilen. In der ersten Phase, in der Zellteilungen vorherrschen, entwickelt sich die Zygote zum Embryo und das Endosperm wird angelegt. Während der zweiten Phase findet kaum noch Zellteilung statt, der Samen lagert Nährstoffe ein und wird Austrocknungsresistent (Zur Übersicht siehe (Fujiwara *et al.*, 2002)). In dieser zweiten Phase findet die unter anderem auch durch das Phytohormon Abscisinsäure (ABA) regulierte Expression von Samenspeicherprotein-Genen und LEA-Genen statt (Bray, 1993; McCarty, 1995). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *AtbZIP53*, vermutlich als Heterodimer mit *AtbZIP10* oder *AtbZIP25*, an der Regulation der Speicherprotein-Gene beteiligt ist. Eine Aktivierung der Promotor der Speicherprotein-Gene *2S1* und *Cruciferin* durch *AtbZIP53* konnte mittlerweile auch in Protoplasten-Assays gezeigt werden (Andrea Ehlert, persönliche Mitteilung).

Betrachtet man die Transkriptomdaten (Abbildung 5.41), wird *AtbZIP53* wie die Speicherprotein-Gene bereits im Torpedo-Stadium exprimiert, und in den folgenden Entwicklungsstadien steigt die Expression weiter an. Für LEA Gene ist ein späterer Anstieg der Expression typisch, wie er sich auch für *AtbZIP1* findet. *AtbZIP1* und viele LEA-Gene werden im Torpedostadium nicht oder kaum exprimiert. Für *AtbZIP1* konnte in Protoplasten-Assays keine Aktivierung der Promotor der Speicherprotein-Gene *2S1* und *Cruciferin* gezeigt werden (Andrea Ehlert, persönliche Mitteilung). Somit ist *AtbZIP1* wahrscheinlich eher an der Expression von LEA-Genen beteiligt, und entsprechend wurde in der Transkriptomanalyse von *35S:AtbZIP1* Pflanzen ein LEA-Gen (At1g54890) als 3,24fach aktiviert gefunden.

Interessanterweise sind die S1 Faktoren *AtbZIP11* und *AtbZIP44* zu Beginn der Samenentwicklung deutlich exprimiert, und die Expression nimmt während der Samenreifung ab, sie sind also gegenläufig zu *AtbZIP1* und *AtbZIP53* reguliert. Dieses Muster lässt sich vielleicht mit Änderungen der Zuckerkonzentrationen in den Samen während der Entwicklung erklären. Am Beispiel von Gerste konnte gezeigt werden, dass Glukose nur in der ersten, meristematischen Phase der Entwicklung zur Ernährung des Embryos dient. Im Übergang zwischen der ersten und der zweiten findet ein Wechsel auf eine Ernährung durch Saccharose statt, und im Verlauf der zweiten Phase



sinkt auch die Saccharose Konzentration (Abbildung 6.5; (Borisjuk *et al.*, 2004). Die Zuckerkonzentrationen verlaufen dabei parallel zur Expression des Zucker-induzierbaren Gens *AtbZIP11*, und reziprok zu der Expression der Zucker-reprimierten Gene *AtbZIP1* und *AtbZIP53*.



**Abbildung 6.5: Zuckergehalt von Gerstenkörnern während der Samenentwicklung.** Die schwarze Linie gibt die Glukose- (A) bzw. Saccharose-Konzentration (B) wieder. Die Balken in B repräsentieren die Transkriptmenge des Saccharosetransporter-Gens *HvSUT1*. Prestorage: frühe Phase; Maturation: späte Phase der Samenentwicklung (aus Borisjuk *et al.*, 2004)

## 6.8 *AtbZIP1* und *AtbZIP53* regulieren die Umstellung des Metabolismus während Dunkel-induzierter Seneszenz

In dieser Arbeit konnte eine Funktion von AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 an der Seneszenz gezeigt werden. So wurde gezeigt, dass die Überexpression von *AtbZIP1* oder *AtbZIP53* zur Induktion von Seneszenz-assoziierten Genen führt. Die Überexpression von *AtbZIP63* führt ebenfalls zur Induktion von Seneszenz-assoziierten Genen (Jesus Vicente-Carbajosa, persönliche Mitteilung). Zudem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Prozess der Dunkel-induzierten Seneszenz in

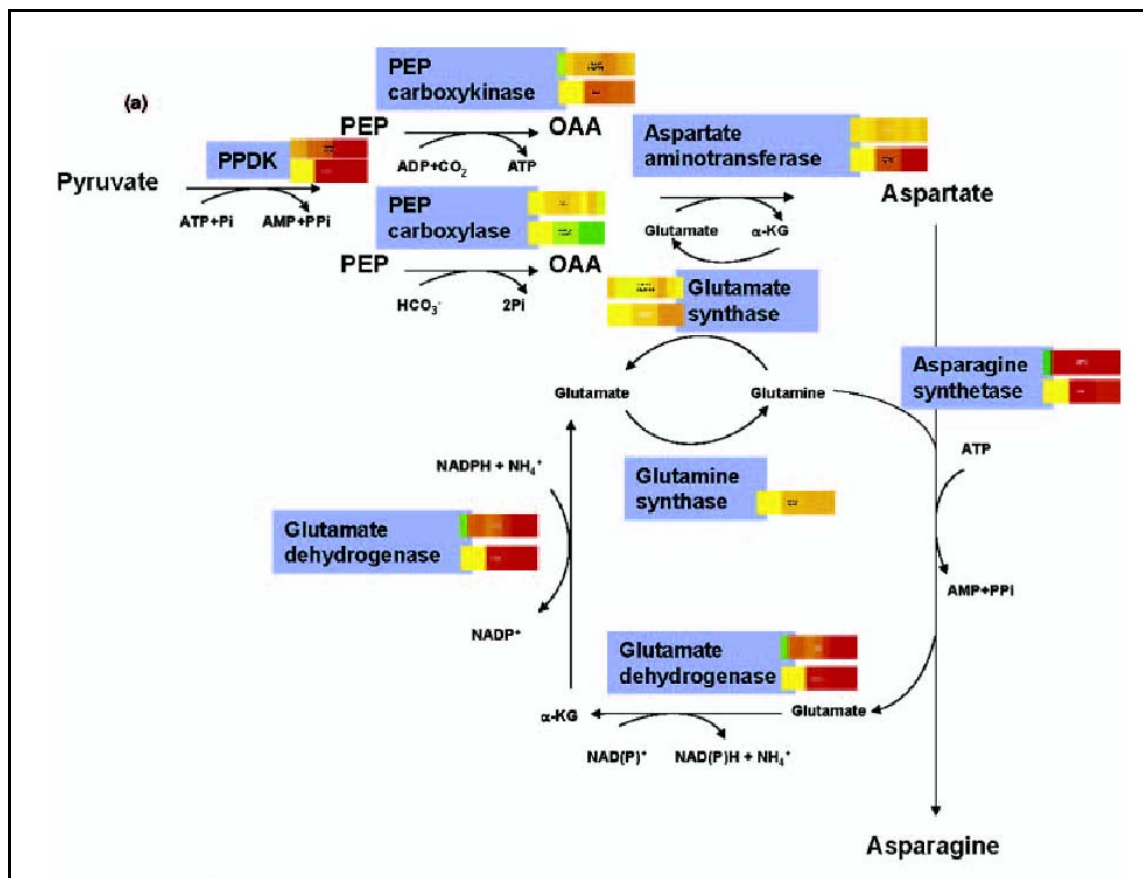
*35S:AtbZIP1* Linien deutlich schneller abläuft, während er in einer *atbzip1* Mutante verlangsamt ist. In Northern-Analysen und durch Transkriptomdaten wurde gezeigt, dass alle AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 auf der Transkriptionsebene durch Seneszenzprozesse reguliert werden. Dabei ist jedoch die Kinetik der Transkription der verschiedenen Faktoren unterschiedlich und von der Form der Seneszenz abhängig. Dies könnte dazu führen, dass bestimmte Heterodimere in verschiedenen Phasen oder Formen der Seneszenz überwiegen, und so eine unterschiedliche, der jeweiligen Phase oder Form der Seneszenz entsprechende Regulation von Zielgenen erlauben.

Die Seneszenz von Blättern ist ein Abfolge von degradativen Prozessen, die neben dem Stop der Photosynthese den Abbau von Proteinen, Membranen, RNA und DNA, die Hydrolyse von Polysacchariden und die Oxidation von Fettsäuren beinhaltet (Smart, 1994). Für Mais konnte gezeigt werden, dass die durch andauernde Dunkelheit induzierten degradativen Prozesse in Sink-Geweben früher beginnen als in ausgewachsenen Blättern (Brouquisse *et al.*, 1998). Mit Hilfe von Promotor-GUS Fusionen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Expression von *AtbZIP1* und *AtbZIP53* bei andauernder Dunkelheit vorwiegend in diesen Geweben erfolgt. Zudem fanden sich unter den in den Transkriptom-Analysen von *35S:AtbZIP1* und *35S:AtbZIP53* Pflanzen identifizierten putativen Zielgenen verschiedene Gene, die Enzyme des Katabolismus kodieren. Eines dieser Enzyme, die branched chain aminoacid transaminase (BCAT; At1g10070), katalysiert die Eintrittsreaktion des Abbauweges von den verzweigten Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin (Diebold *et al.*, 2002; Fujiki *et al.*, 2001a; Schuster und Binder, 2005). Dieses Enzym stellt ein besonders interessanten Kandidaten für ein direktes Zielgen dar, da es in Transkriptomanalysen sowohl in *AtbZIP1*, *AtbZIP53* als auch in *AtbZIP63*-Überexpressionslinien aktiviert und in der *atbzip1/atbzip53* Doppelmutante reprimiert wurde. Zudem wurde für die BCAT gezeigt, dass sie, wie die AtbZIP-Transkriptionsfaktoren, stark durch Zucker-Verarmung und Dunkelheit induziert wird (Fujiki *et al.*, 2002).

