

**„Funktionelle Analyse von
ERF-Transkriptionsfaktoren aus *N. tabacum*
und *A. thaliana* im Rahmen der Pathogenresistenz“**

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

vorgelegt von
Ute Fischer
aus Berlin

Göttingen 2003

D7

Referent: PD Dr. Wolfgang Dröge-Laser

Korefernet: Prof. Dr. Chritiane Gatz

Tag der mündlichen Prüfung: 06.11.2003

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	2
1 ZUSAMMENFASSUNG	7
2 EINLEITUNG	8
2.1 Die pflanzliche Pathogenabwehr	8
2.1.1 Die Transkriptionskontrolle von pflanzlichen Abwehrgenen	11
2.1.2 Die AP2 / ERF-Familie	12
2.1.3 Die Rolle der ERF-Proteine bei der Pathogenabwehr	15
2.1.3.1 Das Pto-Pti-System	15
2.1.3.2 Die ERF-Proteine aus Tabak	16
2.1.3.3 Die ERF-Proteine aus <i>Arabidopsis</i>	17
2.1.4 Die Rolle der ERF / DREB-Proteine bei abiotischem Stress	18
2.2 Zielsetzung der Arbeit	19
3 MATERIAL	21
3.1 Geräte	21
3.2 Chemikalien	22
3.3 Verbrauchsmittel	24
3.4 Kits	24
3.5 Grössenstandards	25
3.6 Proteine	25
3.6.1 Enzyme	25
3.6.2 Antikörper	25
3.7 Nukleinsäuren	25
3.7.1 Primer	25
3.7.2 Oligonukleotide	32
3.7.3 Plasmide	32
3.7.4 Erstellte Plasmide	33
3.7.4.1 pBINHyg-NtERF5	33
3.7.4.2 pBINHyg-NtERF6	33
3.7.4.3 pGEM-T-NtERF6	33
3.7.4.4 pBluescriptIIISK-NtERF5	34
3.7.4.5 pBluescriptIIKS-NtERF6	34

3.7.4.6	pDEST17-AtERF1	34
3.7.4.7	pET28a-NtERF5	34
3.7.5	Fragemente für die Northern Blot Hybridisierung	35
3.8	Organismen	36
3.8.1	Mikroorganismen	36
3.8.2	Hefestämme	36
3.8.3	Pflanzen	36
3.9	Medien	37
3.9.1	Bakterienmedien	37
3.9.2	Hefemedien	38
3.9.3	Pflanzenmedien	38
3.10	Lösungen und Puffer	38
3.10.1	Zusätze	40
3.10.2	Lösungen und Puffer für EMSA (E <u>l</u> ectrophoretic M <u>o</u> bility S <u>h</u> ift A <u>s</u> say)	40
3.10.3	Lösungen und Puffer für Reversen Northern (Array)	41
3.10.4	Puffer für denaturierende Proteinextrakte aus Tabak	41
3.10.5	Puffer für native Gesamtproteinextrakte aus Hefe	42
3.10.6	Puffer für schnelle genomische DNA aus <i>Arabidopsis</i>	42
3.10.7	Puffer für genomische DNA aus <i>Arabidopsis</i>	42
3.10.8	Puffer für die Infektion mit <i>Botrytis cinerea</i>	42
4	METHODEN	43
4.1	Anzucht und Kultivierung von Mikroorganismen und Pflanzen	43
4.1.1	Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	43
4.1.2	Anzucht von Pseudomonaden	43
4.1.3	Anzucht von Agrobakterien	43
4.1.4	Anzucht von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43
4.1.5	Anzucht von Tabak Mosaik Virus (TMV)	43
4.1.6	Kultivierung von <i>Nicotiana tabacum</i>	44
4.1.6.1	Gewebekultur	44
4.1.6.2	Klimakammer / Gewächshaus	44
4.1.7	Kultivierung von <i>Arabidopsis thaliana</i>	44
4.1.8	Infektion von Tabakpflanzen mit TMV	44
4.1.9	Infektion von Tabakpflanzen und <i>Arabidopsis</i> mit Pseudomonaden	44
4.1.9.1	Bestimmung des Pseudomonaden-Wachstums in der Tabakpflanze	44
4.1.9.2	Infektion mit Pseudomonaden für eine RNA-Isolation	45
4.1.9.3	Infektion von <i>A. thaliana</i> mit Pseudomonaden	45
4.1.10	Infektion von Tabakpflanzen und <i>Arabidopsis</i> mit <i>Botrytis cinerea</i>	45
4.2	Molekularbiologische Methoden	45
4.2.1	Methoden zur Isolierung von Plasmid DNA	45

4.2.1.1	Alkalische Lyse	45
4.2.1.2	Plasmidpräparation für Sequenzierung	46
4.2.1.3	Schnellyse von <i>E.coli</i> Zellen für eine anschließende PCR	46
4.2.1.4	DNA-Elution aus Agarosegelen	46
4.2.2	Methoden zur Isolierung von genomischer DNA aus Arabidopsis	46
4.2.2.1	Schnelle Präparation von genomischer DNA	46
4.2.2.2	Saubere Präparation von genomischer DNA	46
4.2.3	Methoden zur Charakterisierung von Nukleinsäuren	46
4.2.3.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	46
4.2.3.2	Agarosegelelektrophorese	47
4.2.3.3	Sequenzierung von DNA	47
4.2.3.4	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	48
4.2.3.5	RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)	48
4.2.3.6	RAGE (Rapid Amplification of genomic DNA Ends)	48
4.2.4	Methoden zur Modifikation von Nukleinsäuren	48
4.2.4.1	Restriktionsspaltung von DNA	48
4.2.4.2	Ligation	49
4.2.4.3	Alkalische Phosphatase Behandlung der DNA	49
4.2.4.4	Klonierung mit dem GATEWAY-System	49
4.2.5	Transformation von Mikroorganismen und Pflanzen	50
4.2.5.1	Transformation von <i>E. coli</i> Zellen	50
4.2.5.2	Transformation von Hefe Zellen	51
4.2.5.3	Transformation von Agrobakterien	51
4.2.5.4	Transformation von <i>Nicotiana tabacum</i>	51
4.2.5.5	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	52
4.2.6	Northern Blot Analyse	53
4.2.6.1	Isolierung von RNA aus Pflanzen	53
4.2.6.2	Denaturierende RNA-Gelelektrophorese	54
4.2.6.3	Kapillar Blot	54
4.2.6.4	Herstellen eines radioaktiv markierten DNA-Fragments	54
4.2.6.5	Hybridisieren des Filters	55
4.2.7	Reverser Northern Blot (Micro Array)	55
4.2.8	RT-PCR	56
4.3	Biochemische Methoden	57
4.3.1	<i>In vitro</i> Transkription von RNA und <i>in vitro</i> Translation von Proteinen	57
4.3.2	Native Gesamtproteinextrakte aus Hefe	57
4.3.3	Denaturierte Gesamtproteinextrakte aus Tabak	57
4.3.4	Expression und Aufreinigung von Proteinen in <i>E. coli</i>	58
4.3.5	SDS-PAGE	58
4.3.6	Coomassie-Färbung	59
4.3.7	Immobilisierung von Proteinen	59
4.3.8	Immunologische Detektion	59
4.3.9	EMSA	60
4.3.9.1	Herstellen eines radioaktiv markierten DNA-Fragments für EMSA	60

4.3.9.2	Annealen von Oligonukleotiden	61
4.4	Ausmessen von Läsionsgrößen	61
4.4.1	Formel für den Mittelwert	61
4.4.2	Formel für die Standardabweichung	61
4.5	Verwendete Computerprogramme	61
5	ERGEBNISSE	62
5.1	Isolierung zweier ERF-Transkriptionsfaktoren aus Tabak mit Hilfe des "Hefe-one-Hybrid"-Systems	62
5.2	Charakterisierung der DNA-Bindung von NtERF5 mit Hilfe von <i>in vitro</i> Bindestudien	68
5.3	Transkriptionsmuster von <i>NtERF5</i> und <i>NtERF6</i> in Tabak	71
5.3.1	Gewebespezifische Transkription von NtERF5 und NtERF6	71
5.3.2	Induktion der Transkription von <i>NtERF5</i> und <i>NtERF6</i> durch Signalmoleküle aus der Signalkette der Pathogenabwehr	72
5.3.3	Induktion von <i>NtERF5</i> und <i>NtERF6</i> durch Verwundung	74
5.3.4	Induktion der Transkription von <i>NtERF5</i> und <i>NtERF6</i> durch Pathogene	75
5.4	Überexpression von NtERF5 und NtERF6 in Tabakpflanzen	78
5.4.1	Einfluss der Überexpression von NtERF5 und NtERF6 auf die pflanzliche Abwehr gegen das bakterielle Pathogen <i>Pseudomonas syringae</i>	79
5.4.2	Einfluss der Überexpression von NtERF5 und NtERF6 auf die pflanzliche Abwehr gegen TMV	83
5.4.3	Einfluss der Überexpression von NtERF5 auf <i>PR3</i>	90
5.5	Genomweite Analyse von ERF-Transkriptionsfaktoren aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	92
5.5.1	Pathogen-induzierte Transkription der ERF-Gene mit Hilfe eines transkriptionsfaktorspezifischen Makro-ARRAY	99
5.5.2	Funktionsanalyse von ERF-Faktoren mittels RNA-Interferenz (RNAi)	102
5.5.3	Analyse einer T-DNA Insertionslinie	107
5.5.4	Infektion der transgenen Pflanzen mit Pseudomonaden und <i>Botrytis cinerea</i>	109
6	DISKUSSION	112
6.1	NtERF5 und NtERF6 sind Mitglieder der ERF-Familie	112
6.2	Die DNA-Bindung von NtERF5	112
6.3	NtERF5 und NtERF6 sind nicht an der Regulation der pflanzlichen Entwicklung beteiligt	114

6.4	NtERF5 ist an der Pathogenabwehr beteiligt	115
6.5	Die unterschiedliche Induktion von <i>NtERF5</i> und <i>NtERF6</i> nach Verwundung	119
6.6	Versuche zur genomweiten Analyse von ERF-Faktoren aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	119
6.7	Der Einfluss der verringerten Expression von AP2-21 und AP2-31 auf die Pathogenabwehr	121
6.8	Ausblick	121
7	LITERATURVERZEICHNIS	123
8	ANHANG	138
8.1	Abkürzungen	138
8.2	Mit Hilfe der RACE ermittelte Basensequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von <i>NtERF5</i>	141

1 Zusammenfassung

Auf der Suche nach Transkriptionsfaktoren, die im Zuge der Pathogenabwehr induziert werden und an bestimmte DNA-Sequenzen binden, wurde mit einem "Hefe-one-Hybrid"-System eine Tabakblatt-cDNA-Bibliothek durchmustert und daraus die cDNAs zweier DNA-bindender Proteine isoliert. Aufgrund ihrer abgeleiteten Aminosäuresequenz konnten sie in die Familie der ERF-Transkriptionsfaktoren eingeordnet werden. Die beiden, bis dahin unbekannt Genen wurden *NtERF5*, bzw. *NtERF6* genannt. Für die DNA-Bindung besitzen sie eine AP2-Domäne. ERF-Proteine sind häufig an der Pathogenabwehr, aber auch an der Fähigkeit der Pflanze, abiotischen Stress zu tolerieren, beteiligt.

Beide Proteine waren durch Verwundung induzierbar. Im Gegensatz zu *NtERF6* wurde *NtERF5* nach Infektion der Tabakpflanzen mit Pseudomonaden oder TMV induziert. Die Überexpression von *NtERF5* war jedoch nicht ausreichend, um den Tabakpflanzen eine erhöhte Resistenz gegen Pseudomonadeninfektion zu verleihen. Bei der Infektion dieser Pflanzen mit TMV zeigten die systemisch infizierten Blätter keine Symptome der Abwehr. Die Replikation und Ausbreitung des Virus ist in den transgenen Pflanzen, die *NtERF5* überexprimieren, wohl eingeschränkt.

Weder die Überexpression von *NtERF5*, noch die von *NtERF6* hatten eine phänotypische Veränderung der Tabakpflanzen zur Folge.

Die DNA-Bindung von *NtERF5* an die GCC-Box *in vitro* war nur mit unaufgereinigtem, rekombinanten Protein nachweisbar.

Im Rahmen des EU-Projektes REGIA (Regulatory Gene Initiative in Arabidopsis) konnten in *Arabidopsis thaliana* mit einem genomischen Ansatz nahezu alle ERF-Faktoren (145) näher untersucht werden. Für diese Arbeit wurden sieben zu *NtERF5* und *NtERF6* nahe verwandte Gene hinsichtlich ihrer Induzierbarkeit durch Salizylsäure oder Pseudomonaden genauer untersucht. Dabei wurde deutlich, dass eine bestehende Sequenzhomologie nicht immer auch die gleiche Funktion der Proteine impliziert.

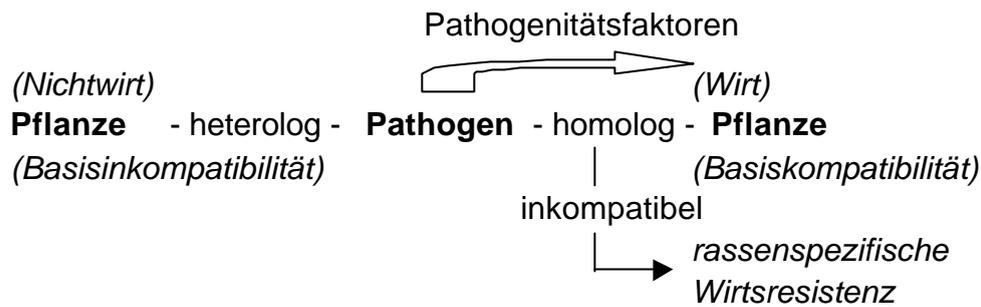
Die beiden zu *NtERF5* und *NtERF6* am nächsten verwandten Proteine sind AP2-31 und AP2-21. Ihre Funktion bei der Pathogenabwehr wurde mit RNAi-Pflanzen und einer T-DNA-Insertionslinie untersucht. Dabei führte eine verringerte Expression, bzw. die Abwesenheit einer der beiden Proteine nicht zu einer erhöhten Infektionsanfälligkeit der Pflanzen gegenüber Pseudomonaden oder dem peritrophen Pilz *Botrytis cinerea*.

2 Einleitung

Wie alle Lebewesen müssen sich auch Pflanzen an wechselnde Umweltbedingungen anpassen. Eine besondere Bedrohung für sie sind starke Temperaturschwankungen, längere Zeiträume mit geringer Wasserversorgung und schnelle Veränderungen der Lichtintensität. Neben der Anpassung an diese abiotischen Umweltveränderungen, ist auch die wirksame Reaktion auf biotische Stressfaktoren wichtig für das Überleben der Pflanze. Von grosser Bedeutung ist die schnelle Erkennung und Abwehr von Frassfeinden und Mikroorganismen, wie Pilzen, Bakterien und Viren. In dieser Arbeit wurden die Abwehrmechanismen in Tabak (*Nicotiana tabacum*) und Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) von bakteriellen, viralen und pilzlichen Pathogenen näher untersucht. Dabei lag der Schwerpunkt auf den Abläufen auf molekularer Ebene, die zu einer Pathogenabwehr führen.

2.1 Die pflanzliche Pathogenabwehr

Pathogene können innerhalb kurzer Zeit sehr grossen Schaden anrichten. Gegenüber einem grossen Spektrum an Pathogenen haben Pflanzen eine Basisresistenz, man spricht auch von Basisinkompatibilität; diese Pflanzen werden als Nichtwirtspflanzen bezeichnet. Die Interaktion zwischen einem Pathogen und einem Nicht-Wirt bezeichnet man als heterolog. Dabei kommt es nicht zu einer Besiedlung der Pflanze durch das Pathogen. Bringt das Pathogen jedoch sogenannte Pathogenitätsfaktoren mit und kann damit die Basisresistenz einer bestimmten Pflanze überwinden, wird diese nun als Wirtspflanze bezeichnet und kann befallen werden. Das auf Basiskompatibilität beruhende Zusammenspiel der beiden Spezies, bezeichnet man als homolog. Die homologe Interaktion besteht meistens in einer kompatiblen Interaktion zwischen Pflanze und Pathogen, bei der die Pflanze besiedelt wird. Ein Sonderfall der homologen Interaktion ist eine Inkompatibilität zwischen Pflanze und Pathogen, die darauf beruht, dass die Pflanze ein oder mehrere rassenspezifische Gene exprimiert, damit bestimmte Pathogene erkennen kann und in der Lage ist, eine pathogenspezifische Abwehr zu etablieren. Man bezeichnet diesen Vorgang als rassenspezifische Wirtsresistenz.



aus einem LRR, sind in der Membran verankert und besitzen eine zytoplasmatische Kinase-Domäne, wie z.B. *XA21* aus Reis, das für die Resistenz gegen "bacterial blight disease" verantwortlich ist. Die Gruppe der RPW8-R-Proteine ist ebenfalls in der Membran verankert und hat zytoplasmatisch eine coiled-coil Domäne. Sie verleihen Arabidopsispflanzen eine Resistenz gegen Mehltau. In die fünfte Klasse gehören zytoplasmatisch lokalisierte Kinasen, die durch ihren aminoterminalen Bereich möglicherweise mit der Membran assoziiert sind. In diese Klasse gehört das Protein Pto aus *Lycopersicon esculentum* (Dangl und Jones, 2001; Zhu *et al.*, 1996). Interaktion von Pto mit avrPto aus *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* verleiht den Tomaten Resistenz gegen "bacterial speck disease". Eine direkte Interaktion zwischen einem R-Genprodukt und einem avr-Protein konnte in der Pflanze bisher nur für Pto und avrPto(B) nachgewiesen werden (Kim *et al.*, 2002).