Ein anderes Enzym des Aminosäure-Katabolismus, die *ProDH* (At3g30775), wurde bereits ausführlich als direktes Zielgen besprochen. Von der *ProDH* existiert zudem ein Isoenzym (At5g38710), das ebenfalls durch *AtbZIP53* aktiviert wurde, und das laut Genevestigator deutlich durch Seneszenz induziert wird. Enzyme des Arginin-Katabolismus (Arginase (At4g08870); 3,6x aktiviert in *35S:AtbZIP1*; 0,6x reprimiert in

*atbzip1/atbzip53*; Alanine-Glyoxylate Aminotransferase (At4g08870); 2,25x aktiviert in 35S:AtbZIP1; 0,6x reprimiert in *atbzip1/atbzip53*) wurden ebenfalls aktiviert.

Besonders interessant ist eine Gruppe von Genen, die Enzyme des Glutamin- und Asparagin-Metabolismus regulieren. Es konnte gezeigt werden, dass es während Dunkel-induzierter Seneszenz zu einer verstärkten Akkumulation von Asparagin in den Blättern kommt, während die Konzentration von Glutamin, das normalerweise der bevorzugte Metabolit für Speicherung und Transport von Stickstoff ist, sinkt (Lin und Wu, 2004). Dies wird auf das bessere C/N Verhältnis von Asparagin zurückgeführt, das bei Zuckermangel bedeutend wird. Anhand von Transkriptomdaten wurde von (Lin und Wu, 2004) ein Stoffwechselweg für die Synthese von Asparagin während der Dunkel-induzierten Seneszenz vorgeschlagen (Abbildung 6.6). Eine Zentrale Funktion hat dabei die Asparagin-Synthase *ASN1*, für die in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass sie



**Abbildung 6.6: Modell eines Stoffwechselweges zur Mobilisierung von Stickstoff durch Synthese von Asparagin in Dunkelheit ausgesetzten Blättern (Lin und Wu, 2004).** Die Balken neben den Enzymen geben die Expression der entsprechenden Gene im Laufe der Dunkel-induzierten Seneszenz wieder, die beiden Balken stehen dabei für mit zwei unterschiedlichen Mikroarray-Systemen gewonnene Daten. Dabei werden von links nach rechts die Expressionsunterschiede zu verschiedenen Zeitpunkten der Dunkel-Induktion wiedergegeben (0, 6, 12 Stunden und 1-6 Tage auf den oberen Balken, 0, 2 und 5 Tage auf den unteren Balken). PEP: Phosphoenol-Pyruvat; PPDK: Phosphoenol-Pyruvat Dikinase.

ein direktes Zielgen von AtbZIP53 ist. Auch andere, an diesem Weg beteiligten Enzyme werden in den *AtbZIP1* bzw. *AtbZIP53* Überexpressionspflanzen verstärkt exprimiert. In Kapitel 5.6.4 wurde eine Induktion der *ASN1* sowie der *PEP-Carboxykinase* in Transkriptomanalysen von *AtbZIP53* Überexpressionspflanzen gezeigt und in Northern-Analysen reproduziert. Die Transkriptomanalysen einer *35S:AtbZIP1* Linie und der *atbzip1/atbzip53* Doppelmutante zeigen auch eine Regulation anderer an dem Weg beteiligter Enzyme (*glutamine synthase* (*At5g37600*); 2,25x aktiviert in *35S:AtbZIP1*; 0,8x reprimiert in *atbzip1/atbzip53*; *glutamate dehydrogenase 2* (*At5g07440*); 1,6x aktiviert in *35S:AtbZIP1*; 0,36x reprimiert in *atbzip1/atbzip53*; *aspartate aminotransferase* (*At5g11520*); 2,25x aktiviert in *35S:AtbZIP1*; 0,16x reprimiert in *atbzip1/atbzip53*).

Eine Funktion von zu den Gruppen C und S1 gehörenden AtbZIP-Transkriptionsfaktoren in der Seneszenz würde zu ihrer vermuteten Rolle in ABA-Signalwegen ebenso wie zu ihrer Funktion bei Zuckermangel passen, da ABA ebenso wie Zuckermangel Seneszenz induzieren kann (Yang *et al.*, 2003). Möglicherweise spielt auch *ABI3* hier eine Rolle, da für die *abi3*-Mutante ebenfalls eine verzögerte Seneszenz beschrieben wurde (Robinson und Hill, 1999). *ASN1* und *ABI3* könnten dabei auch Seneszenz-Prozesse und die Samenentwicklung verbinden, da für beide eine Funktion in der Umverteilung von Metaboliten in die Samen beschrieben wurde, wie sie möglicherweise während der Seneszenz stattfindet (Lam *et al.*, 2003; Robinson und Hill, 1999).

Unter den durch Seneszenz bzw. Zuckermangel und durch Überexpression von *AtbZIP1* oder *AtbZIP53* induzierten Genen finden sich auch solche, deren Funktion nicht gleich zu erkennen ist, darunter mehrere Protease-Inhibitoren, Lipoxygenasen oder *PR*-Gene. Diese Gene werden eher der Pathogenabwehr zugeordnet. In den in dieser Arbeit gezeigten Transkriptomanalysen führte die Überexpression von *AtbZIP1* oder *AtbZIP53* zur Expression von weiteren Pathogen-induzierbaren Genen. In der Literatur finden sich Hinweise auf eine mögliche Funktion von C/S1 bZIP-Transkriptionsfaktoren in der Pathogenabwehr. So wird die Transkription von *BZI-1* durch virale und bakterielle Pathogene induziert (Kuhlmann *et al.*, 2003), und in *Capsicum chinense* wurde für einen zur Gruppe S1 gehörenden bZIP-Transkriptionsfaktor, *PPII*, ebenfalls eine Induktion durch Pathogene gezeigt (Lee *et al.*, 2002). Für *Arabidopsis thaliana* zeigen Transkriptomdaten, dass aus den Gruppen C und S1 nur *AtbZIP1* nach Pathogenbefall leicht induziert wird. Jedoch werden so posttranskriptionale Mechanismen nicht erfasst,

die von entscheidender Bedeutung sein könnten. So wird z.B. der zur Gruppe C gehörende bZIP-Transkriptionsfaktor G/HBF-1 kurz nach Infektion mit dem Pathogen *Pseudomonas* phosphoryliert (Droge-Laser *et al.*, 1997). *AtbZIP1* bzw. *AtbZIP53* Überexpressionslinien sowie die entsprechenden Mutanten wurden von Katrin Dietrich im Rahmen ihrer Diplomarbeit auf eine veränderte Resistenz gegen *Pseudomonas syringae* untersucht, jedoch konnten dabei keine Unterschiede zum Wildtyp festgestellt werden.

Viele Dunkel-induzierte oder Seneszenz-assoziierte Gene werden auch durch Pathogene induziert (Ho *et al.*, 2001; Quirino *et al.*, 2000). Die in der *35S:AtbZIP1*-Linie stärker exprimierte Lipoxygenase ist Teil des Jasmonsäure-Syntheseweges und wird stark durch Pathogene oder Verwundung induziert, und viele Jasmonsäure-induzierbare Gene werden auch durch Zucker reguliert (Reinbothe *et al.*, 1994; Sadka *et al.*, 1994). Es scheint also eine enge Verbindung zwischen diesen Stressen und Zuckermangel zu geben. In Hefe und Mäusen wird die Existenz eines stark konservierten regulatorischen Systems postuliert, das Stress-Resistenz, Metabolismus und Alterungsprozesse reguliert (Kenyon, 2001). Die Existenz eines solchen Systems wäre auch in Pflanzen denkbar.

## 6.9 Ausblick

Die bisher verfügbaren Daten lassen vermuten, dass die AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 ein komplexes regulatorisches Netzwerk darstellen, das vorwiegend Prozesse des Metabolismus in Abhängigkeit von verfügbaren Zuckern, verschiedenen Stressen und entwicklungsbiologischen Signalen kontrolliert.

Sollte diese Vermutung richtig sein, so sollten sich in Mutanten oder Überexpressionslinien Unterschiede im Zucker- oder Aminosäuregehalt finden. Erste Messungen des Zuckergehalts der in dieser Arbeit untersuchten transgenen Linien haben noch keine klaren Unterschiede gezeigt, vielleicht aufgrund der möglichen Redundanz zwischen den einzelnen AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1. Es wird daher, gerade für die Analyse der biologischen Funktion, notwendig sein, verschiedene Mehrfach-Mutanten zu erzeugen. Damit wurde in dieser Arbeit begonnen, jedoch stehen bisher nur Doppel-Mutanten zur Verfügung. Wichtig wird auch die

Erzeugung von Linien sein, die beide Partner eines Heterodimers überexprimieren, idealerweise in einem Hintergrund, in dem die anderen Faktoren der Gruppen C und S1 nicht exprimiert werden, sodass gezielt die Funktion eines Heterodimers betrachtet werden kann.

Für die weitere Charakterisierung der AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 wird es von entscheidender Bedeutung sein, weitere direkte Zielgene zu identifizieren. Dies bietet sich besonders an, da hierfür neue Methoden entwickelt wurden, die eine praktikable Möglichkeit bieten, genomweit nach Zielgenen zu suchen. Ein möglicher Ansatz sind Analysen des Transkriptoms kurz nach einer induzierten Expression der AtbZIP-Transkriptionsfaktoren, gefolgt von einer Cycloheximid-Behandlung (siehe z.B. Wang *et al.*, 2005). Auf diese Weise werden überwiegend nur direkte Zielgene der AtbZIP-Transkriptionsfaktoren aktiviert. Wird das Transkriptom zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer induzierten Expression der AtbZIP-Transkriptionsfaktoren untersucht, lassen sich aufgrund der Kinetik direkt regulierte von indirekt regulierten Genen unterscheiden. Die Identifizierung von direkten Zielgenen wäre durch die Kombination von Chromatin-Immunopräzipitation mit Promotor-Arrays möglich ("ChIP on chip", siehe Blais und Dynlacht, 2005; Testa *et al.*, 2005; Wang, 2005), jedoch ist dieser Ansatz wahrscheinlich aufwendiger.

Vieles spricht dafür, dass die spezifische Dimerisierung von bZIP Transkriptionsfaktoren eine Zielgen-Spezifität bewirken kann. So konnte in Tabak gezeigt werden, dass BZI-4 Homodimere an eine G-Box im *NIN88* Promotor binden, BZI-1 / BZI-4 Heterodimere hingegen nicht (Strathmann, 2003). Diese binden dafür bevorzugt an eine G/C-Box im *GH3* Promotor. Ähnliches konnte auch für Reis gezeigt werden, wo OBF1 Homodimere an die G/C Box aus dem Histon H3 Promotor binden, OBF1/LIP19 Heterodimere aber an ein fast identisches, "C/G hybrid" genanntes Element (siehe Tabelle 6.2; Shimizu *et al.*, 2005). In Protoplasten-Assays konnte zwar gezeigt werden, dass alle AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 die *ProDH* aktivieren können, jedoch scheint dies nicht auf alle Zielgen-Promotoren zuzutreffen. So konnte zum Beispiel für den Cruciferin-Promotor in Protoplasten-Assays gezeigt werden, dass er nicht durch *AtbZIP1* aktiviert wird (Andrea Ehlert, persönliche Mitteilung). Das gleiche scheint auch für viele andere Zielgene zu gelten, da die Überexpression von *AtbZIP1* und *AtbZIP53* in den Transkriptomanalysen nur zu einem Teil zur Aktivierung von gemeinsamen Zielgenen führte.

Um den Einfluss der Heterodimerisierung zwischen AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 auf die Bindung an unterschiedliche *cis*-Elemente zu analysieren, sollten umfangreiche Bindestudien durchgeführt werden. Hierfür wäre eine Methode sinnvoll, die einen höheren Durchsatz als Gelretardationsanalysen erlaubt. Eine solche Methode wäre z.B. ein ELISA-basiertes System für DNA-Bindestudien (Benotmane *et al.*, 1997; McKay *et al.*, 1998; Mönke *et al.*, 2004).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zu der Expression der verschiedenen AtbZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 auf Transkriptionsebene haben gezeigt, dass es neben klaren Übereinstimmungen auch deutliche Unterschiede zwischen den Expressionsmustern der einzelnen Faktoren gibt. Dabei ist die posttranslationale Regulation der C/S1 AtbZIP-Transkriptionsfaktoren bisher wenig untersucht worden. Gerade bei den Gruppe C Faktoren finden sich viele putative Phosphorylierungsstellen, die an einer solche Regulation beteiligt sein könnten. Der Gruppe C Faktor AtbZIP10 zeigte in der Vielzahl von in Mikroarray Datenbanken verfügbaren Experimenten kaum eine Regulation auf Transkriptionsebene, jedoch gibt es deutliche Hinweise für eine Regulation durch gesteuerten Kernimport und Export (Klaus Harter, persönliche Mitteilung). Ein weiterer posttranslatinaler Regulationsmechanismus könnte eine Heterodimer-spezifische Ubiquitylierung und ein darauf folgender Abbau sein, wie sie in menschlichen Zellkulturen für ATF2 gezeigt wurde (Fuchs und Ronai, 1999).

Die räumliche und zeitliche Verteilung der AtbZIP-Proteine der Gruppen S1 und C ist eine wichtige Regulationsmöglichkeit für die Dimerbildung und damit letztlich für die Regulation der Zielgenexpression. Auch wenn sie in dieser Arbeit schon detailliert untersucht wurde, bietet die Fülle an verfügbaren Transkriptom-Daten die Möglichkeit für eine weit tiefer gehende Analyse. Da bereits jetzt die große Komplexität der Regulation der AtbZIP-Transkriptionsfaktoren des Heterodimerisierungsnetzwerkes abzusehen ist, wird hier möglicherweise eine Arbeit mit Computermodellen hilfreich sein.

## 7 Literatur

- Abraham, E., Rigo, G., Szekely, G., Nagy, R., Koncz, C. and Szabados, L. (2003): Light-dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, **51**, 363-72.
- Acharya, A., Ruvinov, S.B., Gal, J., Moll, J.R. and Vinson, C. (2002): A heterodimerizing leucine zipper coiled coil system for examining the specificity of a position interactions: amino acids I, V, L, N, A, and K. *Biochemistry*, **41**, 14122-31.
- Aguan, K., Sugawara, K., Suzuki, N. and Kusano, T. (1993): Low-temperature-dependent expression of a rice gene encoding a protein with a leucine-zipper motif. *Mol Gen Genet*, **240**, 1-8.
- Alber, T. (1992): Structure of the leucine zipper. *Curr Opin Genet Dev*, **2**, 205-10.
- 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., Gadrinab, 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. and Ecker, J.R. (2003): Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, **301**, 653-7.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, **25**, 3389-402.
- Arabidopsis*\_Genome\_Initiative. (2000): Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, **408**, 796-815.
- Arenas-Huertero, F., Arroyo, A., Zhou, L., Sheen, J. and Leon, P. (2000): Analysis of *Arabidopsis* glucose insensitive mutants, *gin5* and *gin6*, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Genes Dev*, **14**, 2085–2096.
- Armstrong, G.A., Weisshaar, B. and Hahlbrock, K. (1992): Homodimeric and heterodimeric leucine zipper proteins and nuclear factors from parsley recognize diverse promoter elements with ACGT cores. *Plant Cell*, **4**, 525-37.
- Avonce, N., Leyman, B., Thevelein, J. and Iturriaga, G. (2005): Trehalose metabolism and glucose sensing in plants. *Biochem Soc Trans*, **33**, 276-9.
- Baxevanis, A.D. and Vinson, C.R. (1993): Interactions of coiled coils in transcription factors: where is the specificity? *Curr Opin Genet Dev*, **3**, 278-85.



- Benotmane, A.M., Hoylaerts, M.F., Collen, D. and Belayew, A. (1997): Nonisotopic quantitative analysis of protein-DNA interactions at equilibrium. *Anal Biochem*, **250**, 181-185.
- Bent, A.F. (2000): *Arabidopsis* in planta transformation. Uses, mechanisms, and prospects for transformation of other species. *Plant Physiol*, **124**, 1540-7.
- Berberich, T., Sano, H. and Kusano, T. (1999): Involvement of a MAP kinase, ZmMPK5, in senescence and recovery from low-temperature-stress in maize. *Mol Gen Genet*, **262**, 534-542.
- Bernard, P., Kezdy, K.E., Van Melderren, L., Steyaert, J., Wyns, L., Pato, M.L., Higgins, P.N. and Couturier, M. (1993): The F plasmid CcdB protein induces efficient ATP-dependent DNA cleavage by gyrase. *J Mol Biol*, **234**, 534-41.
- Bianchi, G., Gamba, A., Limiroli, R., Pozzi, N., Elster, R., Salamini, F. and Bartels, D. (1993): *Physiol. Plant.*, **87**, 223-226.
- Blais, A. and Dynlacht, B.D. (2005): Devising transcriptional regulatory networks operating during the cell cycle and differentiation using ChIP-on-chip. *Chromosome Res*, **13**, 275-88.
- Blum, A. and Ebercon, A. (1976): Genotypic responses in sorghum to drought stress. III. Free proline accumulation and drought resistance. *Crop Sci*, **16**, 428-431.
- Bolton, E.T. and McCarthy, B.J. (1962): A general method for isolation of RNA complementary to DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **48**, 1390-1397.
- Borisjuk, L., Rolletschek, H., Radchuk, R., Weschke, W., Wobus, U. and Weber, H. (2004): Seed development and differentiation: a role for metabolic regulation. *Plant Biol (Stuttg)*, **6**, 375-86.
- Bray, E.A. (1993): Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol*, **103**, 1035-1040.
- Brent, R. and Ptashne, M. (1985): A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell*, **43**, 729-36.
- Brivanlou, A.H. and Darnell, J.E., Jr. (2002): Signal transduction and the control of gene expression. *Science*, **295**, 813-8.
- Brouquisse, R.M., Gaudillere, J.-P. and Raymond, P. (1998): Induction of carbon-starvation-related proteolysis in whole maize plants submitted to light dark cycles and to extended darkness. *Plant Physiol*, **117**, 1281-1291.
- Buchanan-Wollaston, V. and Ainsworth, C. (1997): Leaf senescence in *Brassica napus*: cloning of senescence related genes by subtractive hybridisation. *Plant Mol Biol*, **33**, 821-34.
- Buchanan-Wollaston, V., Page, T., Harrison, E., Breeze, E., Lim, P.O., Nam, H.G., Lin, J.F., Wu, S.H., Swidzinski, J., Ishizaki, K. and Leaver, C.J. (2005): Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant J*, **42**, 567-85.