Durch die Erkennung des Pathogens in der Pflanze kommt es zu einer Reihe von physiologischen Veränderungen. Dazu gehört die Depolarisation der Plasmamembran durch Ionenflüsse. Dadurch wird wiederum eine in der Membran lokalisierte NAD(P)H-Oxidase aktiviert, und es werden reaktive Sauerstoffspezies (RO I= Reaktive Oxygen Intermediates) produziert, wie Superoxidanionen. Dieser als "Oxidative Burst" bezeichnete Vorgang führt zu einer dichteren Vernetzung (cross-linking) der Strukturproteine der Zellwand, wodurch den Pathogenen das Eindringen in die Zelle erschwert wird, und ist notwendig für die Phytoalexinproduktion. Weitere wichtige, sich anhäufende Botenstoffe sind Stickstoffmonoxid (NO) und Salizylsäure (Bolwell, 1999).

Die Signaltransduktion gliedert sich in eine Salizylsäure-vermittelte Abwehr und eine durch Jasmonsäure und Ethylen vermittelte Abwehr, abhängig davon, welches Pathogen die Pflanze angreift. Die Weiterleitung der Signale geschieht mittels Phosphorylierung, beteiligt sind MAP-Kinasen, die durch Salizylsäure (SIP Kinasen) oder durch Verwundung (WIP Kinasen) induzierbar sind. Diese unterschiedlichen Signaltransduktionswege konnten mit Hilfe von *Arabidopsis*-Mutanten aufgeklärt werden, die in der Weiterleitung der durch Salizylsäure oder Ethylen und Jasmonat aktivierten Signalketten blockiert sind (McDowell und Dangl, 2000). Die Arbeit mit *Arabidopsis*-Mutanten konnte auch zeigen, dass diese beiden Signalwege sich gegenseitig hemmen (Dong, 1998).

Die infizierten und diesen direkt benachbarten Zellen unterliegen dem programmierten Zelltod (Apoptose), man bezeichnet diesen anhand von Läsionen makroskopisch sichtbaren Vorgang als HR (Hypersensitive Response). In den umgebenden Zellen beginnt die Expression von PR-Genen (Pathogenesis Related) und Abwehrgenen, um die Ausbreitung der Pathogene einzudämmen (Scheel, 1998). Dazu gehören Enzyme, wie Phenylalanin-

Ammonium-Lyase (PAL), ein Schlüsselenzym bei der Produktion von phenolischen Komponenten, und Synthesenzyme für antimikrobielle Sekundärmetabolite, wie z.B. Phytoalexine. PR-Gene werden in mindestens 14 Gruppen unterteilt. Einige von ihnen sind Chitinasen (PR3, 4), einige sind β -1,3-Glukanasen (van Loon und van Strien, 1999). Ihre Funktion im Rahmen der Pathogenabwehr ist unklar.

Einige Tage nach der Erstinfektion ist die Pflanze resistenter gegen ein grosses Spektrum verschiedener Pathogene. Vermittelt durch ein mobiles Signal, etabliert sich in den nicht infizierten Bereichen der Pflanze die Systemic Acquired Resistance (SAR). Dabei werden verschiedene PR-Gene, wie *PR1a*, exprimiert. In Wurzeln von *Arabidopsis thaliana columbia* kann durch Rhizobakterien, über Jasmonsäure und Ethylen vermittelt, die ISR (Induced Systemic Resistance) induziert werden. Pflanzen, die diese Abwehr etabliert haben, sind ebenfalls gegen ein breites Spektrum von Pathogenen resistenter. Die beiden Hormone wirken dabei additiv. Die ISR ist unabhängig von Salizylsäure. Im Gegensatz zur SAR werden bei der ISR nicht PR-Gene, sondern antimikrobielle Stoffe produziert. Sowohl ISR, als auch SAR werden durch NPR1 vermittelt, ein Gen, das bisher nur in die durch Salizylsäure vermittelte Abwehr von Pathogenen eingeordnet wurde (Feys und Parker, 2000).

2.1.1 Die Transkriptionskontrolle von pflanzlichen Abwehrgenen

In einer Zelle wird zu einem bestimmten Zeitpunkt nur ein Teil der vorhandenen Gene exprimiert. An der Regulation beteiligt sind Proteine, die im Promotorbereich binden und als Transkriptionsfaktoren bezeichnet werden. Diese werden auch als *trans*-Faktoren bezeichnet, die DNA-Sequenz, an die sie binden, heisst *cis*-Element. Transkriptionsfaktoren können als Aktivatoren die Transkription eines Gens stimulieren oder als Repressoren die Expression unterbinden. Transkriptionsfaktoren wirken entweder als Einzelproteine, als Homo- oder Heterodimere (bZIP Proteine) oder mit anderen Proteinen zusammen in grösseren Komplexen. Charakteristisch für einen Transkriptionsfaktor sind eine DNA-bindende Domäne, eine Kernlokalisierungsdomäne (NLS= Nuclear Localisation Signal) und eine Aktivierungs- oder Reprimierungsdomäne. Nach ihrer DNA-bindenden Domäne werden Transkriptionsfaktoren in Familien unterteilt, wie z.B. basische Leucin Zipper (bZIP). Einzigartig für das Reich der Pflanzen ist die Apetala2 (AP2)-Familie.

Eine Reihe von Transkriptionsfaktoren sind als terminale Glieder einer Signalkaskade im Rahmen der Pathogenabwehr für die Regulation von Abwehrgenen verantwortlich. WRKY-Proteine binden an W-Boxen und kontrollieren beispielsweise die Expression von CHN50, eine Chitinase aus Tabak (Fukuda, 1997). In Petersilie findet man im Promotorbereich der

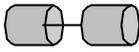
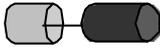
PAL1 *cis*-Elemente, an die nach Infektion mit pilzlichen Elicitoren sogenannte MYB-Proteine binden (Feldbrügge *et al.*, 1997). Bei der Reaktion der Pflanze auf Verwundung, UV-Licht und Pathogeninfektionen spielen G-Boxen zusammen mit H-Boxen eine Rolle bei der Regulation von Genen des Phenylpropanstoffwechsels (Loake *et al.*, 1992). Eine wichtige Rolle bei der Weiterleitung durch Salizylsäure-induzierter Signale bei der Induktion von PR-Genen spielt das *as1*-Element (Yang *et al.*, 1997).

2.1.2 Die AP2 / ERF-Familie

Das erste isolierte Gen dieser Familie war APETALA2 aus *Arabidopsis*. Das Protein besitzt zwei Kopien einer Domäne, die AP2-Domäne genannt wird und die DNA-Bindung vermittelt (Okamuro *et al.*, 1997). Etwas später wurden aus einer Phagenbank aus mit Ethephon (2-Chloroethylphosphonsäure, aus der Ethylen freigesetzt wird) behandelten Tabakblättern mit der GCC-Box die ersten Proteine mit nur einer AP2-Domäne isoliert. Sie werden als Ethylene Responsive Element Binding Proteins (EREBP) bezeichnet (Ohme-Takagi und Shinshi, 1995). AP2 / ERF (Ethylene Responsive Element Binding Factors)-Proteine sind bisher ausschliesslich in Pflanzen nachgewiesen worden.

Die AP2-Familie teilt sich in zwei Unterfamilien, basierend auf der Anzahl der AP2-Domänen. Die Proteine der AP2-Familie haben zwei AP2-Domänen und sind funktionell an der Entwicklung der Pflanze beteiligt (Riechmann und Meyerowitz, 1998). APETALA2 ist an der Etablierung des Blütenmeristems beteiligt und an der Blütenmorphogenese (Jofuku *et al.*, 1994). Die Proteine der ERF-Familie besitzen nur eine AP2-Domäne und sind an der Pathogenabwehr und der Reaktion auf abiotischen Stress, wie Trockenheit und Kälte beteiligt. ERF-Proteine, die im Rahmen der Pathogenabwehr die Expression von PR-Genen regulieren, binden an das *cis*-Element mit der Sequenz TAAGAGCCGCC (GCC-Box). ERF-Proteine, die ausschliesslich an der Bewältigung der Pflanze von Trocken- und Kältestress beteiligt sind, binden an die Sequenz TACCGACAT, die als "Drought Responsive Element" oder auch DRE-Box bezeichnet wird (Liu *et al.*, 1998). Sie werden als DREB-Proteine zusammengefasst. Darüberhinaus gibt es noch Proteine, die eine AP2-Domäne und eine B3-Domäne besitzen, wie z.B. RAV1. Die B3-Domäne ist eine basische DNA-Bindedomäne (Suzuki *et al.*, 2001). Über die Funktion von RAV-Proteinen ist allerdings noch nichts bekannt (Kagaya *et al.*, 1999).

Tabelle 2.1: Einteilung der AP2-Transkriptionsfaktoren aus *Arabidopsis thaliana* hinsichtlich der Aminosäuresequenz ihrer DNA-bindenden Domäne (nach Sakuma *et al.*, 2002); hellgraue Tonne = AP2-Domäne der AP2 / ERF-Proteine, dunkelgraue kleine Tonne = AP2-Domäne der DREB-Proteine, dunkelgraue grosse Tonne = B3-Domäne, weisse Tonne = DNA-Bindedomäne von anderen AP2-Proteinen.

Subfamilie	DNA-Bindedomäne	Subgruppen	Anzahl der Gene	Repräsentative Gene
AP2			14	Apetala2 (AP2) (Jofuku <i>et al.</i> , 1994)
ERF		B1 B2 B3 B4 B5 B6	15 5 18 7 8 <u>12</u> 65	ERF1 (Solano <i>et al.</i> , 1998)
DREB		A1 A2 A3 A4 A5 A6	6 8 1 16 16 <u>2</u> 56	DREB1 (Liu <i>et al.</i> , 1998)
RAV			6	RAV1 (Kagaya <i>et al.</i> , 1999)
andere			4	
			145	

ERF-Proteine binden an die GCC-Box als Monomere (Hao *et al.*, 1998). Die DNA-bindende Domäne AP2 besteht aus drei antiparallelen β -Faltblatt-Strukturen und einer α -Helix. Aus dem Bändermodell der Kristallstruktur von AtERF1 mit der GCC-Box in Abbildung 2.2 ist ersichtlich, dass die β -Faltblätter mit der DNA in Kontakt treten, während die α -Helix von der DNA abgewandt und frei für die potentielle Interaktion mit anderen Proteinen ist (Allen *et al.*, 1998).

an die DRE-Box nicht mehr nachweisbar ist. Für DREB2A ist diese Substitution sogar hinreichend für eine Bindung an die GCC-Box, statt an die DRE-Box.

Welche Basen wirklich für die spezifische DNA-Bindung nötig sind, war ebenfalls bereits Gegenstand von *in vitro* Bindestudien. So ist nach Sakuma *et al.* (2002) in dem DRE-Element 5'-TACCGACAT-3' die Kernsequenz 5'-^AGCCGAC-3' entscheidend für die spezifische Bindung von DREB-Proteinen.

Für die ERF-Proteine sind die Basen G6, G9 und C11 der GCC-Box wichtig (siehe Abbildung 2.4). Hao *et al.* (2002) gehen sogar soweit, dass das Kernmotiv 5'-CCGNC-3' nur durch ein im 5'-Bereich angefügtes Guanin spezifisch von ERF-Proteinen erkannt wird.

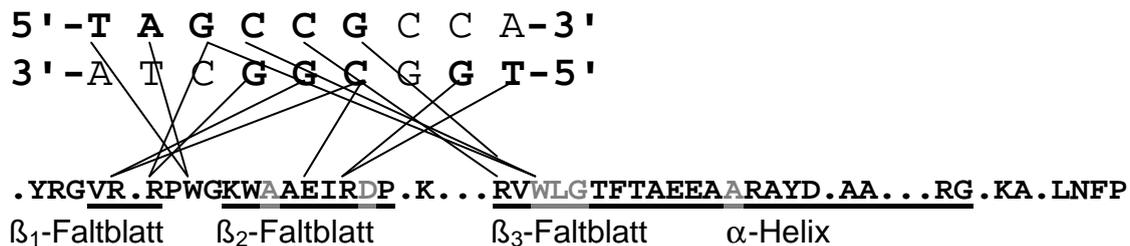


Abb. 2.4: Interaktion der AP2-Domäne mit der GCC-Box

Hervorgehoben sind die 3 β-Faltblattbereiche und die α-Helix. Grau markiert sind die Aminosäuren Alanin (14) und Asparaginsäure (19), sowie zwei weitere konservierte Bereiche. Fett gedruckt sind die Basen, die mit Aminosäuren aus der AP2-Domäne in Kontakt treten. Durch Striche verbunden sind jeweils die mit der GCC-Box interagierenden Aminosäuren (Arginin 6, 8, 18, 26; Tryptophan 10, 28; Glutaminsäure 16) von AtERF1 und die bei der DNA-Bindung wichtigen Basen der GCC-Box (nach Hao *et al.*, 2002).

2.1.3 Die Rolle der ERF-Proteine bei der Pathogenabwehr

Bisher sind zahlreiche ERF-Gene aus Tomate, *Arabidopsis* und Tabak isoliert worden. Die Überexpression einiger ERF-Proteine verbesserte in einigen Fällen die Pathogenabwehr der Pflanzen. Besonders gut beschrieben ist das Pto-Pti-System aus Tomate.

2.1.3.1 Das Pto-Pti-System

Einer der oben genannten R-Genprodukte ist die zytoplasmatisch lokalisierte Serin/Threonin-Kinase Pto aus Tomate. Mit Pto als Köder konnten in einem "Hefe-two-Hybrid"-System hoch spezifisch interagierende Proteine isoliert werden. Sie werden als Pti (Pto interagierend) bezeichnet. Pti1 ist ebenfalls eine Serin / Threonin-Kinase, wird nach Infektion mit *Pseudomonas syringae* pathovar *tomato* phosphoryliert und löst die HR aus (Zhou *et al.*, 1995). Pti4, Pti5 und Pti6 sind Transkriptionsfaktoren der ERF-Familie, die ebenfalls als mit Pto interagierend isoliert wurden (Zhou *et al.*, 1997). Noch unklar ist die Rolle von Prf, das eine Nucleotide-Binding-site und ein LRR enthält. Prf allein ist nicht ausreichend für die Aktivierung von PR-Genen, seine Anwesenheit ist jedoch notwendig für

das Auslösen der HR. Diskutiert wird eine mögliche Interaktion von Prf mit Pto in der Pflanze (Salmeron *et al.*, 1996; Rathjen *et al.*, 1999).

Durch die Überexpression von Pto wird in mikroskopisch kleinen Bereichen der Blätter die Apoptose induziert. Diese Tomatenpflanzen enthalten mehr Salizylsäure, und einige PR-Gene werden konstitutiv transkribiert. Die Pflanzen sind insgesamt gegen eine Reihe von unterschiedlichen Pathogenen, wie *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* und *Cladosporium fulvum*, resistenter (Tang *et al.*, 1999; Xiao *et al.*, 2001).

Pti4, Pti5 und Pti6 besitzen eine AP2-Domäne, aufgrund derer sie in die Familie der AP2 / ERF-Transkriptionsfaktoren eingordnet werden. Sie binden an die GCC-Box im Promotor des *gln2* Gens (β -1,3-Glukanase). Die Box ist auch im Promotor von weiteren basischen, durch Pathogene induzierbaren PR-Genen vorhanden, wie bCHN48 (Yamamoto *et al.*, 1999).

Pti4 und Pti5 sind durch *P. s.* pv *tomato* unabhängig von Ethylen, Salizylsäure und Jasmonsäure induzierbar. Pti4 ist zusätzlich auch durch Ethylen, Salizylsäure und Verwundung induzierbar (Thara *et al.*, 1999).

Die Überexpression von Pti5 in Tomate macht die Pflanzen resistenter gegen *P. s.* pv *tomato*, dabei werden einige PR-Gene schneller und stärker induziert (He *et al.*, 2001).

Die Überexpression von Pti4 in *Arabidopsis* führt zur konstitutiven Expression einer basischen Chitinase. Ausserdem zeigen die Keimlinge ein verkürztes Hypokotylwachstum, ein Phänotyp, wie Keimlinge ihn zeigen, die permanent Ethylen ausgesetzt sind. Lediglich die Biegung des apikalen Hakens ist dabei nicht so stark ausgeprägt. Diskutiert wird als Grund die Missregulation des Gens *HOOKLESS1*, das in seinem Promotor eine GCC-Box enthält und an der Regulation des apikalen Hakens beteiligt ist (Tian *et al.*, 2002). *Arabidopsis*pflanzen, die Pti4 überexprimieren, sind gegen die Infektion mit Pilzen oder *P.s.* pv *tomato* resistenter (Gu *et al.*, 2002).