- Busk, P.K. and Pages, M. (1998): Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Mol Biol*, **37**, 425-35.
- Chen, W., Provart, N.J., Glazebrook, J., Katagiri, F., Chang, H.S., Eulgem, T., Mauch, F., Luan, S., Zou, G., Whitham, S.A., Budworth, P.R., Tao, Y., Xie, Z., Chen, X., Lam, S., Kreps, J.A., Harper, J.F., Si-Ammour, A., Mauch-Mani, B., Heinlein, M., Kobayashi, K., Hohn, T., Dangl, J.L., Wang, X. and Zhu, T. (2002): Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell*, **14**, 559-74.
- Chiang, H.-H. and Dandekar, A.M. (1995): Regulation of proline accumulation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh during development and in response to desiccation. *Plant Cell Environ*, **18**, 1280–1290.
- Chiou, T.J. and Bush, D.R. (1998): Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 4784-4788.
- Choi, H., Hong, J., Ha, J., Kang, J. and Kim, S.Y. (2000): ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J Biol Chem*, **275**, 1723-30.
- Chomczynski, P. (1993): A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*, **15**, 532-4, 536-7.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**, 156-9.
- Church, G.M. and Gilbert, W. (1984): Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 1991-5.
- Clark, J.M. (1988): Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res*, **16**, 9677-86.
- Clontech. (1996): Yeast Protocols Handbook.
- Clough, S.J. and Bent, A.F. (1998): Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, **16**, 735-43.
- Cohen, D.R. and Curran, T. (1990): Analysis of dimerization and DNA binding functions in Fos and Jun by domain-swapping: involvement of residues outside the leucine zipper/basic region. *Oncogene*, **5**, 929-39.
- Cohen, S.N., Chang, A.C., Boyer, H.W. and Helling, R.B. (1973): Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Biotechnology*, **24**, 188-92.
- Contento, A.L., Kim, S.-J. and Bassham, D.C. (2004): Transcriptome profiling of the response of *Arabidopsis* suspension culture cells to suc starvation. *Plant Physiol*, **135**, 1-18.

- Cortes, S., Gromova, M., Evrard, A., Roby, C., Heyraud, A., Rolin, D.B., Raymond, P. and Brouquisse, R.M. (2003): In plants, 3-o-methylglucose is phosphorylated by hexokinase but not perceived as a sugar. *Plant Physiol*, **131**, 824-37.
- Coruzzi, G. and Bush, D.R. (2001): Nitrogen and carbon nutrient and metabolite signaling in plants. *Plant Physiol*, **125**, 61-64.
- Craigon, D.J., James, N., Okyere, J., Higgins, J., Jotham, J. and May, S. (2004): NASCArrays: a repository for microarray data generated by NASC's transcriptomics service. *Nucleic Acids Res*, **32**, D575-7.
- Crowe, J.H., Hoekstra, F.A. and Crowe, L.M. (1992): Anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol*, **54**, 579-99.
- de Pater, S., Katagiri, F., Kijne, J. and Chua, N.H. (1994): bZIP proteins bind to a palindromic sequence without an ACGT core located in a seed-specific element of the pea lectin promoter. *Plant J*, **6**, 133-40.
- Delauney, A.J. and Verma, D.P. (1993): Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J*, **4**, 215-223.
- Deppmann, C.D., Acharya, A., Rishi, V., Wobbes, B., Smeekens, S., Taparowsky, E.J. and Vinson, C. (2004): Dimerization specificity of all 67 B-ZIP motifs in *Arabidopsis thaliana*: a comparison to Homo sapiens B-ZIP motifs. *Nucleic Acids Res*, **32**, 3435-45.
- Deuschle, K., Funck, D., Forlani, G., Stransky, H., Biehl, A., Leister, D., Graaff, E.v.d., Kunze, R. and Frommer, W.B. (2004): The Role of D1-Pyrroline-5-Carboxylate Dehydrogenase in Proline Degradation. *Plant Cell*, **16**, 3413-3425.
- Deuschle, K., Funck, D., Hellmann, H., Daschner, K., Binder, S. and Frommer, W.B. (2001): A nuclear gene encoding mitochondrial Delta-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase and its potential role in protection from proline toxicity. *Plant J*, **27**, 345-56.
- Diebold, R., Schuster, J., Daschner, K. and Binder, S. (2002): The branched-chain amino acid transaminase gene family in *Arabidopsis* encodes plastid and mitochondrial proteins. *Plant Physiol*, **129**, 540-50.
- Ditzer, A. (2003): Untersuchungen zur Aktivität eines Trockenstress- und Abscisinsäure-induzierbaren Promotors aus der Wiederauferstehungspflanze *Craterostigma plantagineum* und Isolierung von DNA-Bindeproteinen. *Dissertation*.
- Droge-Laser, W., Kaiser, A., Lindsay, W.P., Halkier, B.A., Loake, G.J., Doerner, P., Dixon, R.A. and Lamb, C. (1997): Rapid stimulation of a soybean protein-serine kinase that phosphorylates a novel bZIP DNA-binding protein, G/HBF-1, during the induction of early transcription-dependent defenses. *Embo J*, **16**, 726-38.
- Eastmond, P.J. and Graham, I.A. (2003): Trehalose metabolism: a regulatory role for trehalose-6-phosphate? *Curr Opin Plant Biol*, **6**, 231-5.

- Eastmond, P.J., Li, Y. and Graham, I.A. (2003): Is trehalose-6-phosphate a regulator of sugar metabolism in plants? *J Exp Bot*, **54**, 533-7.
- Ehlert, A. (2004): Analyse der Dimerisierungs- und Aktivierungseigenschaften von Gruppe C und S bZIP- Transkriptionsfaktoren aus *Arabidopsis thaliana*. *Diplomarbeit*.
- Ellenberger, T.E., Brandl, C.J., Struhl, K. and Harrison, S.C. (1992): The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted alpha helices: crystal structure of the protein-DNA complex. *Cell*, **71**, 1223-37.
- Ellerstrom, M., Stalberg, K., Ezcurra, I. and Rask, L. (1996): Functional dissection of a napin gene promoter: identification of promoter elements required for embryo and endosperm-specific transcription. *Plant Mol Biol*, **32**, 1019-27.
- Ellis, C., Turner, J.G. and Devoto, A. (2002): Protein complexes mediate signalling in plant responses to hormones, light, sucrose and pathogens. *Plant Mol Biol*, **50**, 971-980.
- Ezcurra, I., Ellerstrom, M., Wycliffe, P., Stalberg, K. and Rask, L. (1999): Interaction between composite elements in the napA promoter: both the B-box ABA-responsive complex and the RY/G complex are necessary for seed-specific expression. *Plant Mol Biol*, **40**, 699-709.
- Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1983): A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem*, **132**, 6-13.
- Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1984): "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum. *Anal Biochem*, **137**, 266-7.
- Feldman, A.L., Costouros, N.G., Wang, E., Qian, M., Marincola, F.M., Alexander, H.R. and Libutti, S.K. (2002): Advantages of mRNA amplification for microarray analysis. *Biotechniques*, **33**, 906-12, 914.
- Fields, S. and Song, O. (1989): A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, **340**, 245-6.
- Finkelstein, R.R., Wang, M.L., Lynch, T.J., Rao, S. and Goodman, H.M. (1998): The *Arabidopsis* abscisic acid response locus *ABI4* encodes an APETALA 2 domain protein. *Plant Cell*, **10**, 1043-1054.
- Fong, J.H., Keating, A.E. and Singh, M. (2004): Predicting specificity in bZIP coiled-coil protein interactions. *Genome Biology*, **5**, R11.
- Foster, R., Izawa, T. and Chua, N.H. (1994): Plant bZIP proteins gather at ACGT elements. *Faseb J*, **8**, 192-200.
- Fuchs, S.Y. and Ronai, Z. (1999): Ubiquitination and degradation of ATF2 are dimerization dependent. *Mol Cell Biol*, **19**, 3289-98.

- Fujiki, Y., Ito, M., Itoh, T., Nishida, I. and Watanabe, A. (2002): Activation of the promoters of *Arabidopsis* genes for the branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex in transgenic tobacco BY-2 cells under sugar starvation. *Plant Cell Physiol*, **43**, 275-80.
- Fujiki, Y., Ito, M., Nishida, I. and Watanabe, A. (2000): Multiple Signaling Pathways in Gene Expression during Sugar Starvation. Pharmacological Analysis of din Gene Expression in Suspension-Cultured Cells of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **124**, 1139–1147.
- Fujiki, Y., Ito, M., Nishida, I. and Watanabe, A. (2001a): Leucine and its keto acid enhance the coordinated expression of genes for branched-chain amino acid catabolism in *Arabidopsis* under sugar starvation. *FEBS Lett*, **499**, 161-5.
- Fujiki, Y., Yoshikawa, Y., Sato, T., Inada, N., Ito, M., Nishida, I. and Watanabe, A. (2001b): Dark-inducible genes from *Arabidopsis thaliana* are associated with leaf senescence and repressed by sugars. *Physiol Plant*, **111**, 345-352.
- Fujita, Y., Fujita, M., Satoh, R., Maruyama, K., Parvez, M.M., Seki, M., Hiratsu, K., Ohme-Takagi, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2005): AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signalling that enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, online publication.
- Fujiwaraa, T., Nambarab, E., Yamagishib, K., Gotoc, D.B. and Naitoc, S. (2002): Storage Proteins. *The Arabidopsis Book*.
- Fukazawa, J., Sakai, T., Ishida, S., Yamaguchi, I., Kamiya, Y. and Takahashi, Y. (2000): Repression of shoot growth, a bZIP transcriptional activator, regulates cell elongation by controlling the level of gibberellins. *Plant Cell*, **12**, 901-15.
- Fulton, T.M., Chunwongse, J. and Tanksley, S.D. (1995): Microprep protocol for Extraction of DNA from Tomato and other Herbaceous Plants. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **134**, 207-209.
- Geballe, A.P. and Morris, D.R. (1994): Initiation codons within 5'-leaders of mRNAs as regulators of translation. *Trends Biochem Sci*, **19**, 159-64.
- Gibon, Y., Blaesing, O.E., Hannemann, J., Carillo, P., Hoehne, M., Hendriks, J.H.M., Palacios, N., Cross, J., Selbig, J. and Stitt, M. (2004): A Robot-Based Platform to Measure Multiple Enzyme Activities in *Arabidopsis* Using a Set of Cycling Assays: Comparison of Changes of Enzyme Activities and Transcript Levels during Diurnal Cycles and in Prolonged Darkness. *Plant Cell*, **16**, 3304–3325.
- Giniger, E., Varnum, S.M. and Ptashne, M. (1985): Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell*, **40**, 767-74.
- Goetz, M., Godt, D.E., Guivarc'h, A., Kahmann, U., Chriqui, D. and Roitsch, T. (2001): Induction of male sterility in plants by metabolic engineering of the carbohydrate supply. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 6522-7.
- Goldberg, R.B., Beals, T.P. and Sanders, P.M. (1993): Anther development: basic principles and practical applications. *Plant Cell*, **5**, 1217-29.

- Gubler, F., Millar, A.A. and Jacobsen, J.V. (2005): Dormancy release, ABA and pre-harvest sprouting. *Curr Opin Plant Biol*, **8**, 183-7.
- Guerche, P., Tire, C., De Sa, F.G., De Clercq, A., Van Montagu, M. and Krebbers, E. (1990): Differential Expression of the *Arabidopsis* 2S Albumin Genes and the Effect of Increasing Gene Family Size. *Plant Cell*, **2**, 469-478.
- Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-80.
- Handa, S., Handa, A.K., Hasegawa, P.M. and Bressan, R.A. (1986): Proline accumulation and the adaptation of cultured plant cells to salinity stress. *Plant Physiol*, **80**, 938-945.
- Hare, P.D. and Cress, W.A. (1997): Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation*, **21**, 79-102.
- Hare, P.D., Cress, W.A. and J., v.S. (1998): Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell and Environment*, **21**, 335-353.
- Haslekas, C., Grini, P.E., Nordgard, S.H., Thorstensen, T., Viken, M.K., V., N. and Aalen, R.B. (2003): ABI3 mediates expression of the peroxiredoxin antioxidant *AtPER1* gene and induction by oxidative stress. *Plant Mol Biol*, **53**, 313-326.
- Hecht, A., Strahl-Bolsinger, S. and Grunstein, M. (1996): Spreading of transcriptional repressor SIR3 from telomeric heterochromatin. *Nature*, **383**, 92-6.
- Heinekamp, T., Kuhlmann, M., Lenk, A., Strathmann, A. and Droge-Laser, W. (2002): The tobacco bZIP transcription factor BZI-1 binds to G-box elements in the promoters of phenylpropanoid pathway genes in vitro, but it is not involved in their regulation in vivo. *Mol Genet Genomics*, **267**, 16-26.
- Hellmann, H., Funck, D., Rentsch, D. and Frommer, W.B. (2000): Hypersensitivity of an *Arabidopsis* sugar signaling mutant toward exogenous proline application. *Plant Physiol*, **123**, 779-89.
- Hempel, M. (1993): From Micropropagation to "Microponics". *Practical Hydroponics International*, 21-23.
- Herrera-Estrella, L., Depicker, A., Van Montagu, M. and Schell, J. (1992): Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. 1983. *Biotechnology*, **24**, 377-81.
- Heslop-Harrison, J. (1978): Recognition and response in the pollen-stigma interaction. *Symp Soc Exp Biol*, **32**, 121-38.
- Hill, J., Donald, K.A. and Griffiths, D.E. (1991): DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. *Nucleic Acids Res*, **19**, 5791.
- Hirst, M., Ho, C., Sabourin, L., Rudnicki, M., Penn, L. and Sadowski, I. (2001): A two-hybrid system for transactivator bait proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 8726-8731.

- Ho, S.-L., Chao, Y.-C., Tong, W.-F. and Yu, S.-M. (2001): Sugar coordinately and differentially regulates growth- and stress-related gene expression via a complex signal transduction network and multiple control mechanisms. *Plant Physiol*, **125**, 877–890.
- Huijser, C., Kortstee, A., Pego, J., Weisbeek, P., Wisman, E. and Smeekeens, S. (2000): The *Arabidopsis* *SUCROSE UNCOUPLED-6* gene is identical to *ABSCISIC ACID INSENSITIVE-4*: Involvement of abscisic acid in sugar responses. *Plant J*, **23**, 577–585.
- Hurst, H.C. (1995): Transcription factors 1: bZIP proteins. *Protein Profile*, **2**, 101–168.
- Imlau, A., Truernit, E. and Sauer, N. (1999): Cell-to-cell and long-distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplastic unloading of the protein into sink tissues. *Plant Cell*, **11**, 309–22.
- Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. (1990): High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, **96**, 23–28.
- INVITROGEN. (2001): Proquest Two-Hybrid System. *Instruction Manual*.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A. (1983): Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol*, **153**, 163–8.
- Ito, K., Kusano, T. and Tsutsumi, K.-i. (1999): A cold-inducible bZIP protein gene in radish root regulated by calcium- and cycloheximide-mediated signals. *Plant Science*, **142**, 57–65.
- Izawa, T., Foster, R. and Chua, N.H. (1993): Plant bZIP protein DNA binding specificity. *J Mol Biol*, **230**, 1131–44.
- Jakoby, M., Weisshaar, B., Droge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T. and Parcy, F. (2002): bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci*, **7**, 106–11.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W. (1987): GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *Embo J*, **6**, 3901–7.
- Johnson, C., Boden, E., Desai, M., Pascuzzi, P. and Arias, J. (2001): In vivo target promoter-binding activities of a xenobiotic stress-activated TGA factor. *Plant J*, **28**, 237–43.
- Kankainen, M. and Holm, L. (2004): POBO, transcription factor binding site verification with bootstrapping. *Nucleic Acids Res*, **32**, W222–9.
- Kavi Kishor, P.B.K., Hong, Z., Miao, G.-H., Hu, C.-A. and Verma, D.P. (1995): Overexpression of delta1-pyrroline-5-carboxylat synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol*, **108**, 1387–1394.
- Kenyon, C. (2001): A conserved regulatory system for aging. *Cell*, **105**, 165–168.

- Kircher, S., Wellmer, F., Nick, P., Rugner, A., Schafer, E. and Harter, K. (1999): Nuclear import of the parsley bZIP transcription factor CPRF2 is regulated by phytochrome photoreceptors. *J Cell Biol*, **144**, 201-11.
- Kiyosue, T., Yoshiba, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1996): A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **8**, 1323-35.
- Koncz, C. and Schell, J. (1986): The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue specific expression chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Gen Genet*, **204**, 383-396.
- Kroj, T., Savino, G., Valon, C., Giraudat, J. and Parcy, F. (2003): Regulation of storage protein gene expression in *Arabidopsis*. *Development*, **130**, 6065-73.
- Kuhlmann, M., Horvay, K., Strathmann, A., Heinekamp, T., Fischer, U., Bottner, S. and Droge-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.
- Kusano, T., Berberich, T., Harada, M., Suzuki, N. and Sugawara, K. (1995): A maize DNA-binding factor with a bZIP motif is induced by low temperature. *Mol Gen Genet*, **248**, 507-17.
- Kusano, T., Sugawara, K., Harada, M. and Berberich, T. (1998): Molecular cloning and partial characterization of a tobacco cDNA encoding a small bZIP protein. *Biochim Biophys Acta*, **1395**, 171-5.
- Kyhse-Anderson, J. (1984): Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.*, **10**.
- Laby, R.J., Kincaid, M.S., Kim, D. and Gibson, S.I. (2000): The *Arabidopsis* sugar-insensitive mutants *sis4* and *sis5* are defective in abscisic acid synthesis and response. *Plant J*, **23**, 587-596.
- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-5.
- Lam, H.M., Wong, P., Chan, H.K., Yam, K.M., Chen, L., Chow, C.M. and Coruzzi, G.M. (2003): Overexpression of the *ASN1* gene enhances nitrogen status in seeds of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **132**, 926-35.
- Lamb, P. and McKnight, S.L. (1991): Diversity and specificity in transcriptional regulation: the benefits of heterotypic dimerization. *Trends Biochem Sci*, **16**, 417-22.
- Landschulz, W.H., Johnson, P.F. and McKnight, S.L. (1988): The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science*, **240**, 1759-64.



- Lara, P., Onate-Sanchez, L., Abraham, Z., Ferrandiz, C., Diaz, I., Carbonero, P. and 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.
- Le\_Gouill, C., Parent, J.-L., Rola-Pleszczynski, M. and Stankova, J. (1994): Analysis of recombinant plasmids by a modified alkaline lysis method. *Anal biochem*, **219**, 164.
- Lee, S.J., Lee, M.Y., Yi, S.Y., Oh, S.K., Choi, S.H., Her, N.H., Choi, D., Min, B.W., Yang, S.G. and Harn, C.H. (2002): PPI1: a novel pathogen-induced basic region-leucine zipper (bZIP): transcription factor from pepper. *Mol Plant Microbe Interact*, **15**, 540-8.
- Leon, P. and Sheen, J. (2003): Sugar and hormone connections. *Trends Plant Sci*, **8**.
- Leyman, B., Van Dijck, P. and Thevelein, J.M. (2001): An unexpected plethora of trehalose biosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana*. *Trends Plant Sci*, **6**, 510-3.
- Lin, J.F. and Wu, S.H. (2004): Molecular events in senescing *Arabidopsis* leaves. *Plant J*, **39**, 612-28.
- Liu, F., Vantoai, T., Moy, L.P., Bock, G., Linford, L.D. and Quackenbush, J. (2005): Global transcription profiling reveals comprehensive insights into hypoxic response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **137**, 1115-29.
- Liu, X., Brutlag, D.L. and Liu, J.S. (2001): BioProspector: discovering conserved DNA motifs in upstream regulatory regions of co-expressed genes. *Pac Symp Biocomput.*, 127-138.
- Lopez-Molina, L., Mongrand, S., McLachlin, D.T., Chait, B.T. and Chua, N.H. (2002): ABI5 acts downstream of ABI3 to execute an ABA-dependent growth arrest during germination. *Plant J*, **32**, 317-28.
- Lupas, A. (1996): Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem Sci*, **21**, 375-82.
- Luscombe, N.M., Austin, S.E., Berman, H.M. and Thornton, J.M. (2000): An overview of the structures of protein-DNA complexes. *Genome Biol*, **1**, 1-37.
- Ma, J. and Ptashne, M. (1987): Deletion analysis of GAL4 defines two transcriptional activating segments. *Cell*, **48**, 847-53.
- Madden, T.L., Tatusov, R.L. and Zhang, J. (1996): Applications of network BLAST server. *Methods Enzymol*, **266**, 131-41.
- Mansfield, S.G. and Briarty, L.G. (1992): Cotyledon cell development in *Arabidopsis thaliana* during reserve deposition. *Can. J. Bot.*, **70**, 151-164.
- Martin, T., Hellmann, H., Schmidt, R., Willmitzer, L. and Frommer, W.B. (1997): Identification of mutants in metabolically regulated gene expression. *Plant J*, **11**, 53-62.