Die Überexpression von Pti4, Pti5 und Pti6 in *Arabidopsis* führt außerdem zu einer konstitutiven Expression von PR-Genen, die durch Salizylsäure reguliert sind (PR1), und anderen, die durch Ethylen und Jasmonsäure reguliert werden (PDF1.2).

2.1.3.2 Die ERF-Proteine aus Tabak

EREBP1-4 sind die zuerst beschriebenen Proteine der ERF-Familie. Sie wurden später in ERF1-4 (Ethylen Responsive Element Binding Factors) umbenannt (Suzuki *et al.*, 1998). Sie sind alle vier durch Ethephon in Blättern induzierbar und werden permanent in der Wurzel transkribiert (Ohme-Takagi und Shinshi, 1995). Für NtERF2 und NtERF4 wurde in

transienten Assays ihr Aktivierungspotential nachgewiesen, NtERF3 dagegen hat Repressorpotential (Ohta *et al.*, 2000).

In Tabaksuspensionskulturen konnte gezeigt werden, dass ein 11 Basenpaare kurzes Element im Promotor einer basischen Chitinase der Klasse I eine GCC-Box enthält und an der Induktion dieser Chitinase nach Infektion mit *Trichoderma viride* beteiligt ist. Dies geschieht abhängig sowohl von Phosphorylierung, wie auch Dephosphorylierung und der *de novo* Synthese von Proteinen. NtERF2 ist aufgrund seiner Kinetik vermutlich an der Regulation dieser basischen Chitinase beteiligt (Yamamoto *et al.*, 1999).

2.1.3.3 Die ERF-Proteine aus *Arabidopsis*

Auch aus *Arabidopsis* sind eine Reihe von ERF-Proteinen bereits isoliert worden. ERF1 (nicht zu verwechseln mit AtERF1) ist direkt in die Ethylenantwort involviert und wird durch EIN3, eine wichtige Komponente der Ethylensignalkette, reguliert. Ein Effekt der Überexpression von ERF1 ist die konstitutive Expression einer Reihe von ethylenresponsiven Genen, ein weiterer die phänotypischen Veränderungen der Keimlinge, wie sie im Wildtyp durch die Begasung mit Ethylen induziert wird. Dazu zählen die Verkürzung von Hypokotyl und Wurzel und die Bildung des apikalen Hakens. Letzterer ist in den transgenen Pflanzen, die ERF1 überexprimieren, nicht ausgebildet, was sich molekular auf die nicht vorhandene Transkription von *HOOKLESS1* zurückführen lässt. Dieses Gen ist durch Ethylen induzierbar und wird für die Hakenbildung verantwortlich gemacht (Solano *et al.*, 1998). ERF1 selbst wird sowohl durch Ethylen, als auch Jasmonat transkriptionell induziert, wobei sowohl durch Salizylsäure vermittelte, als auch durch Ethylen und Jasmonat vermittelte Signalwege in der Pflanze funktionell sein müssen. ERF1 reguliert dann wiederum die Transkription verschiedener PR-Gene, die jeweils jedoch nur durch eine der beiden Hormonkaskaden induzierbar sind. Bei ERF1 handelt sich also um eine Schnittstelle der Signaltransduktionswege für Ethylen und Jasmonat (Lorenzo *et al.*, 2003). ERF1 ist, neben Ethylen, auch durch Infektion mit avirulenten oder virulenten Pseudomonaden induzierbar (Onate-Sanchez und Singh, 2002).

Überexpression von ERF1 verleiht den Pflanzen eine erhöhte Resistenz gegen die Infektion mit verschiedenen Pilzen. ERF1 wird durch die Infektion mit *P.s. pv. tomato* nicht beeinflusst, die Überexpression von ERF1 führt im Gegenteil zu einer stärkeren Vermehrung der Bakterien in der Pflanze (Berrocal-Lobo *et al.*, 2002).

AtERF1-5 wurden aus einer Arabidopsisblatt-cDNA-Bibliothek isoliert, die mit den Tabak-ERF1-4-cDNAs durchmustert wurde. Alle fünf Proteine binden *in vitro* an die GCC-Box. Ihre

Transkription ist durch Verwundung induzierbar. AtERF1, 2 und 5 wurden mit Hilfe von transienten Assays aktivierende Eigenschaften zugeordnet (Fujimoto *et al.*, 2000). AtERF3 und AtERF4 haben Repressoreigenschaften, die durch das EAR-Motiv (ERF-associated amphiphilic repression motif) vermittelt werden (Ohta *et al.*, 2001). Die *AtERF1*- und *AtERF2*-Transkription ist durch avirulente Pseudomonaden induzierbar, *AtERF1* ist zusätzlich durch virulente Pseudomonaden und Salizylsäure induzierbar (Onate-Sanchez und Singh, 2002).

2.1.4 Die Rolle der ERF / DREB-Proteine bei abiotischem Stress

Einige Proteine aus der ERF-Familie aus Tabak und *Arabidopsis*, die im vorangegangenen Abschnitt beschrieben wurden, sind auch an der Antwort der Pflanze auf abiotischen Stress, wie hohe Salzkonzentrationen oder Trockenheit beteiligt. Die ebenfalls in die Familie der ERF-Proteine gehörenden DREB-Proteine werden ausschliesslich durch abiotischen Stress induziert.

AtERF1-5 aus *Arabidopsis* binden an die GCC-Box, AtERF1-4 sind durch Abscisinsäure induzierbar. AtERF3 und 4 sind ebenso durch Trockenheit induzierbar, AtERF4 und 5 werden darüberhinaus durch Kälte induziert (Fujimoto *et al.*, 2000).

Tsi1 aus Tabak wurde aus einer cDNA-Bibliothek aus Blättern mittels Differential Display isoliert, bei dem Blätter mit Natriumchlorid behandelt wurden. *Tsi1*-mRNA wird in Blättern und dem Stengel transkribiert. Die Transkription von *Tsi1* wird durch Verwundung induziert, aber auch durch Hormone wie Ethylen (durchgeführt mit Ethephon), Jasmonat und Salizylsäure. Keine Induktion dagegen bewirkt die Behandlung mit Abscisinsäure. *Tsi1* bindet stärker an die GCC-Box als an die DREB-Box (Park *et al.*, 2001).

Die Transkriptionsfaktoren NtERF1-4 aus Tabak werden durch Verwundung auf transkriptioneller Ebene induziert. Die Zunahme der Transkription bleibt auch durch Behandlung der Blätter mit einem Proteinkinase-Inhibitor unbeeinflusst. Die Transkription von *NtERF1-4* ist also unabhängig von Phosphorylierungen (Suzuki *et al.*, 1998). Nishiuchi *et al.* (2002) haben sich mit der Induktion der Tabak-NtERFs in nicht direkt verwundeten Blättern beschäftigt. *NtERF2*, 3 und 4 werden nach Verwundung lokal innerhalb von fünf Minuten induziert, in den systemischen Blättern kommt die Induktion in zwei Phasen 30 Minuten nach der Verwundung und nocheinmal verstärkt nach 9-12 Stunden.

Aus *Arabidopsis* wurden in einem "Hefe-one-Hybrid"-System Gene isoliert, die für Proteine kodieren, die an die DRE-Box binden.

Bei der Durchmusterung einer cDNA-Bibliothek aus unbehandelten Blättern wurde CBF1, ein Homolog von DREB1B, isoliert. CBF1 ist ein Aktivator, der aber weder durch Kälte, noch durch Trockenheit zusätzlich induziert wird (Stockinger *et al.*, 1997).

Bei einem "Hefe-one-Hybrid"-Experiment, bei dem eine *Arabidopsis*-cDNA-Bibliothek aus Rosettenblättern, die Trocken-, bzw. Kältestress ausgesetzt waren, durchmustert wurde, konnten DREB1A und DREB2A isoliert werden. Es handelt sich um zwei Proteine mit einer AP2-Domäne und aktivierenden Eigenschaften. Sie binden beide *in vitro* an die DRE-Box. Nach Trockenstress, Behandlung mit Natriumchlorid oder Abscisinsäure wird DREB2A induziert. DREB1A wird induziert, nachdem die Pflanzen Kältestress hatten. Die Überexpression von DREB1A lässt die Pflanzen Kältestress besser tolerieren, auch Trockenstress vertragen sie dann besser (Liu *et al.*, 1998).

2.2 Zielsetzung der Arbeit

Die beiden in einem "Hefe-one-Hybrid"-Experiment aus einer Tabakblatt-cDNA-Bibliothek isolierten Gene sollen charakterisiert werden. Die Gene kodieren für zwei noch nicht beschriebene ERF-Proteine aus Tabak. Sie sollen hinsichtlich ihrer Funktion im Rahmen der Stressantwort der Pflanze bei Pathogeninfektion näher untersucht werden. Dazu soll bei beiden Proteinen, NtERF5 und NtERF6, das Expressionsmusters in verschiedenen Geweben der Tabakpflanze beschrieben werden. Für die funktionelle Einordnung der beiden Transkriptionsfaktoren wird ihre Induzierbarkeit sowohl durch verschiedene Signalmoleküle aus der Signalkette der Pathogenabwehr, als auch durch ausgewählte Pathogene selbst untersucht.

In transgenen Pflanzen, die NtERF5, bzw. NtERF6 überexprimieren, soll untersucht werden, ob diese Pflanzen eine erhöhte Toleranz gegenüber Pathogeninfektion aufweisen.

Der Nachweis der DNA-Bindung soll mit rekombinanten Proteinen mit Hilfe von *in vitro* Bindestudien im EMSA erfolgen.

In *Arabidopsis* wird in einem genomweiten Ansatz die Induktion möglichst vieler ERF-Proteine im Rahmen der Pathogenabwehr überprüft. Dafür soll mit Macro-Array-Filtern gearbeitet werden, für deren Zusammenstellung nichtkonservierte Bereiche von 30 ERF-Genen beigesteuert werden.

In weiteren Versuchen soll jeweils mit den zu NtERF5 und NtERF6 homologen Proteinen gearbeitet werden. Zur Aufklärung der Funktion der homologen Proteine bei der Pathogenabwehr wird einerseits mit Pflanzen gearbeitet, die durch RNAi nur sehr geringe

Mengen Protein exprimieren, andererseits stehen Pflanzen zur Verfügung, die in dem fraglichen Gen eine T-DNA-Insertion tragen und kein funktionelles Protein exprimieren können.

Schliesslich soll die Frage weiter geklärt werden, ob die grosse Anzahl von für ERF-Proteine kodierender Gene eine Redundanz in der Funktion der Proteine widerspiegelt.

3 Material

3.1 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller/Lieferant
Autoklav	3870 ELV	Tuttnauer
Automatische Pipetten	2, 20, 200,1000	Gilson
Biofuge	pico	Heraeus
Bioimager (Phosphoimager)	BAS-1000	Fuji
Digitalkamera	Coolpix	Nikon
Elektroporationsapparatur	Gene pulser® II Pulse Controller Plus	BioRad
Elektroelutionsapparatur	Elutrap (Schleicher und Schuell)	Werkstatt der Universität
Geldokumentationsanlage		MWG Biotech
Gelelektrophoresekammer		Werkstatt der Universität
Gelelektrophoresekammer(PAGE) I	V 15-17	GIBCO BRL
Gelelektrophoresekammer(PAGE) II	Joey™ #JGC-4	AGS
Geltrockner	Phero-Temp	Biotec-Fischer
Gefriertruhe -80 °C	C54285	New Brunswick Scientific
Handmonitor	Contamat	Eberline
Heizblock		Boekel Scientific
Heizrührer	RCT basic	IKA Labortechnik
Hybridisierungsöfen		Bachhofer
Hybridisierungswasserbad	Belly Dancer	Sorvall
Inkubationsschränke		WTC binder; Memmert
Kühlzentrifuge	Sorvall RC 5B Plus	DuPont
Netzgerät	E 323	Benedikt Heinemann
Netzgerät	EC 105	EC Apparatus Corporation
PCR-Gerät, MiniCycler™	PTC-150	MJ Research, USA
Peristaltikpumpe	Cyclo 1	Roth
pH-Meter	HI 9321	Hanna Instruments
Photometer	Unikon 720 LC	Kontron
RNA-/DNA-Calculator	GeneQuant II	Pharmacia
Scanner	ScanJet 4c	Hewlett Packard
Sequenzanalyseanlage	ABI PRISM 310	Perkin-Elmer
Speed vac Konzentrator	SK 100 H	Sarvant
Spektralphotometer	Novaspek Biochrom	LKB
Spektralphotometer für Microtiterplatten	MRX	Dynex
Sterilbank	Microflow Laminar W.	Nunc
Szintillationsmessgerät		raytest Isotopenmessgeräte GmbH

Gerät	Modell	Hersteller/Lieferant
Tischzentrifuge	Biofuge pico	Heraeus Christ
Tischzentrifuge, gekühlt	5403	Eppendorf
Ultraschallgerät	Soniprep 150	Scientific Instruments
Ultrazentrifuge	Centrikon T-1065	Kontron
Rotoren	TFT 30.58 TFT 65.13	
UV-Transilluminator	FLX-20 M	Vilber Lourmat
Vortex	L46	Labinco BV
Wasseraufbereitungsanlage	Option 4, Maxima	ELGA
Zählkammer	Fuchs-Rosenthal	Brand
Zentrifuge	UJ3S	Christ

3.2 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller/Lieferant
Agar Bacteriological	Life Technologies
Agarose SeaKem	Biozym
Ampicillin	AGS
Ameisensäure	Roth
Antipain	Serva
Aprotinin	Sigma
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Biometra
Bactopeptone	Difco
BASTA	Hoechst
6-Benzylaminopurin (6-BAP)	Sigma
β -Mercaptoethanol	Roth
Bovine-Serum-Albumin (BSA)	Serva
Bromphenolblau	Roth
Cefotaxim	Duchefa
Coomassie Brillinat Blue G-250	Bio-Rad
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Roth
DNTPs	MBI, Roth
α - ³² P dATP; 800 Ci / mmol	Hartmann Analytic
α - ³² P dCTP; 800 Ci / mmol	Hartmann Analytic
γ - ³² P dATP; 800 Ci / mmol	Hartmann Analytic
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Ethephon	Sigma
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	AppliChem
Ethidiumbromid (Etbr)	Roth
Formaldehyd	Roth
Formamid	Fluka
Gamborg's B5 Medium	Duchefa
Glukose	Roth
Glyzerin	Roth
HEPES	Roth
Hygromycin	Duchefa

Imidazol	Sigma
Isopropylthiogalactosid (IPTG)	BioTech Trade
Kanamycin	Sigma
Kinetin	Sigma
Leupeptin	Serva
Linsmeier und Skoog Medium	Duchefa
Magermilchpulver	Glücksklee
2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure (MES)	Sigma
Methylumbelliferon (4-MU)	Sigma
Methylumbelliferyl- β -D-Glucoronid (MUG)	Duchefa
MOPS	Sigma
Murashige und Skoog Medium	Duchefa
α -Naphthalinessigsäure (NAA)	Sigma
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Natriumazid	Sigma
Natriumhypochlorid	Roth
Nonidet P-40	Fluka
Organische Lösungsmittel (Alkohole etc.)	Merck; Roth
Pepstatin A	BIOMOL
Phenol	AppliChem
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Fluka
PIPES	Roth
Polydesoxyinosin-desoxycytidylsäure (PolydI/dC)	Sigma
Ponceau	Sigma
Rifampicin	Duchefa
Saccharose	Duchefa
Salze für Puffer etc.	AppliChem; Merck
Salzsäure (HCl)	Merck
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Select Agar	Life Technologies
Select Yeast Extract (Hefeextrakt)	GIBCO BRL
Siliciumcarbid	Sigma
SilwetL-77	Lehle
Spermin Tetrahydrochlorid	Sigma
Spermidin	Sigma
TEMED	BIORAD, Roth
Tris	Roth
Triton X-100	Roth
Trypton	Oxoid
Tween-20	Roth
X-Gal	BioTechTrade
X-Gluc	Roth
Xylencyanol FF	Roth
Yeast Nitogen Base	Gibco

3.3 Verbrauchsmittel

Produkt	Hersteller/Lieferant
Bradford-Reagenz	Roth
Dialysemembranen	Millipore
Elektroporationsküvetten	BioRad
3MM-Fließpapier	Whatman
Gläser für Pflanzensterilkultur	Weck
Glasmaterialien: Flaschen, Pasteurpipetten, Erlenmeyerkolben	Brand, Schott
Glaskugeln (2 mm Durchmesser)	Roth
Glass-Beads	Sigma
Kunststoff-Einwegmaterial	Biozym; Eppendorf; Greiner; Roth
Micro Spin TM G25 Column	Amersham
Miracloth	Calbiochem
NiNTA [®] - Resin	Qiagen
Nylon-Membran Nytran [®] N ⁺	Schleicher und Schuell
Parafilm M	American National Can TM
Polyacrylamid (PAA)-Mix: 30 % PAA + Bisacrylamid (37,5 : 1)	Roth
Polyacrylamid (PAA)-Mix: 40 % PAA + Bisacrylamid (19 : 1)	Roth
PVDF-Membran Immobilon TM -P	Millipore
Röntgenfilm Entwickler LX24	Kodak
Röntgenfilm Fixierer AL4	Kodak
Röntgenfilme Cronex 4, Cronex 10T	DuPont
Sephadex G50	Pharmacia