- Martinez-Garcia, J.F., Moyano, E., Alcocer, M.J. and Martin, C. (1998): Two bZIP proteins from *Antirrhinum* flowers preferentially bind a hybrid C-box/G-box motif and help to define a new sub-family of bZIP transcription factors. *Plant J*, **13**, 489-505.
- Matsushima-Hibiya, Y., Nishi, S. and Sakai, M. (1998): Rat maf-related factors: the specificities of DNA binding and heterodimer formation. *Biochem Biophys Res Commun*, **245**, 412-8.
- McCarty, D.R. (1995): Genetic control and integration of maturation and germination pathways in seed development. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **46**, 71-93.
- McDonell, M.W., Simon, M.N. and Studier, F.W. (1977): Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J Mol Biol*, **110**, 119-46.
- McKay, I.A., Kirby, L., Volyanik, E.V., Kumar, V., Wong, P.W. and Bustin, S.A. (1998): An enzyme-linked immunosorbant assay for the detection of agents which interfere with the DNA binding activities of transcription factors - exemplified by NF-IL6. *Anal Biochem*, **265**, 28-34.
- McLachlan, A. and Steward, M. (1975): Tropomyosin coiled-coil interactions: evidence for an unstaggered structure. *J. Mol. Biol.*, **98**, 293-304.
- Menkens, A.E., Schindler, U. and Cashmore, A.R. (1995): The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins. *Trends Biochem Sci*, **20**, 506-10.
- Metallo, S.J. and Schepartz, A. (1997): Certain bZIP peptides bind DNA sequentially as monomers and dimerize on the DNA. *Nat Struct Biol*, **4**, 115-7.
- Miller, J.D., Arteca, R.N. and Pell, E.J. (1999): Senescence-associated gene expression during ozone-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **120**, 1015-24.
- Mönke, G., Altschmied, L., Tewes, A., Reidt, W., Mock, H.-P., Bäumlein, H. and Conrad, U. (2004): Seed-specific transcription factors ABI3 and FUS3: molecular interaction with DNA. *Planta*, **219**, 158-166.
- Moore, B., Zhou, L., Rolland, F., Hall, Q., Cheng, W.H., Liu, Y.X., Hwang, I., Jones, T. and Sheen, J. (2003): Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science*, **300**, 332-6.
- Mueller, J., Boller, T. and Wiemken, A. (1995): Trehalose and trehalase in plants: recent developments. *Plant Science*, **112**, 1-9.
- Mullis, K.B. and Faloona, F.A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, **155**, 335-50.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, **15**, 473-497.

- Nakashima, K., Satoh, R., Kiyosue, T., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1998): A gene encoding proline dehydrogenase is not only induced by proline and hypoosmolarity, but is also developmentally regulated in the reproductive organs of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **118**, 1233-41.
- Nanjo, T., Kobayashi, M., Yoshiba, Y., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1999): Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett*, **461**, 205-10.
- Niu, X. and Guiltinan, M.J. (1994): DNA binding specificity of the wheat bZIP protein EmBP-1. *Nucleic Acids Res*, **22**, 4969-78.
- O'Shea, E.K., Rutkowski, R. and Kim, P.S. (1989): Evidence that the leucine zipper is a coiled coil. *Science*, **243**, 538-42.
- Oyama, T., Shimura, Y. and Okada, K. (1997): The *Arabidopsis* *HY5* gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. *Genes Dev*, **11**, 2983-95.
- Pang, P.P., Pruitt, R.E. and Meyerowitz, E.M. (1988): Molecular cloning, genomic organization, expression and evolution of 12S seed storage protein genes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.*, **11**, 805-820.
- Pardha Saradhi P, Alia, Arora, S. and Prasad, K.V.S.K. (1995): Proline accumulates in plants exposed to UV radiation and protects them against UV induced peroxidation. *Biochem Biophys Res Commun*, **209**, 1-5.
- Paul, M.J. and Pellny, T.K. (2003): Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. *J Exp Bot*, **54**, 539-547.
- Peng, Z., Lu, Q. and Verma, D.P. (1996): Reciprocal regulation of delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes controls proline levels during and after osmotic stress in plants. *Mol Gen Genet*, **253**, 334-41.
- Polacek, D.C., Passerini, A.G., Shi, C., Francesco, N.M., Manduchi, E., Grant, G.R., Powell, S., Bischof, H., Winkler, H., Stoeckert, C.J., Jr. and Davies, P.F. (2003): Fidelity and enhanced sensitivity of differential transcription profiles following linear amplification of nanogram amounts of endothelial mRNA. *Physiol Genomics*, **13**, 147-56.
- Pourtau, N., Mares, M., Purdy, S., Quentin, N., Ruel, A. and Wingler, A. (2004): Interactions of abscisic acid and sugar signalling in the regulation of leaf senescence. *Planta*, **219**, 765-72.
- Price, J., Laxmi, A., St Martin, S.K. and Jang, J.C. (2004): Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **16**, 2128-50.
- Ptashne, M. and Gann, A. (1997): Transcriptional activation by recruitment. *Nature*, **386**, 569-77.

- Pysh, L.D., Aukerman, M.J. and Schmidt, R.J. (1993): OHP1: a maize basic domain/leucine zipper protein that interacts with opaque2. *Plant Cell*, **5**, 227-36.
- Quirino, B.F., Noh, Y.S., Himelblau, E. and Amasino, R.M. (2000): Molecular aspects of leaf senescence. *Trends Plant Sci*, **5**, 278–282.
- Reinbothe, S., Mollenhauer, B. and Reinbothe, C. (1994): JIPs and RIPs: The regulation of plant gene expression by jasmonates in response to environmental cues and pathogens. *Plant Cell*, **6**, 1197–1209.
- 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. and Yu, G. (2000): *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, **290**, 2105-10.
- Roberts, R.J. (1985): Restriction and modification enzymes and their recognition sequences. *Nucleic Acids Res*, **13 Suppl**, r165-200.
- Robinson, C.K. and Hill, S.A. (1999): Altered resource allocation during seed development in *Arabidopsis* caused by the *abi3* mutation. *Plant Cell Environ*, **22**, 117-123.
- Roessner, U., Wagner, C., Kopka, J., Trethewey, R.N. and Willmitzer, L. (2000): Technical advance: simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. *Plant J*, **23**, 131-142.
- Rolland, F., Moore, B. and Sheen, J. (2002): Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell*, **14 Suppl**, 185-205.
- Rook, F., Corke, F., Card, R., Munz, G., Smith, C. and Bevan, M.W. (2001): Impaired sucrose-induction mutants reveal the modulation of sugar-induced starch biosynthetic gene expression by abscisic acid signalling. *Plant J*, **26**, 421–433.
- Rook, F., Gerrits, N., Kortstee, A., van Kampen, M., Borrias, M., Weisbeek, P. and Smeekens, S. (1998a): Sucrose-specific signalling represses translation of the *Arabidopsis* *ATB2* bZIP transcription factor gene. *Plant J*, **15**, 253-63.
- Rook, F., Weisbeek, P. and Smeekens, S. (1998b): The light-regulated *Arabidopsis* bZIP transcription factor gene *ATB2* encodes a protein with an unusually long leucine zipper domain. *Plant Mol Biol*, **37**, 171-8.
- Rugner, A., Frohnmeyer, H., Nake, C., Wellmer, F., Kircher, S., Schafer, E. and Harter, K. (2001): Isolation and characterization of four novel parsley proteins that interact with the transcriptional regulators CPRF1 and CPRF2. *Mol Genet Genomics*, **265**, 964-76.
- Sadka, A., DeWald, D.B., May, G.D., Park, W.D. and Mullet, J.E. (1994): Phosphate modulates transcription of soybean *VspB* and other sugar-inducible genes. *Plant Cell*, **6**, 737–749.
- Sambrook, Fritsch and Maniatis. (1989): Molecular cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-7.
- Satoh, R., Fujita, Y., Nakashima, K., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004): A novel subgroup of bZIP proteins functions as transcriptional activators in hypoosmolarity-responsive expression of the *ProDH* gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*, **45**, 309-17.
- Satoh, R., Nakashima, K., Seki, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2002): ACTCAT, a novel cis-acting element for proline- and hypoosmolarity-responsive expression of the *ProDH* gene encoding proline dehydrogenase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **130**, 709-19.
- Schindler, U., Terzaghi, W., Beckmann, H., Kadesch, T. and Cashmore, A.R. (1992): DNA binding site preferences and transcriptional activation properties of the *Arabidopsis* transcription factor GBF1. *Embo J*, **11**, 1275-89.
- Schluepmann, H., Pellny, T., van Dijken, A., Smeekens, S. and Paul, M. (2003): Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 6849-54.
- Schluepmann, H., van Dijken, A., Aghdasi, M., Wobbes, B., Paul, M. and Smeekens, S. (2004): Trehalose mediated growth inhibition of *Arabidopsis* seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation. *Plant Physiol*, **135**, 879-90.
- Schmid, M., Davison, T.S., Henz, S.R., Pape, U.J., Demar, M., Vingron, M., Scholkopf, B., Weigel, D. and Lohmann, J.U. (2005): A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat Genet*, **37**, 501-6.
- Schmidt, R.J., Ketudat, M., Aukerman, M.J. and Hoschek, G. (1992): Opaque-2 is a transcriptional activator that recognizes a specific target site in 22-kD zein genes. *Plant Cell*, **4**, 689-700.
- Schobert, B. and Tschesche, H. (1978): Unusual solution properties of proline and its interaction with proteins. *Biochim Biophys Acta*, **541**, 270-7.
- Schuster, J. and Binder, S. (2005): The mitochondrial branched-chain aminotransferase (AtBCAT-1) is capable to initiate degradation of leucine, isoleucine and valine in almost all tissues in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, **57**, 241-54.
- Shen, Q., Gomez-Cadenas, A., Zhang, P., Walker-Simmons, M.K., Sheen, J. and Ho, T.H. (2001): Dissection of abscisic acid signal transduction pathways in barley aleurone layers. *Plant Mol Biol*, **47**, 437-48.
- Shen, Q. and Ho, T.-H.D. (1995): Functional dissection of an abscisic acid (ABA-inducible gene reveals two independent ABA-responsive complexes each containing a G-box and a novel cis-acting element. *Plant Cell*, **7**, 295-307.
- Shen, Q.J., Casaretto, J.A., Zhang, P. and Ho, T.H. (2004): Functional definition of ABA-response complexes: the promoter units necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Mol Biol*, **54**, 111-24.