3.4 Kits

Kit	Hersteller/Lieferant
BigDye TM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin-Elmer
Enhanced Chemiluminescence TM Kit (ECL)	AmershamPharmacia
Enhanced Chemiluminescence TM Plus Kit (ECL ⁺)	AmershamPharmacia
Megaprime TM DNA Labelling Systems	AmershamPharmacia
pGEM [®] -T Vector Systems	Promega
Qiagen Plasmid-Preparations Kit (Midi/Maxi)	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Rneasy Plant Mini Kit	Qiagen
RNA Extraction Kit	Invitex
Smart-RACE cDNA Amplification Kit	Clontech
Universal Genome Walker Kit	Clontech
Rabbit Reticulocyte Kit	Promega
Gateway Cloning Kit	Invitrogen

3.5 Grössenstandards

DNA-Standards	Hersteller/Lieferant
RNA Größen-Standard Low Range	GIBCO BRL Life Technol.
λ DNA <i>Pst</i> I gespalten	Laborintern
pUC19-DNA <i>Hpa</i> II gespalten	Laborintern
DNA Größen-Standard Marker X	Boehringer
Protein-Standards	Hersteller/Lieferant
SeeBlue™ Pre-Stained Standards	Novex
BenchMark™ Prestained Protein Ladder	GibcoBRL
Mark12™ Wide Range Protein Standard	Novex

3.6 Proteine

3.6.1 Enzyme

Enzyme	Hersteller/Lieferant
Alkalische Phosphatase	Boehringer
T4-DNA-Ligase	Boehringer
Klenow-Polymerase	MBI-Fermentas
Klenow-Polymerase exo^-	MBI-Fermentas
Restriktionsenzyme	MBI-Fermentas, Gibco BRL, NEB
Ampli <i>Taq</i> ® DNA Polymerase, FS	ABI Prism™
Cellulase Onozuka R-10	Serva
Lysozym	Serva
Lyticase	Sigma
Macerocym R-10	Serva
Restriktionsenzyme	Pharmacia, Boehringer, NEB
RNase A (DNase frei)	Qiagen
V8-Protease	Serva

3.6.2 Antikörper

Antikörper	Hersteller
α -His, polyklonal aus Kaninchen	BioScience
α -rabbit IgG, polyklonal aus Esel, Meerrettichperoxidase gekoppelt	Amersham
α -PR1a, aus Maus	H. Jokusch, Universität Bielfeld
α -mouse IgG, polyklonal aus Esel, Meerrettichperoxidase gekoppelt	Amersham

3.7 Nukleinsäuren

3.7.1 Primer

Die verwendeten Primer wurden nach Auftragsynthese käuflich von der Firma NAPS (Göttingen), Roth (Karlsruhe) oder MWG (Ebersberg) bezogen.

Primer	Sequenz (5' @ 3')
pM13 universal	AGG GTT TTC CCA GTC ACG ACG TT
pM13 reverse	GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG
pHISi-1	CGT TTA TCT TGC CTG CTC

pAD	TAC CAC TAC AAT GGA TG
pER1	GGT CAA GAA TTA GAA GAG G
pER2	GAT GGA TTG TCT CCT GCT G
pER3	CTC TTC TAA TAA CTC AGC ACC
pER4	GAA TCT CTT ATT TCT GCT GC
pER6	ATT TGC CCC TTC AGC TGG TA
Nt5RACE	GAC CAA GGA CCT CTC ATC GAT AAT GCA GCT TGA TC
pGADlow	GTT TTT CAG TAT CTA CGA TTC ATA GAT CTT G
pGADlow2	CGA TGC ACA GTT GAA GTG AAC
pER30-1	GAT GTT CAA GAC GAT GTC AAG
pER30-2	CCA GAG CTT ATG ATG TTG AG
pER30-3	CCT ATA CTG ATT CTT CCT C
NtERF6BamHI F	CCC GGA TCC AGC ATG TGT GGT GGT GCT
BamHI NtERF6 F	CGG ATC CAA CCA TGT GTG GTG GTG CTA TAA T
NtERF6 HindIII R	CAA GCT TAC AAT CAA TCA AAG GAC C
MeJa F	ATA ATT ACA TGG AGT GGT TG
MeJa R	CCA AGT AAA CAT TCA TTA AC
AP2-31trans	AAC AGC TCT CGT TCC ATA AGA GTG ATT C
EcoRI-AtERF1F	CCG AAT TCA TGG ATC CAT TTT TAA TTC
Sall-AtERF1R	GCC CAG CTG CCA AGT CCC ACT ATT TTC
AP2-21RT	CAC CCT CAA GAA TCG CCG CC
AP2-31RT	CTT ATT GCC ACA ACA AGA AGA GAT AAC
CHSAback	CAC TTA CTT ACA CTT GCC TTG GAG
CHSAfront	CCA ATT AAG ATA AAA CGT TGA ATG
NtPRIIbGSP1	ATT GTA GAG ACC AGA GTT GCA TGT GTC AAT C
NtPRIIbGSP2	CTT TGC TGG TTA GGA GAA GCA AGA ATA TTG
NtPRIIbGSP3	CAA AAT TGA GTG AAA AAT ACC GAC CAG CC
NtPRIIbGSP4	GGG CCG TCG ACC ACG CCG TGC CCT ATA G
NtPRIIbGSP5	GGT TTC ACA CGC TCA AAA TTG AGT GAA AAA TAC CG

REGIA Array-Primer	Sequenz (5'® 3')
CAB41085 F	ACG AAG ATC AAG ATC GGA AAG TAC C
CAB41085 R	ACC TTG GTC CTC TTC TGC TCT TCT
023104 F	GAG AAG AAC CCT AGC GTC GT
023104 R	CGT TGT CAA GGT ATG CCA TCA G
AAF16756 F	TTC GTG GAG CTA AAG CCA
AAF16756 R	TTC TCA GGT GGA GGA GGG
AAF 02863 F (AP2-21)	GAG GAG AAA CAC CAA GTG AGC AAC
AAF 02863 R	CCA TTG TCC TGA GTC GTT ACA GCA
Q9ZNR2 F	GAG TTC AAG AGT CGC TTT CGG A
Q9ZNR2 R	CCC AAA AGC TCC TCA AGG TAC TGT
AAF 27133 F	AGC TAC ACC GTT GAT GGT CAC C
AAF 27133 R	CCG CTT CAC ACC ACC TTC TTT G
CAB 16766 F	AGC TTT TAG CCG GAG TGA CG
CAB 16766 R	ATC GTC ATC TGA AGT TTC CG
AAD 20668 F (AP2-31)	GTG GAA GTG GTT AGA GAG TC

AAD 20668 R	TCA ACA TGA GCT CAT AAG AA
022259 F	CGT GTC TGG CTT GGC ACA
022259 R	ATT GGA GTC TTG ATA GCT
049515 F	AAC GTC TCC AAA TAA TCA CTT CC
049515 R	TGG ATT GCA ACC CAA ACT ACT
CAA 85734 F	TTA TAC TCC TCC GCC GTC A
CAA 85734 R	CAA GGA ACG ATT CCA AGC TC
023143 F	CAT CCT TCT ACT CCT CCG CCA T
023143 R	CGA CGC AAT GAC ATC ATC AAG C
Q9ZWM9 F	AGT TAG AGC AGA GTA AAC GGC G
Q9ZWM9 R	CGC ATC TAA ATC TGA CCC GGA T
080338 F	GAA TCC GAC TAC GCT TTG TTG G
080338 R	TCT CCG TAA CCG GTA TCG CT
080340 F	AGA AGG TCC CTA CCG GTT TC
080340 R	CGA TGG AGG AGG CAA ATT AAG
CAB 36718 F	CAA CAG AAC CGA ATT CGT CG
CAB 36718 R	TGA TTT TCC CGC CAC CTT C
080341 F	AGA AAC ATC TAC TCG ACG AGG C
080341 R	GCT GCG AAT TGA ATC CAC TC
023591 F	TGG CTA CAC CAA ACG AAG
023591 R	TCT GCT GCT ACA ACC GGT AC
023110 F	TTC TGG AAG ACG GCG ATT
023110 R	GGA ACC TCC ACA CTT TAC CGT T
AAF 09055 F	AAA AGT CTC TGG GAG GAG CA
AAF 09055 R	GTC TGT GTA TCG TTC CAG CTG T
023108 F	AAA TGT TGG AAC TCA GAC
023108 R	CCC ATG TAT AGT CAT AAC
080387 F	TGG CTA CAC CAA ACG AAG
080387 R	TAG GAT TTC CGG TTG CGA
P93822 F	AAG AGA TTC GAG GAA GCA CG
P93822 R	TTG CCT CTT GCC CAT GTT G
CAA 85734 F	GAG GGA AGC TGC CAT GGC T
CAA 85734 R	GGA TGG TGC AAT CTG CTG
AAD 31052 F	GGC AGC GCA GAG GAT CTA TA
AAD 31052 R	TTC CCG TAG CGA TCT AGT TTC
004445 F	ATC ACC ACC GTA TTT TCT CGT C
004445 R	CGA CTG TTG GTT GCT CTT TGG
Q9ZWA2 F	TAT GGG ATT TCT TCG GCG
Q9ZWA2 R	TTA GGG ACT TGC GTT GAG G
023107 F	GAG TGA CCA GAA GGT CCC TA
023107 R	CGA CCG ATG ACG AAT CAG AG
AAF 16760 F	ATC CCT ATG CCA CAG GTT CA
AAF 16760 R	CGC CAT TGT TAG ACT CTC AAG
023105 F	TTA TAC TCC TCC GCC GTC A
023105 R	CTC ATA CGA CGC AAT GAC AT
080339 F	CCA AGT CGA TCC GTT TAT GG
080339 R	TGA AGA TCA TCA GCG CCA
AAC 69127 F	GTC ACA AGG CCA AGC TTA
AAC 69127 R	TTC GTC GTT TGT GGA TAC

BAA 95735 F	GGT GCT CGT GTT TGG CTT
BAA 95735 R	TAG CGG TTT GCG TCG TTA
BAB 09791 F	ATT GAG GAG AAA CCG GTT ATT ATG
BAB 09791 R	CGT TGA ACC CAT ATC TTT GAT AC
BAB 08939 F	ATT TAA TGA TCA AAA CGA AAA TTT
BAB 08939 R	CCT TGA TTT CGA TCT CGG ATC
AAC 62875 F	TCC TCC TAG TCC GAC GAC TG
AAC 62875 R	CAT CAA CAT CCC ATG AGC TG
CAB71093 F	CCA ACG CCG GTT ATC GAT C
CAB 71093 R	CAT CCC ATG GAG AAG ACT CG

REGIA "Y2H"-Primer mit Gateway- Anhang	Sequenz (5'@ 3')
REGIAPrimerattB 1	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTG CCA ATT CCA GCT GAC CAC CAT G
REGIAPrimerattB 2	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG CGA TCC CCG GGA ATT GCC ATG
AP2-19 GWF	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CAT GGA TCA AGG AGG TCG
AP2-19 GWR	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT TAT TGC CTC TTG CCC ATG
AP2-20 GWF	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CAT GGA ACG TAT AGA GTC TTA
AP2-20 GWR	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC TAG CGG TTT GCG TCG TTA C
AP2-31 GWF	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CAT GTA TTC ATC TCC AAG TTC
AP2-31 GWR	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT CAA CAT GAG CTC ATA AGA AG
AP2-3 GWF	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CAT GTG TGG AGG AGC TAT ATC
AP2-3 GWR	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT CAA AAG TCT CCT TCC AG
AP2-7 GWF	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CAT GTG TGG GGG AGC TAT CAT TTC
AP2-7 GWR	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT TAA TTG GAG TCT TGA TAG C
AP2-34 GWF	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CAT GAC GGC GGA TTC TCA ATC TG
AP2-34 GWR	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT TAT AAA ACC AAT AAA CGA TCG
AP2-4 GWF	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CAT GTG TGG CGG TGC TAT TAT TTC
AP2-4 GWR	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT TAC TCA TAC GAC GCA ATG AC
AP2-33 GWF	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CAT GCA TAG CGG GAA GAG ACC TC

AP2-33 GWR	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT TAT TTT CGT CGT TTG TG
AP2-1 GWF	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CAT GTA CCG ACA GTG CAA TAT AG
AP2-1 GWR	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT TAT GAA ACC AAT AAC TCA TC
AP2-14 GWF	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CAT GAG GAG AGG AAG AGG CTC TTC
AP2-14 GWR	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT TAG AGA CGT AGA TCG GTA C
AP2-2 GWF	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CAT GGC CAA GAT GGG CTT GAA AC
AP2-2 GWR	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT CAG GCC TGT TCC GAT GGA G
AP2-6 GWF	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CAT GGC GAC TCC TAA CGA AGT ATC
AP2-6 GWR	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT CAA ACA ACG GTC AAC TGG G
AP2-36 F	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CAT GGC TAT TAT CAG TAC
AP2-36 R	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTA AGC CAA AGC GG
AP2-16 F	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CAT GTG TGG CGG TGC TA
AP2-16 R	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC TCA TAC GAC GC
AP2-41 F	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CAT GGA GAC GGC GAC TG
AP2-41 R	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTA TCG TCA TCT GAA G
AP2-7 F	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CAT GTG TGG GGG AGC TAT C
AP2-7 R	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTA TTG GAG TCT TG
Mit folgenden Gateway-Primern ist auch im 3'-Bereich eine Fusion im Leserahmen möglich	
AP2-5 F	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CAT GGA ATC GAG TAG CGT TG
AP2-5 R	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC GAG GCG TGA AAG ATG CG
AP2-9 F	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CAT GGA TTC TAG TTG CAT AG
AP2-9 R	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC ATG GAT TCT AGT TGC ATA G
AP2-13 F	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CAT GGA AAA CAG CTA CAC C

AP2-13 R	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC TTC CTA GAC AAC AAC CC
AP2-15 F	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CAT GGA AAA AGC CTT GAG A
AP2-15 R	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT CCC CAC GAT CTT CGG C
AP2-18 F	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CAT GAC CAC AGA AAA AGA GAA
AP2-18 R	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG GGA CTT GCG TTG AGG TC
AP2-35 F	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CAT GGA AAA AGC CTT GAG A
AP2-35 R	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT CCC CAC GAT CTT CGG C
AP2-110 F	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CAT GGA TAA TTC AGA AAA TG
AP2-110 R	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT CTC CAC CGC CGT TTA ATT C
AP2-111 F	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CAT GGA CGA ATA TAT TGA TTT C
AP2-111 R	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTA GCA ACT AAT AGA TCT GAT
AP2-112 F	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CAT GAA AAG CCG AGT GAG AAA
AP2-112 R	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC TTA TCC AAC AAA TGA TC
AP2-113 F	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CAT GGA GAG ACG AAC GAG AC
AP2-113 R	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTA TCG AAA GAG TGA TG

REGIA "Y2H" Primer mit Rekombinations- überhang in Hefe	Sequenz (5'® 3')
cAAF 02863 F	AAT TCC AGC TGA CCA CCA TGT GTG GAG GAG CTA TAA TAT CCG
cAAF 02863 R	GAT CCC CGG GAA TTG CCA TGT CAG AAG ACT CCT CCA ATC ATG G
cCAB 16766 F	AAT TCC AGC TGA CCA CCA TGG AGA CGG CGA CTG AAG TGG
cCAB 16766 R	GAT CCC CGG GAA TTG CCA TGC TAA TCG TCA TCT GAA GTT TCC
cQ9ZWM9 F	AAT TCC AGC TGA CCA CCA TGG AAT CGA GTA GCG TTG ATG AGA G
cQ9ZWM9 R	GAT CCC CGG GAA TTG CCA TGT TAC GAG GCG TGA AAG ATG CGT TGC
cAAD 20668 F	AAT TCC AGC TGA CCA CCA TGT ATT CAT CTC CAA GTT CTT GGA GC

cAAD 20668 R	GAT CCC CGG GAA TTG CCA TGT CAA CAT GAG CTC ATA AGA AGT TGT TC
cCAB 36718 F	AAT TCC AGC TGA CCA CCA TGC ATT ATC CTA ACA ACA GAA CCG
cCAB 36718 R	GAT CCC CGG GAA TTG CCA TGT CAC TGG AAC ATA TCA GCA ATT GTA TTT
cAAF 27133 F	ATG GAA AAC AGC TAC ACC GTT GAT GGT CAC
cAAF 27133 R	GAT CCC CGG GAA TTG CCA TGT CAC TTC CTA GAC AAC AAC CCT AAA CTC
c080387 F	AAT TCC AGC TGA CCA CCA TGG CTA CAC CAA ACG AAG TAT CAG CTC
c080387 R	GAT CCC CGG GAA TTG CCA TGT CAA ACA ACG GTC AAT TGT GGA TAA C
c022259 F	AAT TCC AGC TGA CCA CCA TGT GTG GGG GAG CTA TCA TTT CTG ATT TC
c022259 R	GAT CCC CGG GAA TTG CCA TGT TAA TTG GAG TCT TGA TAG CTC CAT AAA TTT C
cAAD 31052 F	AAT TCC AGC TGA CCA CCA TGG AAA AAG CCT TGA GAA ACT TC
cAAD 31052 R	GAT CCC CGG GAA TTG CCA TGC TAT CCC CAC GAT CTT CGG CAA G
cP3822 F	AAT TCC AGC TGA CCA CCA TGG ATC AAG GAG GTC GTA GCA GTG
cP3822 R	GAT CCC CGG GAA TTG CCA TGT TAT TGC CTC TTG CCC ATG TTG
cAAF 16756 F	AAT TCC AGC TGA CCA CCA TGA TGT CCT CAC AAA CTT CTT CAC
cAAF 16756 R	GAT CCC CGG GAA TTG CCA TGT CAG TTC TCA GGT GGA GGA GGG
cAP2-33 F	AAT TCC AGC TGA CCA CCA TGC ATA GCG GGA AGA GAC CTC TA
cAP2-33 R	GAT CCC CGG GAA TTG CCA TGT TAT TTT CGT CGT TTG TGG ATA CT

REGIA "Y2H"-Primer mit Schnittstellen	
cAP2-20 F	CCC GGG ATG GAA CGT ATA GAG TCT TAT AAC
cAP2-20 R	GTC GAC CTA GCG GTT TGC GTC GTT ACA ATT
cAP2-19 F	CCC GGG ATG GAT CAA GGA GGT CGT AGC AGT
cAP2-19 R	GTC GAC TTA TTG CCT CTT GCC CAT GTT GAT
cAP2-31 F	CCC GGG ATG TAT TCA TCT CCA AGT TCT TGG
cAP2-31 R	GTC GAC TCA ACA TGA GCT CAT AAG AAG TTG
cAP2-4 F	CCC GGG ATG TGT GGC GGT GCT ATT ATT TCC
cAP2-4 R	GTC GAC TTA CTC ATA CGA CGC AAT GAC ATC
cAP2-3 F	CCC GGG ATG TGT GGA GGA GCT ATA ATC TCC
cAP2-3 R	GTC GAC TCA AAA GTC TCC TTC CAG CAT G

Die Schmelztemperatur wird nach Bolton und McCarthy, 1962 berechnet:

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

T_m = Schmelztemperatur; n = Anzahl der Basen

3.7.2 Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz (5'® 3')
H-Box F	TAG ATA CAA TTC CTA CCA TGT ATC AT
H-Box R	C TAT GTT AAG GAT GGT ACA TAG TAA T
C-Box F	TAG ATA CAA TTG ACG TCA TGT ATC AT
C-Box R	C TAT GTT AAG TGC AGT ACA TAG TAA T
K-Box F	TAG ATA CAA TTA AGT AAA TGT ATC AT
K-Box R	C TAT GTT AAT TCA TTT ACA TAG TAA T
NF-kappaB-Box	TAG ATA CAA TTG GGA CTT TTC CAT GTA TCA T
NF-kappaB-Box	C TAT GTT AAC CCT GAT AAG GTA CAT AGT AAT
GCCGCC F	ATG AGT TAA CGC AGA CAT AGC CGC CAT TT
GCCGCC R	AAA TGG CGG CTA TGT CTG CGT TAA CTC AT
TCCTCC F	ATG AGT TAA CGC AGA CAT ATC CTC CAT TT
TCCTCC R	AAA TGG AGG ATA TGT CTG CGT TAA CTC AT
DREB F	ATG AGT TAA CGC AGA CAT ATA CCG ACA TAT TT
DREB R	AAA TAT GTC GGT ATA TGT CTG CGT TAA CTC AT

3.7.3 Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pDEST22	GAL4 ₍₇₆₈₋₈₈₁₎ AD, TRP1, ARS4/CEN6, pUC ori, Amp ^r , attR1, Cm ^r , ccdB, attR2	Invitrogen, 2001b
pDEST32	GAL4 ₍₁₋₁₄₇₎ DB, LEU1, ARS4/CEN6, pUC ori, CYH2 ^S , Gm ^r , attR1, Cm ^r , ccdB, attR2	Invitrogen, 2001b
pDEST 17	pUC ori, Amp ^r , attR1, Cm ^r , ccdB, attR2	Invitrogen, 2001
pDONR201	pUC ori, Km ^r , attL1, Cm ^r , ccdB, attL2	Invitrogen, 2001
pDONR207	pUC ori, Gm ^r , attL1, Cm ^r , ccdB, attL2	Invitrogen, 2001
pFGC5941gw	pMas2' Promotor, BAR, p35S promoter, ChsA intron, attR1, Cm ^r , ccdB, attR2; Km ^r ; pBR322 ori	http://ag.arizona.edu/chromatin/fgc5941.html
pBluescriptIISK pBluescriptIISK	Sequenziervektor mit M13universal, reversePrimerbindestellen; Amp ^r	Clontech
pET28a(+)	Expressionsvektor mit T7-Promoter und lac-Operator; Kan ^r	Novagen

3.7.4 Erstellte Plasmide

3.7.4.1 pBINHyg-NtERF5

Öffnen des Plasmids pGAD424-NtERF5 mit *EcoRI*. Ligation des Fragments von NtERF5 in den ebenfalls mit *EcoRI* geöffneten Vektor pBluescriptIISK. Öffnen des Vektors pBluescriptSKII-NtERF5 mit *AccI* und *XbaI*. Ligation des Fragments NtERF5 in den Vektor pBINHyg.

3.7.4.2 pBINHyg-NtERF6

Amplifizierung von NtERF6 aus pGAD424-NtERF6 mit den Primern *XbaI* NtERF6 F und NtERF6 *SalI* R. Ligation in den Vektor pGEM-T. Öffnen des Plasmides pGEM-T-NtERF6 mit *XbaI* und *SalI* und Ligation des Fragments mit NtERF6 in den Vektor pBINHyg.

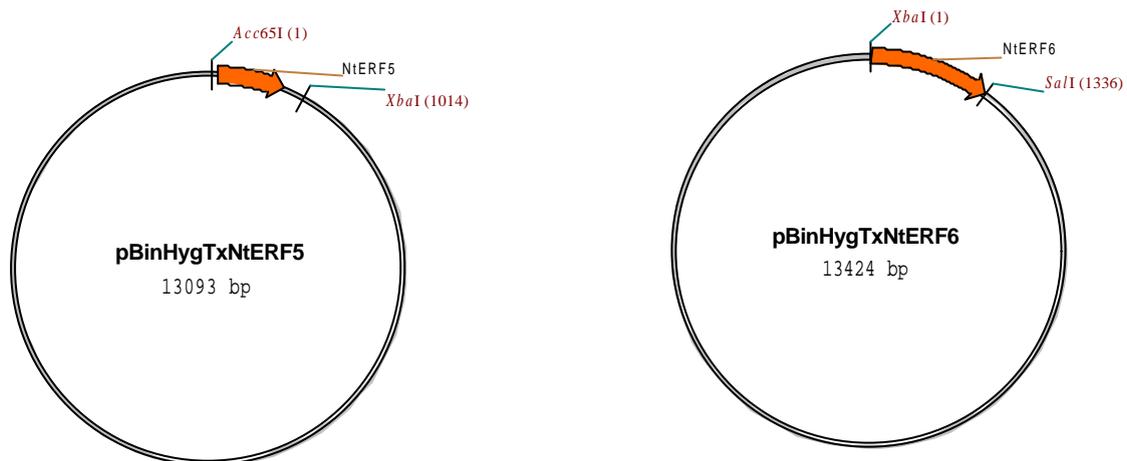


Abb. 3.1: Schema der Plasmide pBINHygTx-NtERF5 und pBINHygTx-NtERF6, die bei der Transformation von Tabakpflanzen für die Überexpression von NtERF5, bzw. NtERF6 verwendet wurden. Markiert sind die Restriktionsstellen, mit denen NtERF5, bzw. NtERF6 in das Plasmid inseriert wurden.

3.7.4.3 pGEM-T-NtERF6

Amplifizierung von NtERF6 aus pGAD424-NtERF6 mit den Primern *XbaI* NtERF6 F und NtERF6 *SalI* R. Ligation des PCR-Fragmentes in den Vektor pGEM-T.

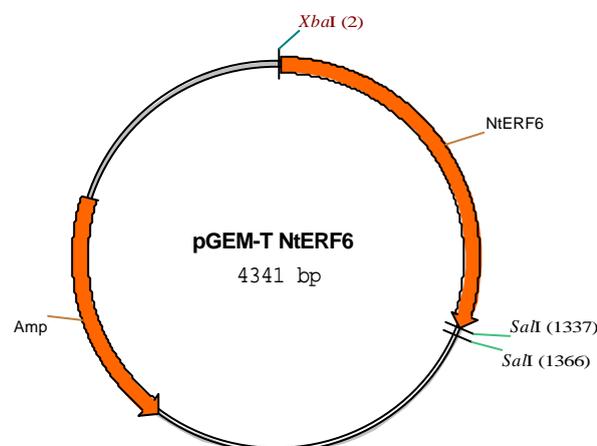


Abb. 3.2: Schema des Plasmids pGEM-T-NtERF6, das als intermediärer Vektor zur Klonierung von *NtERF6* in weitere Plasmide verwendet wurde.

3.7.4.4 pBluescriptIISK-NtERF5

Öffnen des Plasmids pGAD424-NtERF5 mit *EcoRI*. Ligation des Fragments von NtERF5 in den Vektor pBluescriptIISK.

3.7.4.5 pBluescriptIIS-NtERF6

Amplifizierung von NtERF6 aus pGAD424-NtERF6 mit den Primern *BamHI* NtERF6 F und NtERF6 *HindIII* R. Verdau des PCR-Produktes mit entsprechenden Enzymen. Ligation des Fragments in pBluescriptIIS.

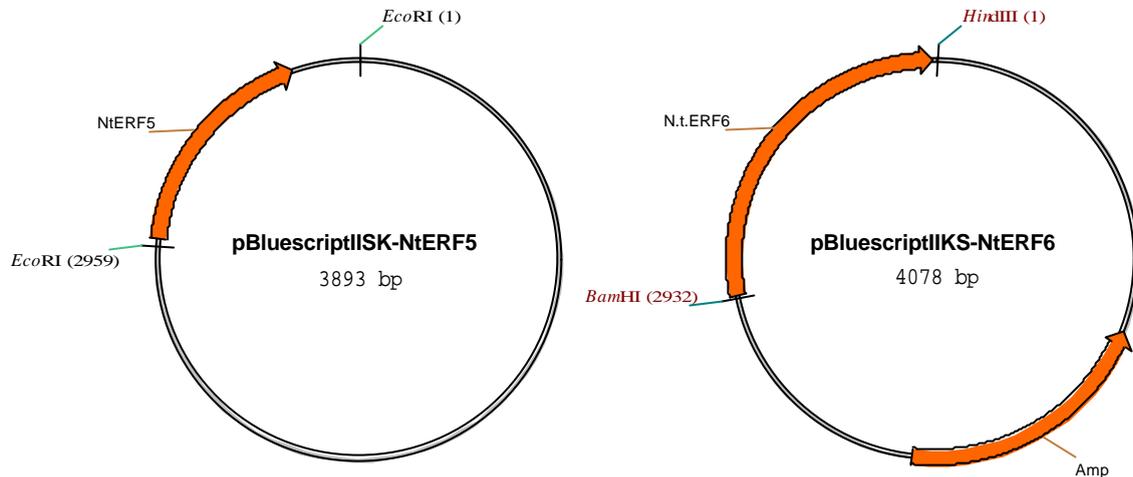


Abb. 3.3: Schema der beiden Plasmide pBluescriptIISK-NtERF5 und pBluescriptIIS-NtERF6, die bei der *in vitro* Transkription verwendet wurden. Markiert sind die Restriktionsstellen, mit denen NtERF5, bzw. NtERF6 in das Plasmid inseriert wurden.

3.7.4.6 pDEST17-AtERF1

Klonierung mit dem Gatewayssystem. Amplifikation von AtERF1 aus einer cDNA Bank mit den Primern AP2-34 GWF und AP2-34 GWR. Das PCR Produkt wird dann in der BP Reaktion in den Gateway Eingangsvektor pDONR201 gesetzt. Die Ligation in den Zielvektor pDEST17 erfolgt in der LR Reaktion.

3.7.4.7 pET28a-NtERF5

Das Fragment mit NtERF5 wurde aus dem Vektor pBluescriptIISK-NtERF5 mit *EcoRI* ausgeschnitten und in den ebenso geöffneten Vektor pET28a gesetzt.

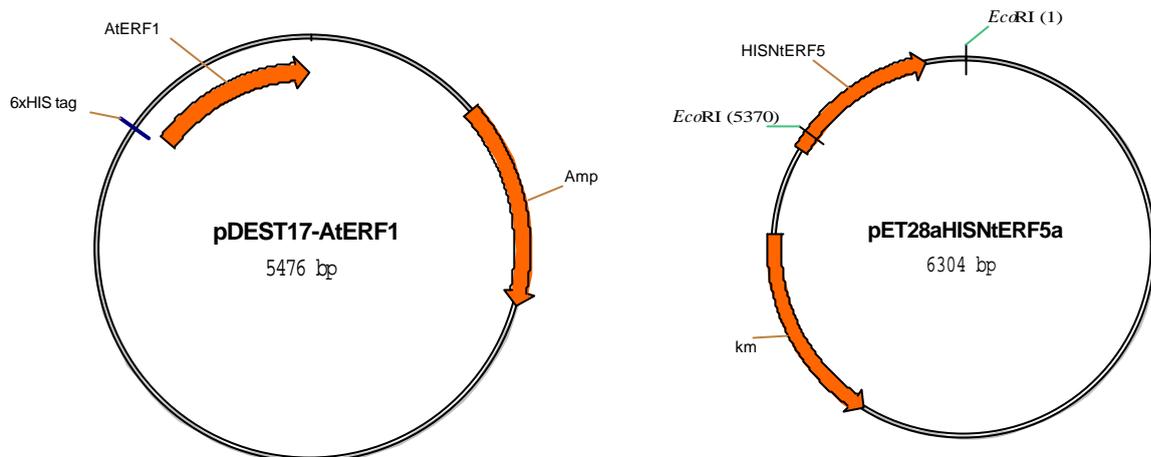


Abb. 3.4: Schematische Darstellung von pDEST17-AtERF1 und pET28a-HISNtERF5, die bei der Expression der rekombinanten Proteine verwendet wurden. Markiert sind die Restriktionsstellen, mit denen NtERF5 in das Plasmid inseriert wurde.

3.7.5 Fragmente für die Northern Blot Hybridisierung

Fragment	Plasmid und Schnittstellen	Größe (bp)	Herkunft
NtERF5	PBluescriptSKII; <i>EcoRI</i>	1000	diese Arbeit
NtERF6	PBluescriptKSII; <i>HindIII</i> , <i>XhoI</i>	600	diese Arbeit
PR1a	<i>EcoRI</i> , <i>BamHI</i>	531	Cutt <i>et al.</i> , 1988
PR3	<i>PstI</i>	1000	Lawton <i>et al.</i> , 1992
TMV	pSOSMP30; <i>Sall</i> , <i>BamHI</i>	800	Hofius, unveröffentlicht
ACC Oxidase	PCR Produkt von Klon 440 aus PR Gen ARRAY, mit Primern M13universal und M13reverse	850	
HMGR	<i>EcoRI</i>	1000	Klessig, D.F.
SAR8.2	<i>EcoRI</i>		Herbers <i>et al.</i> , 1995
AP2-21	PCR Produkt von pGEM-T/AP2-21 aus REGIA ARRAY mit Primern M13universal und M13reverse	350	diese Arbeit
AP2-31	PCR Produkt von pGEM-T/AP2-31 aus REGIA ARRAY mit Primern M13universal und M13reverse	350	diese Arbeit

3.8 Organismen

3.8.1 Mikroorganismen

Stamm	Eigenschaften	Herkunft
<i>E. coli</i> S17.1	pro, res ⁻ , mod ⁺	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ , gyrA96(Nal ^r), recA1, relA1, thi-1, hsd'R17 (rk-mk ⁺), glnV44, deoR, D (lacZY A-argF) U169 [p80dD(lacZ)M15	Hanahan <i>et al.</i> , 1983
<i>E. coli</i> XL1Blue	RecA1, endA1, gyrA96, hsdR17, supE44, lac, [F' proAB, lacIq Z M15, Tn10(tet ^r)], thi	Bullock <i>et al.</i> , 1987
<i>E. coli</i> BL21	F ⁻ , dcm, ompT, lac ⁻ , Met ⁺ , r _B ⁻ , m _B ⁻ , gal, kan ^r	Studier und Moffat, 1986
<i>A. tumefaciens</i> LBA 4404	PAL4404, Sm ^R	Hokema <i>et al.</i> , 1983
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>pisi</i> / <i>tabacii</i>		Yucel <i>et al.</i> , 1989
TMV		Niggeweg, 1999
<i>Escherichia coli</i> DB3.1	F ⁻ gyrA462 endA1 D(sr1- recA) mcrB mrr hsdS20(r _B ⁻ , m _B ⁻) supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Sm ^r) xyl-5 λ ⁻ leu mtl-1.	Bernard, 1993
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i> ES 4326	PLAFR3 Strep	Whalen <i>et al.</i> , 1991
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i> ES 4326 <i>avrRpt2</i>	PLH12 (<i>avrRpt2</i>) Strep	Whalen <i>et al.</i> , 1991

3.8.2 Hefestämme

Stamm	Eigenschaften	Herkunft
YM4271	MATa, <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>ade2-101</i> , <i>lys2-801</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>trp1-901</i> , <i>tyr1-501</i> <i>gal4-⁵¹²</i> , <i>gal80⁵³⁸</i> , <i>ade5::hisG</i>	Lieu <i>et al.</i> , 1993 Wilson <i>et al.</i> , 1991

3.8.3 Pflanzen

Kultivar	Eigenschaften	Herkunft
<i>Arabidopsis thaliana</i> Columbia Col-0 N1092		Wildtyp
<i>Nicotiana tabacum</i> W38	NN nn	Wildtyp

3.9 Medien

3.9.1 Bakterienmedien

Alle Lösungen werden, soweit nicht anders angegeben, mit H₂O angesetzt und anschliessend autoklaviert (15 min, 2 bar, 121 °C).