- Shimizu, H., Sato, K., Berberich, T., Miyazaki, A., Ozaki, R., Imai, R. and Kusano, T. (2005): LIP19, a Basic Region Leucine Zipper Protein, is a Fos-like Molecular Switch in the Cold Signaling of Rice Plants. *Plant Cell Physiol*, **46**, 1623-34.
- Siberil, Y., Doireau, P. and Gantet, P. (2001): Plant bZIP G-box binding factors. Modular structure and activation mechanisms. *Eur J Biochem*, **268**, 5655-66.
- Skriver, K., Olsen, F.L., Rogers, J.C. and Mundy, J. (1991): cis-acting DNA elements responsive to gibberellin and its antagonist abscisic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 7266-70.
- Skubatz, H., Meeuse, B.J.D. and Bendich, A.J. (1989): Oxidation of proline and glutamate by mitochondria of the inflorescence of voodoo lily (*Sauromatum guttatum*). *Plant Physiol*, **91**, 530-535.
- Smart, C.M. (1994): Gene expression during leaf senescence. *New Phytol*, **126**, 419-448.
- Smeekens, S. (2000): Sugar-induced Signal Transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*, **51**, 49-81.
- Smirnoff, N. and Cumbes, Q.J. (1989): Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, **28**, 1057-1060.
- Smith, H.O. and Wilcox, K.W. (1970): A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*. I. Purification and general properties. *J Mol Biol*, **51**, 379-91.
- Solomon, M.J., Larsen, P.L. and Varshavsky, A. (1988): Mapping protein-DNA interactions in vivo with formaldehyde: evidence that histone H4 is retained on a highly transcribed gene. *Cell*, **53**, 937-47.
- Solomon, M.J. and Varshavsky, A. (1985): Formaldehyde-mediated DNA-protein crosslinking: a probe for in vivo chromatin structures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 6470-4.
- Southern, E.M. (1979): Measurement of DNA length by gel electrophoresis. *Anal Biochem*, **100**, 319-23.
- Sprenger-Haussels, M. and Weisshaar, B. (2000): Transactivation properties of parsley proline-rich bZIP transcription factors. *Plant J*, **22**, 1-8.
- Strathmann, A. (2003): Charakterisierung der *Nicotiana tabacum* bZIP-Transkriptionsfaktoren BZI-2, BZI-3 und BZI-4 als Heterodimerisierungspartner von BZI-1. *Dissertation*.
- Strathmann, A., Kuhlmann, M., Heinekamp, T. and Droge-Laser, W. (2001): BZI-1 specifically heterodimerises with the tobacco bZIP transcription factors BZI-2, BZI-3/TBZF and BZI-4, and is functionally involved in flower development. *Plant J*, **28**, 397-408.
- Straub, P.F., Shen, Q. and Ho, T.D. (1994): Structure and promoter analysis of an ABA- and stress-regulated barley gene, *HVA1*. *Plant Mol Biol*, **26**, 617-30.

- Swidzinski, J.A., Sweetlove, L.J. and Leaver, C.J. (2002): A custom microarray analysis of gene expression during programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, **30**, 431-46.
- Tallman, G. (2004): Are diurnal patterns of stomatal movement the result of alternating metabolism of endogenous guard cell ABA and accumulation of ABA delivered to the apoplast around guard cells by transpiration? *J Exp Bot*, **55**, 1963-76.
- Terzaghi, W.B. and Cashmore, A.R. (1995): Light-regulated transcription. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **46**, 445-474.
- Testa, A., Donati, G., Yan, P., Romani, F., Huang, T.H., Vigano, M.A. and Mantovani, R. (2005): Chromatin immunoprecipitation (ChIP) on chip experiments uncover a widespread distribution of NF-Y binding CCAAT sites outside of core promoters. *J Biol Chem*, **280**, 13606-15.
- Thevelein, J.M. and Hohmann, S. (1995): Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast? *Trends in Biochemical Science*, **20**, 3-10.
- Thum, K.E., Shasha, D.E., Lejay, L.V. and Coruzzi, G.M. (2003): Light- and carbon-signaling pathways. Modeling circuits of interactions. *Plant Physiol*, **132**, 440-52.
- van der Krol, A.R. and Chua, N.H. (1991): The basic domain of plant B-ZIP proteins facilitates import of a reporter protein into plant nuclei. *Plant Cell*, **3**, 667-75.
- Varagona, M.J. and Raikhel, N.V. (1994): The basic domain in the bZIP regulatory protein Opaque2 serves two independent functions: DNA binding and nuclear localization. *Plant J*, **5**, 207-14.
- Vasil, V., Marcotte, W.R., Rosenkrans, L., Cocciolone, S.M., Vasil, I.K., Quatrano, R.S. and McCarty, R. (1995): Overlap of Viviparous1 (VP1) and abscisic acid response elements in the Em promoter: G-box elements are sufficient but not necessary for VP1 transactivation. *Plant Cell*, **7**, 1923-1932.
- Vaucheret, H., Kronenberger, J., Lepingle, A., Vilaine, F., Boutin, J.-P. and Caboche, M. (1992): Inhibition of tobacco nitrite reductase activity by expression of antisense RNA. *Plant J*, **2**, 559-569.
- Verbruggen, N., Hua, X.J., May, M. and Van Montagu, M. (1996): Environmental and developmental signals modulate proline homeostasis: evidence for a negative transcriptional regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 8787-91.
- Vidal, M. (1997): The Reverse Two-Hybrid System in The Two-Hybrid System. *Oxford University Press, New York*, 109.
- Vinson, C., Myakishev, M., Acharya, A., Mir, A.A., Moll, J.R. and Bonovich, M. (2002): Classification of human B-ZIP proteins based on dimerization properties. *Mol Cell Biol*, **22**, 6321-35.
- Vinson, C.R., Hai, T. and Boyd, S.M. (1993): Dimerization specificity of the leucine zipper-containing bZIP motif on DNA binding: prediction and rational design. *Genes Dev*, **7**, 1047-58.

- Vinson, C.R., Sigler, P.B. and McKnight, S.L. (1989): Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science*, **246**, 911-6.
- Vogel, G., Fiehn, O., Jean-Richard-dit-Bressel, L., Boller, T., Wiemken, A., Aeschbacher, R.A. and Wingler, A. (2001): Trehalose metabolism in *Arabidopsis*: occurrence of trehalose and molecular cloning and characterization of trehalose-6-phosphate synthase homologues. *J Exp Bot*, **52**, 1817-26.
- Walter, M., Chaban, C., Schutze, K., Batistic, O., Weckermann, K., Nake, C., Blazevic, D., Grefen, C., Schumacher, K., Oecking, C., Harter, K. and Kudla, J. (2004): Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J*, **40**, 428-38.
- Wang, D., Weaver, N.D., Kesarwani, M. and Dong, X. (2005): Induction of protein secretory pathway is required for systemic acquired resistance. *Science*, **308**, 1036-40.
- Wang, J.C. (2005): Finding primary targets of transcriptional regulators. *Cell Cycle*, **4**, 356-8.
- Weaver, L.M., Gan, S., Quirino, B. and Amasino, R.M. (1998): A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Mol Biol*, **37**, 455-69.
- Wellmer, F., Kircher, S., Rugner, A., Frohnmeyer, H., Schafer, E. and Harter, K. (1999): Phosphorylation of the parsley bZIP transcription factor CPRF2 is regulated by light. *J Biol Chem*, **274**, 29476-82.
- Weltmeier, F. (2002): Funktionelle Charakterisierung der Transkriptionsfaktoren AtbZIP1 und AtbZIP53 aus *Arabidopsis thaliana*.
- White, J., Chang, S.Y. and Bibb, M.J. (1990): A cassette containing the bar gene of *Streptomyces hygroscopicus*: a selectable marker for plant transformation. *Nucleic Acids Res*, **18**, 1062.
- Wiese, A., Elzinga, N., Wobbes, B. and Smeekens, S. (2004): A conserved upstream open reading frame mediates sucrose-induced repression of translation. *Plant Cell*, **16**, 1717-29.
- Wiese, A., Elzinga, N., Wobbes, B. and Smeekens, S. (2005): Sucrose-induced translational repression of plant bZIP-type transcription factors. *Biochem Soc Trans*, **33**, 272-5.
- Wobbes, B. (2004): Control of plant carbohydrate partitioning by the *Arabidopsis thaliana* ATB2 bZIP transcription factor gene. *Dissertation*.
- Xiao, W., Sheen, J. and Jang, J.C. (2000): The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. *Plant Mol Biol*, **44**, 451-61.
- Xu, D., Duan, X., Wang, B., Hong, B., Ho, T.-H.D. and Wu, R. (1996): Expression of a late Embryogenesis Abundant Protein Cene, *HVA1*, from Barley Confers Tolerance to Water Deficit and Salt Stress in Transgenic Rice. *Plant Physiol*, **110**, 249-257.