<u>LB-Medium</u> (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	10 g / l 5 g / l 5 g / l	Trypton Hefeextrakt NaCl pH 7,4 Autoklavieren
<u>SOC-Medium</u> (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	20 g / l 5 g / l 10 ml 2,5 ml 10 ml 10 ml 10 ml	Trypton Hefeextrakt 1 M NaCl 1 M KCl pH 7,0 nach dem Autoklavieren steril hinzufügen: 1 M MgCl ₂ 1 M MgSO ₄ 2 M Glucose
<u>Transformationsmedium</u>	50 g/l 500 µl/l	Saccharose Silwet L-77
<u>YEB-Medium</u>	10 g/l 2 g/l 5 g/l 5 g/l 0,5 g/l	Fleischextrakt (Lab lemco powder) Hefe-Extrakt Pepton Saccharose MgSO ₄ pH 7 einstellen Autoklavieren
<u>King's B Medium</u>	10 g/l 1,5 g/l 15 g/l 5 ml/l	Protease Pepton K ₂ HPO ₄ Glyzerin mit HCl auf pH 7 einstellen Autoklavieren 1 M MgSO ₄ x 7H ₂ O Antibiotika nach Bedarf
<u>Agrobakterien Minimal Medium (AMM) Sambrook <i>et al.</i>, 1989</u>		
<u>20x T-Puffer</u>	210 g/l 90 g/l	K ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄

<u>20 x T-Salze</u>	4 g/l	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
	0,2 g/l	CaCl ₂
	0,1 g/l	FeSO ₄
	0,04 g/l	MnCl ₂
	20 g/l	NH ₄ Cl

<u>AMM</u>	50 ml/l	20xT-Puffer
	50 ml/l	20xT-Salze
	5 g/l	Glukose

3.9.2 Hefemedien

<u>SD</u>	20 g/l	Glukose
	6,7 g/l	Nitrogen Base
	100 ml	10x Dropout solution pH 5,8

<u>YPD</u>	20 g/l	Bacto Peptone
	10 g/l	Yeast Extract
	20 g/l	Glukose pH 5,8

3.9.3 Pflanzenmedien

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

3.10 Lösungen und Puffer

<u>Ammoniumacetat-Lösung</u>	8 M	Ammoniumacetat
------------------------------	-----	----------------

<u>Ladepuffer für Agarosegele</u>	10 ml	TBE
	10 ml	Glyzerin (87%)
	0,2% (w/v)	Bromphenol-Blau
	0,2% (w/v)	Orange G
	0,2% (w/v)	Xylencyanol

<u>DNA-Extraktionspuffer</u>	0,35 M	Sorbitol
	0,1 M	Tris
	5 mM	EDTA pH 7,5

<u>DNA-Präparationspuffer</u>	5 ml	DNA-Extraktionspuffer
	5 ml	Kernlysepuffer
	1 ml	5% Sarkosyl
	30-50 mg	Na ₂ SO ₃
<u>Hybridisierlösung (Church Puffer)</u>	0,5 M	Na ₂ HPO ₄ / NaH ₂ PO ₄ (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 min kochen
<u>10x Lithium-Acetat</u>	1 M	Lithiumacetat pH 7,5 mit Essigsäure einstellen
<u>10 x MEN-Puffer</u>	200 mM	MOPS
	50 mM	NaAc
	10 mM	EDTA
		pH 7,0 mit 1M NaOH einstellen, autoklavieren
<u>PCI-Mix</u>	250 ml	Phenol
	250 ml	Chloroform
	10,4 ml	Isoamylalkohol
		1 h auf dem Magnetrührer mischen
<u>PEG/LiAC</u>	8 ml	50 % PEG 3350
	1 ml	10x TE
	1 ml	10x LiAc
<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>„Stripping“-Puffer</u>	7 ml	β -Mercaptoethanol
	100 ml	20% SDS
	62,5 ml	1 M Tris-HCl (pH 6,7) mit H ₂ O auf 1 l auffüllen
<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 <i>Taq</i> 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

3.10.1 Zusätze

<u>Zusatz</u>	<u>Endkonzentration</u>	<u>Stocklösung</u>
Ampicillin	100 mg / l	100 mg / ml H ₂ O
Gentamycin	25 mg / l	25 mg / ml H ₂ O
Kanamycin	50 mg / l	50 mg / ml H ₂ O
Rifampicin	100 mg / l	20 mg / ml Methanol
Streptomycin	100 mg / l	50 mg / ml H ₂ O
Tetracyclin	10 mg / l	50 mg / ml H ₂ O
Cefotaxim	500 mg / l	250 mg / ml H ₂ O
Hygromycin	30 mg / l	30 mg / ml H ₂ O
X-Gal	40 mg / l	20 mg / ml in DMF
IPTG	50 mg / l	23,8 mg / ml H ₂ O
6-Benzylaminopurin (6-BAP)	1 mg / l	1 mg / ml Ethanol
1-Naphtyllessigsäure (NAA)	0,1 mg / l	1 mg / ml Ethanol

3.10.2 Lösungen und Puffer für EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)

<u>F-Puffer</u>	20 %	Ficoll 400
	100 mM	Hepes (pH 7,9)
	300 mM	KCl
	10 mM	DTT
	0,1 %	PMSF

<u>D-Puffer</u>	200 mM	HEPES (pH 7,9)
	20 %	Glyzerin
	100 mM	KCl
	0,5 mM	EDTA
	0,25 %	NP-40
	2 mM	DTT
	0,1 %	PMSF

<u>10x TBE</u>	1 M	Tris-HCl
	0,83 M	B(OH)
	0,1 M	EDTA

3.10.3 Lösungen und Puffer für Reversen Northern (Array)

<u>Lysis Puffer</u>	100 mM	Tris HCl
	500 mM	LiCl
	10 mM	EDTA pH 8,0
	5 mM	DTT

<u>Washing Puffer</u>	100 mM	Tris HCl
	150 mM	LiCl
	1 mM	EDTA
	0,1 %	LiDS pH 8,0

<u>5x RT Puffer</u>	250 mM	Tris-HCl
	250 mM	KCl
	50 mM	MgCl ₂ x 6 H ₂ O pH 8,3

<u>RT Mix</u>	1 X	5 x RT Puffer
	1 mM	DTT
	0,5 mM	dNTPs, je 2 mM
	50 U	RNAsin
	50 U	AMV Reverse Transkriptase

3.10.4 Puffer für denaturierende Proteinextrakte aus Tabak

<u>Harnstoffextraktionspuffer</u>	5 %	β-Mercaptoethanol
	5 %	SDS
	16,5 %	Glyzerin
	4 M	Harnstoff

3.10.5 Puffer für native Gesamtproteinextrakte aus Hefe

<u>Extraktionspuffer</u>	0,1 M	Tris-HCl
	0,2 M	NaCl
	0,01 M	β-Mercaptoethanol
	20 %	Glyzerin
	5 mM	EDTA
	1 mM	PMSF

3.10.6 Puffer für schnelle genomische DNA aus *Arabidopsis*

<u>Extraktionspuffer</u>	0,2 M	Tris-HCl (pH 7,5)
	0,25 M	NaCl
	0,5 %	SDS
	25 mM	EDTA

3.10.7 Puffer für genomische DNA aus *Arabidopsis*

<u>Extraktionspuffer</u>	0,1 M	Tris-HCl (pH 7,5)
	0,35 M	Sorbitol
	0,01 M	β-Mercaptoethanol

<u>Nuclei Lysis Puffer</u>	2 %	CTAB
	50 mM	EDTA
	2 M	NaCl
	0,2 M	Tris-HCl

<u>Sarkosyl</u>	5 %	w / v in Wasser
-----------------	-----	-----------------

<u>Microprep puffer</u>	1 Teil	5 %	Sarkosyl
	2,5 Teile		Extraktionspuffer
	2,5 Teile		Nuclei Lysis Puffer
	0,3- 0,5 g		Na ₂ SO ₃ / 100 ml Puffer vor der Anwendung

3.10.8 Puffer für die Infektion mit *Botrytis cinerea*

<u>1 x Infektionsmedium (100 ml)</u>	320 mg	Gamborgs B5 + Vitamine
	10 mM	Saccharose
	10 mM	Kaliumphosphatpuffer (pH 6,4)

<u>Kartoffelagar</u>	19,5 g / l	
----------------------	------------	--

<u>Waschlösung</u>	0,3 %	NaCl
	0,1 %	Tween

4 Methoden

4.1 Anzucht und Kultivierung von Mikroorganismen und Pflanzen

4.1.1 Anzucht von *Escherichia coli*

Die Anzucht der *E. coli* – Bakterien erfolgt auf LB-Festmedium, bzw. in LB-Flüssigmedium bei 37 °C ü.N. Die angeimpften Flüssigmedien in Reagenzgläsern werden im Roller inkubiert (Sambrook *et al.*, 1989). Flüssigkulturen im Erlenmeyerkolben werden nach Überimpfen aus einer Vorkultur im Luftschüttler bei 250 rpm inkubiert. Die Bakteriendichte wird photometrisch bei 600 nm gegen unbeimpfte Medium gemessen, wobei der Wert 0,1 einem Titer von 2×10^7 Zellen entspricht. Zur Selektion wird dem Medium ein entsprechendes Antibiotikum zugesetzt. Zur Differenzierung inserttragender Plasmide kann das Ausplattieren auch auf X-Gal / IPTG erfolgen. Bei einem geeigneten Stamm (XL1-Blue) und einem entsprechenden Plasmid kommt es zur α -Komplementation, und es kann ein Blau / Weiss-Screening vorgenommen werden. Die Konservierung der Stämme erfolgt bei –80 °C in Glyzerinkulturen.

4.1.2 Anzucht von *Pseudomonaden*

Die Anzucht der *P. syringae* – Bakterien erfolgt in King´s B-Medium (King *et al.*, 1954) bei 28 °C für 2 Tage. Die Inkubation der Flüssigmedien erfolgt im Roller. Zur Selektion wird dem Medium das entsprechende Antibiotikum zugesetzt. Für Pflanzeninfektionen werden die Bakterien aus der ü.N.-Kultur erneut in frisches Medium überimpft. Die Konservierung der Stämme erfolgt bei –80 °C in Glyzerinkulturen.

4.1.3 Anzucht von Agrobakterien

Die Anzucht der *A. tumefaciens* – Bakterien erfolgt in Agrobakterien-Minimal-Medium (fest oder flüssig) oder in LB-Medium (fest oder flüssig). Die Inkubation erfolgt bei 28 °C für 3 Tage. Die Inkubation der Flüssigmedien erfolgt im Roller. (Sambrook *et al.*, 1989). Zur Selektion wird dem Medium das entsprechende Antibiotikum zugesetzt. Die Konservierung der Stämme erfolgt bei –80 °C in Glyzerinkulturen.

4.1.4 Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Anzucht von *S. cerevisiae* erfolgt auf Vollmedium (YPD) oder auf geeignetem Selektionsmedium (SD) über Nacht bei 30 °C. Die Flüssigkultur wird im Schüttler inkubiert.

4.1.5 Anzucht von Tabak Mosaik Virus (TMV)

Die Anzucht und Isolierung des TMV-Virus erfolgte aus Tabakblattgewebe nach Yalpani *et al.*, 1991.

4.1.6 Kultivierung von *Nicotiana tabacum*

4.1.6.1 Gewebekultur

Die Tabakpflanzen werden unter sterilen Bedingungen auf 2MS-Festmedium in Gläsern kultiviert. Die Anzucht erfolgt in Klimakammern oder -schränken bei 24 °C am Tag und 22 °C in der Nacht, wobei der Licht / Dunkel-Rhythmus 16 h : 8 h beträgt. Die Subkultivierung erfolgt durch Abtrennen und Überführen der vegetativen Spitze auf frisches Medium. Die Blattexplanate auf Hormonmedien werden unter den gleichen Bedingungen inkubiert.

4.1.6.2 Klimakammer / Gewächshaus

Die Kultivierung der Pflanzen bis zur Blüte erfolgt unter unsterilen Bedingungen in Erde bei 22 °C am Tag und 19 °C in der Nacht, bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 85 % in einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 16 h : 8 h. Als Erde wird zum Aussetzen Frühstdorfer Torf Typ P (Pikier), zum Umtopfen Frühstdorfer Torf Typ T (Topf) verwendet. Die Samenproduktion erfolgte im Gewächshaus unter Umweltbedingungen.

4.1.7 Kultivierung von *Arabidopsis thaliana*

Die Pflanzen werden auf Erde angezogen. Vor der Aussaat wird die Erde zweimal im Abstand von zwei Tagen für 30 min bei 90 °C autoklaviert. Die Samen werden 2 Tage im Dunkeln bei 4 °C stratifiziert, um eine gleichmässige und bessere Keimung zu erreichen. Die Kultivierung der Pflanzen findet in einer Klimakammer unter Langtags-Bedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkel) statt.

4.1.8 Infektion von Tabakpflanzen mit TMV

Zur Infektion mit TMV wird die Viren-Suspension (1 µg / µl) in 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,5) auf ein mit Carborundum (Siliciumcarbid) versetztes Stück Zellstoff getropft und gleichmässig sanft die Blattoberfläche berieben. Es werden komplett expandierte Blätter im unteren Drittel der Pflanzen infiziert. Die Infektion erfolgte wie bei Yalpani *et al.*, 1991 beschrieben.

4.1.9 Infektion von Tabakpflanzen und *Arabidopsis* mit Pseudomonaden

4.1.9.1 Bestimmung des Pseudomonaden-Wachstums in der Tabakpflanze

Zur Bestimmung der Verbreitung von Pathogenen innerhalb einer Pflanze kann man die Mikroorganismen isolieren und ihre Kolonienzahl durch Titern ermitteln, indem man die Bakterien auf einem semi-selektiven Medium auszählt (modifiziert nach Knoche *et al.*, 1987). Zur Quantifizierung des Bakterienwachstums werden von den Pseudomonaden ü.N.-Vorkulturen angezogen, diese neu überimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 kultiviert. Die Kultur wird abzentrifugiert (5000 rpm, 5 min, RT) und 3 mal mit sterilem Leitungswasser gewaschen. Die Pseudomonaden werden auf eine Dichte von 1 x 10⁵ cfu / ml verdünnt und zur Kontrolle in Verdünnungsstufen auf King's B-Medium ausplattiert. Die Pflanzen werden mit einer 1 ml-Spritze ohne Nadel von der Blattunterseite in eine Fläche mit Ø 0,5 cm inokuliert. Das Volumen einer Inokulation betrug ca. 10 µl. Es werden jeweils 5 Infektionsstellen mit einem Korkbohrer (Ø 1 cm) ausgestochen, in 1 ml sterilem Leitungswasser aufgemörsert und in einer Probe vereinigt. Das Bakterienwachstum wird zu den Zeitpunkten 0h, 48 h und 96 h

nach Infektion aufgenommen. Die aufgemörserten Proben werden jeweils kurz gemischt und in 1:10 Verdünnungsschritten in einer Verdünnungsreihe auf King'sB-Medium ausplattiert. Die Verdünnungs-Stufen 10^0 - 10^{-5} werden ausplattiert. Es werden pro Pflanze jeweils Doppelbestimmungen an zwei unterschiedlichen Blättern durchgeführt und jeweils zwei Pflanzen der gleichen Linien parallel getestet. Die Platten werden 2 - 3 Tage bei 28 °C inkubiert und die Anzahl der Kolonien ausgezählt. Es werden die Bakterienzahlen der gleichen Linien gemittelt und die Standardabweichung ermittelt.

4.1.9.2 Infektion mit Pseudomonaden für eine RNA-Isolation

Für die Isolation von RNA aus Tabakblättern für spätere Northern Experimente geht man wie in 4.1.9.1 beschrieben vor, lediglich die Pseudomonadensuspension wird dafür auf 1×10^7 cfu / ml verdünnt. Die Kontrolle erfolgt mit Leitungswasser.

4.1.9.3 Infektion von *A. thaliana* mit Pseudomonaden

Die Infektion von *A. thaliana* mit Pseudomonaden erfolgt ebenfalls durch Inokulation von 10 µl einer Pseudomonadensuspension von 1×10^7 cfu / ml in die Unterseite des Blattes.

Die Infektion von vielen Pflanzen kann auch durch Dippen der Blätter in eine Lösung mit Pseudomonaden mit der $OD_{600} = 0,2$ in 10 mM $MgCl_2$ mit etwas Silvet erfolgen. Die Pflanzen werden anschliessend bei hoher Luftfeuchtigkeit unter einer Haube kultiviert.

4.1.10 Infektion von Tabakpflanzen und *Arabidopsis* mit *Botrytis cinerea*

Der peritrophe Pilz wird auf Kartoffelgar im Dunkeln bei Raumtemperatur angezogen bis er Konidien bildet. Diese werden in die Waschlösung aufgenommen, und mit einer Zählkammer wird mikroskopisch die Sporenzahl bestimmt. Ein Teil Waschlösung mit Konidien wird mit einem Teil doppelt konzentriertem Infektionsmedium gemischt, so dass die Sporenkonzentration 5×10^5 Sporen / ml beträgt. 5 µl werden für jede Infektionsstelle eingesetzt. Die Pflanzen werden anschliessend bei hoher Luftfeuchtigkeit unter einer Haube kultiviert.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Methoden zur Isolierung von Plasmid DNA

4.2.1.1 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 min 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 min bei 37 °C getrocknet. Die gewonnene DNA wird in 20 µl EB oder H_2O gelöst und kann zur Restriktionsanalyse eingesetzt werden.

Präparative Mengen DNA mit hohem Reinheitsgrad werden mit Hilfe der Midi- und Maxi-Kits der Firma Qiagen präpariert. Die Durchführung erfolgt den Herstellerangaben gemäss.

4.2.1.2 Plasmidpräparation für Sequenzierung

Für Sequenzierreaktionen wird hochreine DNA mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep-Kits isoliert. Das Prinzip entspricht der alkalischen Lyse.

4.2.1.3 Schnelleyse von *E.coli* Zellen für eine anschliessende PCR

Die einzelnen Kolonien werden in 20 µl H₂O resuspendiert und für 5 min bei 95 °C erhitzt und anschliessend für eine PCR eingesetzt.

4.2.1.4 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.

4.2.2 Methoden zur Isolierung von genomischer DNA aus *Arabidopsis*

4.2.2.1 Schnelle Präparation von genomischer DNA

Eingesetzt wird ein Blatt, das in 400 µl Extraktionspuffer mit einer Bohrmaschine resuspendiert wird. Die Suspension wird bei maximaler Geschwindigkeit für 5 min 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 min zentrifugiert. Das Pellet wird getrocknet und in 100 µl TE aufgenommen. 1 µl wird für die PCR eingesetzt.

4.2.2.2 Saubere Präparation von genomischer DNA

Für die Analyse der Anzahl von T-DNA Insertionen in ein Genom mittels Southern Blot ist saubere genomische DNA Voraussetzung. 100 mg Pflanzenmaterial werden in 200 µl Microprep Puffer aufgenommen und mit der Bohrmaschine zerkleinert. Anschliessend werden 550 µl Microprep Puffer dazugegeben. Die Suspension wird gut durchmischt und 30-120 min 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 min wird die wässrige Phase in ein neues Gefäss überführt, und 2 / 3 bis 1 Volumen kaltes Isopropanol werden dazugegeben und der Ansatz gut durchmischt. Es folgt wieder eine Zentrifugation von 5 min 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. 15-25 µl werden im Southern Blot eingesetzt.

4.2.3 Methoden zur Charakterisierung von Nukleinsäuren

4.2.3.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung wird der GeneQuant II der Firma Pharmacia verwendet. Da man die Absorption von Nukleinsäuren in einer wässrigen Lösung im UV-Bereich bei 260 nm messen kann, lässt sich hierdurch die Konzentration der DNA bestimmen. Das Absorptionsmaximum bei dieser Wellenlänge wird durch die Anregung des

π -Elektronensystems in den Heterozyklen der Basen hervorgerufen. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht somit eine OD_{260} von 1,0 einer Nukleinsäure-Konzentration von 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$ bei dsDNA und 40 $\mu\text{g} / \text{ml}$ bei RNA. Im Vergleich zur Absorption bei der Wellenlänge 280 nm, bei der die aromatischen Seitenketten von Proteinen angeregt werden, lässt sich nun der Quotient aus der Absorption der Wellenlängen 260 / 280 nm als ein Mass für den Reinheitsgrad der DNA- oder RNA-präparation darstellen.

Der Reinheitsgrad sollte idealerweise zwischen 1,7 und 2,0 liegen. Gemessen werden 1:100 Verdünnungen der Präparationen um den linearen Messbereich des Photometers nicht zu verlassen.

4.2.3.2 Agarosegelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA für analytische und präparative Zwecke erfolgt in horizontalen Agarosegelen mit 1x TAE oder 1x TBE. Für DNA-Moleküle im Grössenbereich von 500 bp - 1,4 kb werden Gele mit einer Agarosekonzentration von 1-0,7% (w/v) verwendet. Für die Auftrennung kleinerer DNA-Fragmente wird ein HEC-Gel (0,7 % Hydroxyethylcellulose in 1 % Agarose in 1 x TAE) verwendet (Perlmann und Halvorson, 1987). Die zu analysierende DNA wird in 10 x Probenpuffer (67 % Saccharose, 50 mM EDTA, pH 8,0 0,42 % w / v BPB) aufgenommen und auf das Gel aufgetragen. Zur Abschätzung der Fragmentgrössen wird jeweils ein entsprechender Fragmentgrössenstandard mit auf das Gel aufgetragen. Aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen innerhalb der DNA-Moleküle wandern diese nach Anlegen des elektrischen Feldes mit einer Stromstärke von 90 - 120 V in Richtung der Anode. Zur Detektion wird das Gel nach dem Lauf in Ethidiumbromid (EtBr) -Lösung gefärbt, das nicht in der DNA interkalierende EtBr im Wasserbad aus dem Gel ausgeschwemmt, die angefärbten Banden auf dem Transilluminator bei 302 nm sichtbar gemacht und mit Hilfe der Geldokumentationsanlage dargestellt.

4.2.3.3 Sequenzierung von DNA

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

Für die Reaktion der linearen PCR werden 170 fmol Plasmid-DNA, 5 pmol Primer und 2 μl RR-Mix in einem Endvolumen von 10 μl eingesetzt. Die Reaktion im Thermocycler besteht aus 25 Zyklen mit 10 sek Denaturierung bei 95 °C, 30 sek Annealing bei 50 °C und 4 min bei 60 °C Polymerisation. Die Fragmente werden durch eine Ethanol-Fällung von den nicht eingebauten Nukleotiden abgetrennt und in TSR (Template Suppression Reagent, Perkin Elmer) aufgenommen. Nach dem Denaturieren können sie in das Analysegerät appliziert werden. Die gewonnenen Rohdaten werden mit Hilfe des Chromas-Programms ausgewertet.

4.2.3.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion ("polymerase chain reaction", PCR, Mullis und Faloon, 1987) können unter Verwendung zweier gegenläufiger Primer spezifische Sequenzen eines DNA-Moleküls mittels einer DNA-Polymerase selektiv amplifiziert werden. Die als Matrize dienende DNA wird zunächst denaturiert. Nach der Anlagerung der Primer an die komplementären Sequenzen der DNA-Einzelstränge synthetisiert die hitzestabile DNA-Polymerase richtungsorientiert vom 5' zum 3' Ende der DNA in einer Primer-Verlängerungsreaktion komplementäre DNA-Stränge an der Matrize. Dieser Zyklus aus Denaturierung, Primeranlagerung (Annealing) und DNA-Synthese (Polymerisation) wird 25-35 mal wiederholt.

Ein Standard-Ansatz enthält Matrizen-DNA (10 ng), je 10 pmol der Primer, dNTPs (0,2 mM je Nukleotid) und 2,5 units DNA-Polymerase Mix in Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 8,55, 1,5 mM MgCl₂, 16 mM (NH₄)₂SO₄). Die Amplifikation wird in einem Thermocycler mit folgendem Beispiel-Programm vorgenommen:

1. erste Denaturierung	4 min 94°C
2. Denaturierung	1 min 94°C
3. Annealing	30 sek 50-72°C (Primer T _m)
4. Elongation	1 min / kb 72°C
5. zurück zu Schritt	29 mal zu 2
6. finale Elongation	10 min 72°C

Die Schmelztemperatur T_m eines Primers errechnet sich nach folgender Formel :

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

4.2.3.5 RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)

Die RACE wurde mit Hilfe des SMART-RACE cDNA Amplification Kits von Clontech nach Protokoll des Herstellers ausgeführt.

4.2.3.6 RAGE (Rapid Amplification of genomic DNA Ends)

Die RAGE wurde mit Hilfe des Universal genome Walker Kits von Clontech nach Protokoll des Herstellers ausgeführt.

4.2.4 Methoden zur Modifikation von Nukleinsäuren

4.2.4.1 Restriktionsspaltung von DNA

Doppelsträngige DNA kann mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen des Typs II sequenzspezifisch gespalten werden. Die Enzyme erkennen meist palindromische Sequenzen und es entstehen je nach Enzym 3'- oder 5'- überhängende ("sticky") oder glatte ("blunt") Enden. Die Volumina der Spaltungsansätze werden so gewählt, dass die Enzymmenge höchstens 1 / 10 des Gesamtvolumens ausmacht. Restriktionsendonukleasen werden in Puffern mit 50 % Glycerin geliefert. Mehr als 5 % Glycerin im Restriktionsansatz inhibiert die Enzymaktivität.

Die optimalen Reaktionsbedingungen werden durch die entsprechenden 10 x Puffersysteme eingestellt:

Puffer B⁺: 10 mM Tris-HCl (pH 7,5); 10 mM MgCl₂; 0,1 mg / ml BSA

Puffer G⁺: 10 mM Tris-HCl (pH 7,5); 10 mM MgCl₂; 50 mM NaCl; 0,1 mg / ml BSA

Puffer O⁺: 50 mM Tris-HCl (pH 7,5); 10 mM MgCl₂; 100 mM NaCl; 0,1 mg / ml BSA

Puffer R⁺: 10 mM Tris-HCl (pH 8,5); 10 mM MgCl₂; 100 mM KCl; 0,1 mg / ml BSA
 Puffer Y⁺: 33 mM Tris-Acetat (pH 7,9); 10 mM MgAc; 66 mM KAA; 0,1 mg / ml BSA

Die Menge an einzusetzendem Enzym errechnet sich aus folgender Formel:

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

wobei bp [λ] = 48500 und u [unit] die Enzymmenge beschreibt, die 1 μ g λ -DNA innerhalb von 60 min vollständig verdaut.

4.2.4.2 Ligation

Die Verknüpfung zweier DNA-Fragmentenden geschieht mit Hilfe der T4-DNA-Ligase. Die Ligase katalysiert unter ATP-Verbrauch eine Phosphodiesterbindung zwischen benachbarten 5'-Phosphat- und 3'-OH-Gruppen. Für die Konstruktion von Plasmiden wird 50 fmol linearisierte Vektor-DNA und entsprechend in 10-100fachem molarem Überschuss das zu inserierende Fragment eingesetzt. Die Reaktion erfolgt im Ligase-Puffer (40 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,5 mM ATP, pH 7,8) mit 4 u T4-DNA-Ligase bei RT für 4 h.

4.2.4.3 Alkalische Phosphatase Behandlung der DNA

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

In dem Ansatz sollten folgende Endkonzentrationen vorliegen:

- DNA (1-20 pmol Enden)
- 1 x Puffer Yellow+
- 0,5-1,0 units CIAP
- Mit sterilem Wasser auf 50 μ l Endvolumen auffüllen

Inkubation für 30 min bei 37 °C

Inaktivierung des Enzyms durch Inkubation für 10 min bei 75 °C

4.2.4.4 Klonierung mit dem GATEWAY-System

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

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

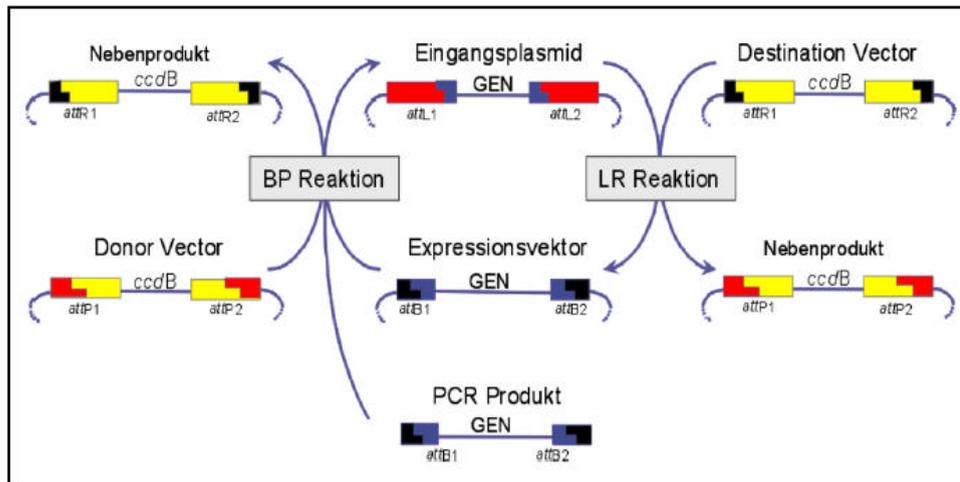


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Klonierung mit dem Gateway-System

4.2.5 Transformation von Mikroorganismen und Pflanzen

4.2.5.1 Transformation von *E. coli* Zellen

Herstellung und Transformation von chemisch *E. coli* (DH5a)-Zellen

Um *E. coli*-Zellen kompetent zur Aufnahme von DNA zu machen, wird das modifizierte Verfahren von Inoue *et al.*, 1990, verwendet. Hierbei wird eine Vorkultur von einer frisch ausgestrichenen Platte angelegt und diese am nächsten Tag in 300 ml SOC-Medium verdünnt. Die Kultur wächst bei einer Temperatur von 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2 - 0,25 in einem Luftschüttler. Das weitere Wachstum, bis OD₆₀₀ 0,4 - 0,5 erfolgt bei 18 °C. Die Zellen werden durch Zentrifugation (4000 rpm, 4 °C) geerntet und in 90 ml 4 °C gekühltem Transformationspuffer (10 mM PIPES, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, pH 6,7, 55 mM MnCl₂) resuspendiert. Nach 15 min Inkubation erfolgt der nächste Zentrifugationsschritt und das Resuspendieren in 30 ml 4 °C Transformationspuffer. Danach erfolgt der zweimalige Zusatz von je 1050 µl DMSO, wobei die Zellen nach jeder Zugabe 5 min auf Eis inkubiert werden. Die auf diese Weise hergestellten chemisch kompetenten Zellen werden nun zu je 200 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und können so bei -80 °C gelagert werden. Die zu erwartende Transformationseffizienz dieser Methode liegt bei 10⁷ cfu / mg DNA.

Die chemisch kompetenten Zellen werden langsam auf Eis aufgetaut und mit der zur Transformation verwendeten DNA gemischt. Nach 30 min Inkubationszeit auf Eis erfolgt der Hitzeschock bei 42 °C für 3 min. Die Zellen werden 5 min auf Eis inkubiert, mit 800 µl SOC-Medium versetzt und 60 min bei 37 °C im Roller regeneriert. Falls eine Selektion auf Ampicillin erfolgt, kann die Regenerationszeit auf 45 min verkürzt werden. Die transformierten Zellen werden in unterschiedlichen Verdünnungen auf Selektionsmedium ausplattiert und ü.N. bei 37 °C inkubiert.

Herstellung und Transformation von elektrokompenten *E. coli* (BL21)-Zellen

10 ml SOC-Medium werden mit Bakterien von einer frischen Platte angeimpft. Es erfolgt eine Inkubation über Nacht bei 37 °C im Luftschüttler. Mit 2 ml dieser Vorkultur werden jeweils 250 ml SOC Medium im 1L Erlenmeyerkolben angeimpft. Das Wachstum erfolgt bei 37 °C im Luftschüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5. Die Suspension wird durch ständiges Schwenken

im Eiswasserbad abgekühlt. Dann erfolgt eine Zentrifugation von 5 min, 5000 rpm, 4 °C in vorgekühlten Zentrifugenbechern. Alle weiteren Schritte erfolgen auf Eis. Der Überstand wird verworfen und das Pellet wird in 500 ml sterilem Eiswasser resuspendiert. Es erfolgt eine weitere Zentrifugation. Der Überstand wird wieder verworfen und das Pellet in 250 ml sterilem Eiswasser resuspendiert. Die Zellen werden wieder geerntet und der letzte Schritt wiederholt.