- Yang, J.C., Zhang, J.H., Wang, Z.Q., Zhu, Q.S. and Liu, L.J. (2003): Involvement of abscisic acid and cytokinins in the senescence and remobilization of carbon reserves in wheat subjected to water stress during grain filling. *Plant Cell Environ*, **26**, 1621-1631.
- Yang, S.H., Berberich, T., Sano, H. and Kusano, T. (2001): Specific association of transcripts of *tbzF* and *tbz17*, tobacco genes encoding basic region leucine zipper-type transcriptional activators, with guard cells of senescing leaves and/or flowers. *Plant Physiol*, **127**, 23-32.
- Yang, S.H., Yamaguchi, Y., Koizumi, N., Kusano, T. and Sano, H. (2002): Promoter analysis of *tbzF*, a gene encoding a bZIP-type transcription factor, reveals distinct variation in cis-regions responsible for transcriptional activation between senescing leaves and flower buds in tobacco plants. *Plant Science*, **162**, 973-980.
- Zeng, X., Herndon, A.M. and Hu, J.C. (1997): Buried asparagines determine the dimerization specificities of leucine zipper mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 3673-8.
- Zhang, H.Q. and Croes, A.F. (1983): Protection of pollen germination from adverse temperature: a possible role for proline. *Plant Cell Environ*, **6**, 471-476.
- Zhang, Y., Shewry, P.R., Jones, H., Barcelo, P., Lazzeri, P.A. and Halford, N.G. (2001): Expression of antisense SnRK1 protein kinase sequence causes abnormal pollen development and male sterility in transgenic barley. *Plant J*, **28**, 431-441.
- Zhou, J.M., Trifa, Y., Silva, H., Pontier, D., Lam, E., Shah, J. and Klessig, D.F. (2000): NPR1 differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the *PR-1* gene required for induction by salicylic acid. *Mol Plant Microbe Interact*, **13**, 191-202.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L. and Gruissem, W. (2004): GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol*, **136**, 2621-32.

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungen

A	Adenosin
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>A.</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Acker-Schmalwand)
aa	Aminosäuren (amino acids)
AD	Aktivierungsdomäne
Ade	Adenin
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	Bacterial artificial chromosome
BD	Bindedomäne
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaar(e)
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
bZIP	basischer Leucinzipper
bzw.	Beziehungsweise
C	Formelzeichen für Kapazität
C	Kohlenstoff
C	Cytosin
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
cfu	colony forming units
CIAP	Calf Intestine Alkaline Phosphatase
CSM	Complete Supplement Mixture
cv.	Kultivar
ddNTPs	Didesoxyribonucleotide
d.h.	dass heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTPs	Desoxyribonucleotide
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
<i>et al.</i>	und andere ( <i>et alii</i> )
<i>etc.</i>	und so weiter ( <i>et cetera</i> )
EtOH	Ethanol
G	Formelzeichen für Fallbeschleunigung
G	Guanosin
Gm	Gentamycin
HEC	Hydroxyethyl-Cellulose
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
His	Histidin
HSP	Heringsperma-DNA
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton

Km	Kanamycin
LB	Luria-Bertani Broth
Leu	Leucin
LiAc	Lithiumacetat
MCS	Multiple Cloning Site
MES	$\beta$ -Morpholino-ethansulfonsäure Hydrat
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
<i>N.t.</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
NaAc	Natriumacetat
OD	optische Dichte
oNPG	o-Nitrophenyl $\beta$ -D-Galactopyranosid
ORF	offener Leserahmen (Open Reading Frame)
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PEG	Polyethylenglycol
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PIPES	1,4-Piperazin-bis-(ethansulfonsäure)
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid
PVDF	Polyvinylidene Fluorid
R	Formelzeichen für Widerstand
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodiumdodecylsulfate)
ss	einzelsträngig (single stranded)
SD	Synthetic dropout
SSC	Natriumcitrat (sodium salt citrat)
t	Reaktionszeit
T	Thymin
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> DNA-Polymerase
T-DNA	Transfer-DNA
TEMED	N, N, N', N'-Tetraethylethyldiamin
$T_m$	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan
u	definierte Enzymeinheit (unit)
U	Uracil
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
UAS	Upstream Activating Sequence
UV	Ultraviolettes Licht
v/v	Volumenprozent (volume per volume)
w/v	Gewichtsprozent (weight per volume)
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
Y2H	Hefe „Two-Hybrid“-System (Yeast-Two-Hybrid-System)
z. B.	zum Beispiel
$\lambda$	Bakteriophage Lambda

## 8.2 Aminosäuren

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

### 8.3 Einheiten

°C	Grad Celsius	(Temperatur)
A	Ampère	(Stromstärke)
D	Dalton	(Molekulargewicht)
F	Farad	(Kapazität)
g	Gramm	(Masse)
h	Stunde	(Zeit)
l	Liter	(Volumen)
m	Meter	(Länge)
M	mol / l	(Molarität)
min	Minute	(Zeit)
mol	mol	(Stoffmenge)
s	Sekunde	(Zeit)
V	Volt	(Spannung)
Ω	Ohm	(Widerstand)

### 8.4 Vorsätze zur Bezeichnung von dezimalen Vielfachen und Teilen von Einheiten

K	kilo-	(10 <sup>3</sup> )
C	centi-	(10 <sup>-2</sup> )
M	milli-	(10 <sup>-3</sup> )
μ	mikro	(10 <sup>-6</sup> )
N	nano-	(10 <sup>-9</sup> )
P	pico-	(10 <sup>-12</sup> )

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Wolfgang Dröge-Laser und Prof. Dr. Christiane Gatz für die Möglichkeit, diese Arbeit in ihrer Abteilung anzufertigen, und für die Übernahme des Referats bzw. des Korreferats.

Dem Graduiertenkolleg "Molekulare Genetik der Entwicklung" danke ich für die Finanzierung meiner Promotion, und für die Möglichkeit über den 'Tellerrand' Pflanze hinauszublicken.

Danken möchte ich auch unseren Kollaborationspartnern Dr. Jesus Vicente-Carbajosa, Professor Dr. Sjef Smeekens und Professor Dr. Klaus Harter sowie meinen Diplomandinen Andrea Ehlert und Katrin Dietrich, ohne deren Unterstützung die Bearbeitung eines so komplexen Themas nicht möglich gewesen wäre. Ein besonderer Dank geht dabei an Dr. Jesus Vicente-Carbajosa für die Möglichkeit, in seinem Labor die Mikroarray Experimente durchzuführen, sowie für seine außerordentliche Gastfreundschaft während meines Aufenthaltes in Madrid.

PD Dr. Gertrud Lohaus danke ich besonders für die Durchführung der Zuckermessungen.

Mein Dank gilt auch meinen Laborkollegen, die mich bei dem Lernen neuer Methoden unterstützt haben, und die mir immer wenn es notwendig war tatkräftig geholfen haben.

Ein ganz besonderer großes Dankeschön geht an Tanja, und an meine und ihre Familie, ohne deren Unterstützung ich diese Arbeit nicht hätte anfertigen können.

## **Lebenslauf:**

### Persönliche Daten:

Name: Fridtjof Walter Engelbert Weltmeier  
Geburtsdatum: 05.12.1972  
Geburtsort: Dortmund  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Ausbildung:

Seit 07/2002 Dissertation "Ein Netzwerk von heterodimerisierenden C/S1 AtbZIP-Transkriptionsfaktoren und seine Funktion in Seneszenz, Stressantwort und Samenentwicklung"

06/2001-06/2002: Diplomarbeit "Funktionelle Charakterisierung der Transkriptionsfaktoren *AtbZIP1* und *AtbZIP53* aus *Arabidopsis thaliana*"

7.2.2001: mündliche Diplomprüfung Biochemie: sehr gut; Botanik: sehr gut; Chemie: sehr gut

1997-1999: Im März 1997 Diagnose Leukämie, im März 1998 erfolgte eine Knochenmarktransplantation; das Studium ausgesetzt bis Ende 1999

10/1996: Vordiplom Botanik: sehr gut; Mikrobiologie: gut; Physikalische Chemie: sehr gut; Anorganische Chemie: sehr gut

10/1994: Beginn des Diplomstudiengangs Biologie an der Universität Göttingen

03-05/1994: Praktikum im Garten und Landschaftsbau

10/1992-01/1994: Zivildienst bei dem Arbeiter Samariter Bund

1983-1992: Gymnasium an der Schweizer Allee, Dortmund; Abitur in den Fächern Chemie, Biologie, Englisch und Philosophie Gesamtnote 2,4

1979-1983: Aplerbecker Mark Grundschule, Dortmund