Das Bakterienpellet wird in 10 ml sterilem, gekühltem 15%igem Glycerin resuspendiert. Die Zellen werden geerntet und in 1 ml sterilem, gekühltem 15%igem Glycerin resuspendiert. Die homogene Suspension wird zu je 40 µl in vorgekühlte Eppendorfgläser aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Elektroporationsküvetten werden fünf mal mit sterilem Wasser und fünf mal mit Ethanol 70 % (v / v) gewaschen und unter der Sterilbank getrocknet. Die elektrokompenten Zellen werden auf Eis aufgetaut und in die vorgekühlte Küvette pipettiert. Anschliessend werden 50 ng DNA dazupipettiert. Der GenePulser ist auf 2,5 V, 200 Ω, 25 µF eingestellt. Die von aussen trockene Küvette in den GenePulser einführen den Impuls auslösen und danach sofort 1 ml SOC zugeben. Die Suspension in einem Eppendorfgläser eine Stunde bei 37°C inkubieren und auf entsprechende Selektionsplatten ausplattieren.

4.2.5.2 Transformation von Hefe-Zellen

Sechs grosse frische Kolonien werden in 1 ml Wasser suspendiert. Die Lösung wird 5 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wird in 1 ml 100 mM LiAc resuspendiert und für 5 min bei 30 °C inkubiert. 500 µl werden in ein neues Gefäss gegeben und erneut abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Zum Pellet werden nun 240 µl PEG (50 %), 36 µl 1 M LiAc, 10 µl Heringssperma DNA, 5 µl Plasmid DNA, 60 µl Wasser. Den Ansatz 1 min resuspendieren, und für 20 min bei 42 °C inkubieren. Danach den Ansatz abzentrifugieren und das Pellet durch langsames Auf- und Abpipettieren in 100 µl Wasser aufnehmen. Den Ansatz auf entsprechenden Platten ausstreichen.

4.2.5.3 Transformation von Agrobakterien

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

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

4.2.5.4 Transformation von *Nicotiana tabacum*

Sämtliche im Rahmen dieser Arbeit erstellten transgenen Pflanzen entstanden mit Hilfe des *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Gentransfers. Eine Pflanze bildet bei Befall mit dem

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

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

4.2.5.5 Transformation von *Arabidopsis thaliana*

"Floral-dip" Transformation

Für die Agrobakterien-vermittelte Transformation von *Arabidopsis thaliana* wurde eine sehr einfache Methode entwickelt (Clough, S.J., Bent, A.F., 1998, Bent, 2000). Pflanzen, die gerade begonnen haben zu blühen, werden in Medium mit den entsprechenden Agrobakterien und einem Benetzungsmittel (SilwetL-77) getaucht. Dabei scheinen sich entwickelnde Eizellen das bevorzugte Ziel produktiver Transformationen zu sein (Bent, A.F., 2000). Aus diesen Zellen entstehen heterozygote Samen.

Für die Transformation werden pro Topf (Ø 6 cm) bis zu 50 Samen ausgesät. Weniger, aber stärkere Pflanzen pro Topf erhöhen die Transformationsrate.

- Gesunde und kräftige Arabidopsispflanzen bis zur Blüte anziehen.

- Die ersten Blütenstände abschneiden um die Bildung vieler sekundärer Blütenstände anzuregen.
- Agrobakterien-Vorkultur ü. N. in 25 ml YEB mit entsprechenden Antibiotika anziehen.
- Mit der Vorkultur 400 ml YEB mit entsprechenden Antibiotika animpfen und bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 2.0 wachsen lassen.
- Die Agrobakterien 10 min bei 1000 x g abzentrifugieren.
- Das Pellet in Transformationsmedium resuspendieren.
- Bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von etwa 0,8 mit Transformationsmedium verdünnen.
- Pflanzen für einige Sekunden bis zur Rosette in die Agrobakterien-Lösung dippen, dabei leicht bewegen.
- Die Pflanzen zurück in die Klimakammer stellen und 1-2 Tage mit einer Haube abdecken.
- Anschliessend die Pflanzen bis zur Samenreife (2-3 Wochen) weiterkultivieren.

Die Pflanzen lässt man anschliessend in Papiertüten trocknen. Die trockenen Pflanzen werden dann vorsichtig mit den Fingern zerrieben, um die Schötchen aufzubrechen. Die Samen werden durch Sieben grob von den übrigen Pflanzenteilen getrennt und können bei 4°C trocken gelagert werden.

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®, Phosphinothricin (auch Glufosinat = L-Homoanalin-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 in einer letalen Konzentration in der Pflanze an und führt zusammen mit dem Glutaminmangel zum raschen Absterben der behandelten Pflanzen.

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

4.2.6 Northern Blot Analyse

Zur Analyse der Genexpression auf transkriptioneller Ebene muss die pflanzliche RNA zunächst aus den Zellen präpariert und anschliessend mittels des Northern-Blot-Verfahrens (Sambrook *et al.*, 1989) untersucht werden.

4.2.6.1 Isolierung von RNA aus Pflanzen

Zur RNA-Präparation aus Tabakblättern wird der RNeasy-Plant-Mini-Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Aufarbeitung erfolgt mit Hilfe des Herstellerprotokolls. Zur Extraktion wird der mit β-ME (β-Mercaptoethanol) zu versetzende RLT-Puffer verwendet. Eingesetzt werden 150 mg Material. Zur Erhöhung der Ausbeute wird der Durchfluss der ersten Eluation ein zweites Mal auf die Säule appliziert und zentrifugiert.

Für die RNA-Isolation aus Arabidopsisgeweben wird das Invisorb Spin Plant RNA Extraktion Kit der Firma Invitex nach Herstellerprotokoll verwendet.

4.2.6.2 Denaturierende RNA-Gelelektrophorese

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) BPB-Lösung) 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.

4.2.6.3 Kapillar Blot

Nach der Elektrophorese wird die RNA aus dem denaturierenden Agarosegel mittels Kapillarblot auf eine Nylonmembran (Hybond N⁺ von Amersham) übertragen. Der Aufbau des Blots erfolgt gemäss der Abbildung luftblasenfrei, wobei die Membran vorsichtig auf das Gel aufgebracht wird. Das Blotting erfolgt durch einen Kapillarstrom des 10 x SSC-Puffers auf eine Nylonmembran und überträgt dabei die RNA.

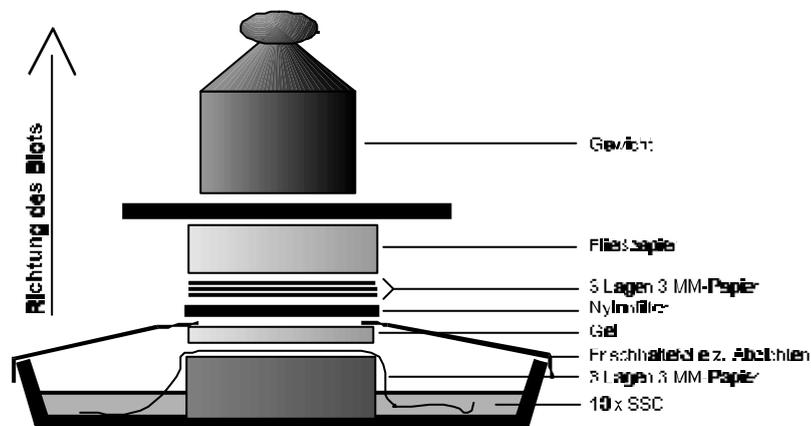


Abb. 4.2: Aufbau eines Northern Blots

Nach mindestens 14 h ist die Übertragung vollzogen und der Blot kann abgebaut werden. Zur Kontrolle wird der Transfer auf dem UV-Transilluminator überprüft und die RNA durch eine Inkubation für 2 h bei 80 °C kovalent auf der Membran gebunden. In diesem Zustand kann die Membran sofort zur Hybridisierung eingesetzt oder über mehrere Monate bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

4.2.6.4 Herstellen eines radioaktiv markierten DNA-Fragments

Für die Herstellung radioaktiv markierter Hybridisierungssonden wird ein DNA Fragment nach Restriktionsspaltung aus einem Agarosegel eluiert. Die Markierungsreaktion erfolgt nach der Random-Prime-Labeling-Methode nach Feinberg und Vogelstein, 1983, bei der Hexanukleotide zufälliger Sequenz an die Matrizen-DNA binden: Die annealten

Hexanukleotide dienen dann als Primer für die Neusynthese eines komplementären Stranges durch die Klenow-Polymerase unter Einbau von radioaktiven Nukleotiden. Die verwendete Klenow-Polymerase ist modifiziert, so dass sie keine Exonucleaseaktivität (exo⁻) mehr besitzt. Die Markierungsreaktion wird mit Hilfe des MegaprimeTM DNA labeling system Kits von Amersham Pharmacia vorgenommen. Die Durchführung erfolgt nach dem Protokoll des Herstellers.

4.2.6.5 Hybridisieren des Filters

Durch Behandlung der Membran mit radioaktiv markierten, einzelsträngigen DNA-Sonden lassen sich komplementäre RNA-Transkripte auf der Membran lokalisieren. Die Spezifität, mit der die Sonde an die RNA bindet, ist abhängig von der Salzkonzentration und der Temperatur. Bei hoher Salzkonzentration und niedriger Temperatur ist die Stabilität unspezifischer DNA-RNA-Hybride grösser als in Lösungen niedriger Salzkonzentration und höherer Temperatur. Durch die Absenkung der Salzkonzentration in den Waschlösungen erhöht man die Stringenz. Bei einer detektierbaren Strahlung auf dem Filter von ca. 100 counts per second (cps) ist der Filter auswertbar. Die Methode ist modifiziert nach Church und Gilbert, 1984.

Die zu analysierende Membran wird in einer Hybridisierungsröhre 30 min bei 65 °C in einer Hybridisierungslösung (0,5 M Na-Phosphatpuffer, 1 mM EDTA, 7 % SDS) inkubiert. Die Sonden-DNA wird 10 min bei 100 °C denaturiert und 5 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe der Sonden-DNA in 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 / 0,1 % SDS und einmal mit 1x SSC / 0,1 % SDS und optional mit 0,5 x SSC / 0,1 % SDS für 15 min - 30 min gewaschen. Für den Nachweis der Radioaktivität wird die Membran in Folie eingeschweisst und mit einem IP-Screen exponiert. Die Dauer der Exposition hängt von der Menge der nachweisbaren Radioaktivität ab. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe des Bioimagers (BAS-1000 von Fuji). Zur Quantifizierung werden die Programme PCBAS®2.09 und TINA®2.0 der Firma Raytest verwendet. Die Normalisierung der detektierten Signale wird über den Vergleich mit der dokumentierten EtBr-Färbung der RNA erreicht.

4.2.7 Reverser Northern Blot (Micro Array)

Um möglichst schnell viele Gene auf ihr Transkriptionslevel hin zu untersuchen, wird DNA der betreffenden Gene auf eine Membran gespottet und diese mit radioaktiv markierter mRNA hybridisiert.

Isolation der mRNA

Dazu werden 100-300 mg Blattmaterial in Stickstoff aufgemörsert und in ein Gefäss mit 1 ml Lysis-Puffer überführt. Die Suspension wird bei 13000 rpm für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Gefäss mit magnetischen Kugeln überführt und für 5 min bei RT inkubiert. Die magnetischen Kugeln werden zur Vorbereitung mit 200 µl Lysis-Puffer zweimal gewaschen. Jetzt erfolgt die erste magnetische Separation, anschliessend werden die Kugeln dreimal mit 500 µl LiDS Puffer gewaschen. Abschliessend wird die mRNA in 200 µl LiDS aufgenommen.

Synthese von cDNA

100 µl der mRNA werden magnetisch vom Überstand getrennt, und dreimal mit 250 µl RT Puffer gewaschen, und in ein neues Gefäß überführt. Dann wird 50 µl RT-Mix zu den Kugeln mit mRNA gegeben. Die RT-Reaktion erfolgt für eine Stunde bei 42 °C. Danach wird der Überstand wieder durch magnetische Separation abgetrennt, zweimal mit 250 µl RT-Puffer gewaschen dann zweimal mit 50 µl 2 mM EDTA. Für 2 min erfolgt nun ein Erhitzen auf 95 °C. Dann wird sofort eine magnetische Separation und eine Waschung mit 50 µl 2 mM EDTA und zweimal mit 250 µl Wasser durchgeführt.

Präparation der radioaktiv markierten Probe

Zu den Kugeln mit mRNA werden nun 28 µl Wasser und 5 µl "random" Primer gegeben. Die Lösung wird zwei min bei 95 °C erhitzt, dass sich die Primer beim Abkühlen an die Einzelstränge anlagern können. Anschliessend werden 10 µl Labeling-Mix (Puffer und Nukleotide), 5 µl ($\alpha^{33}\text{P}$)dCTP (3000 Ci / mmol, 10 µCi / µl) und 10 units Klenow-Polymerase dazugegeben und die Lösung bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Mit magnetischer Separation wird der Überstand mit den nichteingebauten Nukleotiden abgetrennt. Es werden 50 µl 2 mM EDTA dazugegeben und für 3 min auf 95 °C erhitzt. Bei der sofortigen magnetischen Separation wird der Überstand mit der radioaktiv markierten cDNA in ein neues Gefäß überführt und die Elution wiederholt. Die zusammengeführten Überstände werden mit einem Filter (Whatman micro-centrifuge tube filter Anopore + 0,2 µm (BiometraB 6830 0212)) weiter aufgereinigt.

Hybridisierung der Membran

Die Filter werden in 10 x SSC angefeuchtet. Anschliessend in 10 ml Church Puffer für zwei Stunden bei 65 °C im Roller vorhybridisiert. Die radioaktiv markierte Probe wird für 3 min auf 95 °C erhitzt und sofort auf Eis platziert. Die Probe wird nun zur Church-Lösung mit dem vorhybridisierten Filter gegeben und für 18 Stunden weiter bei 65 °C inkubiert. Die Filter werden zwei mal mit 0,2 x SSC mit 0,1 % SDS für 15 min bei 65 °C gewaschen.

Die Signale werden mit dem Phosphoimager Fuji FLA-3000 bei einer Auflösung von 100 µm und 16 bit eingelesen.

Strippen der Membran

Die Membran wird in kochendes 0,1 x SSC mit 0,1 % SDS für 15 min gelegt und danach für 15 min bei 65 °C mit 0,4 M NaOH, 0,1 % SDS behandelt. Zur Neutralisierung wird die Membran zweimal für 15 min in 0,2 M Tris-HCl, pH 7,5, 0,1 % SDS gelegt.

4.2.8 RT-PCR

Für die semiquantitative Analyse der RNA-Menge eines Gens ist die RT-PCR eine geeignete Methode. Dafür werden 600 ng Gesamt-RNA eingesetzt. Dazu werden 0,2 µg Random Hexamer Primer gegeben und die Reaktion mit Wasser auf 11 µl aufgefüllt. Der Ansatz wird für 5 min bei 70 °C inkubiert und dann auf Eis gestellt. Dazu werden Puffer, dNTP Mix (10 mM), 20 units Ribonuklease-Inhibitor gegeben und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Der Ansatz wird für 5 min bei 25 °C inkubiert. Anschliessend wird die RT-Reaktion durch die Zugabe von 200 units Reverser Transkriptase gestartet. Der Ansatz steht erst 10 min bei 25 °C und dann weitere 60 min bei 42 °C. Abgestoppt wird die Reaktion

durch Erhitzen auf 70 °C für 10 min. 5 µl des Ansatzes werden in der anschließenden PCR eingesetzt.

4.3 Biochemische Methoden

4.3.1 *In vitro* Transkription von RNA und *in vitro* Translation von Proteinen

Das für das Protein kodierende Gen wird in einen entsprechenden Vektor, z.B. pBluescriptSKII eingefügt. Das Plasmid wird hinter dem 3' Bereich des zu transkribierenden Gens mittels Restriktionsspaltung linearisiert. Für die *in vitro* Transkription werden in 50 µl 1 µg DNA eingesetzt, 2 mM rNTP Mix, 50 units Ribonuklease Inhibitor, 30 units T7 RNA-Polymerase und Transkriptionspuffer. Der Ansatz wird mit Wasser aufgefüllt und bei 37 °C für zwei Stunden inkubiert. Die Reaktion wird bei -20 °C abgestoppt. Die DNA wird durch Zugabe von 1 unit RNase freier DNase für 15 min bei 37 °C abgebaut. Die RNA wird mit dem RNeasy Kit von Qiagen nach Vorschrift des Herstellers aufgereinigt. 500 ng der RNA werden mit RNA-Probenpuffer versetzt, bei 65 °C 20 min inkubiert. Im Elektrophoresegel (1% Agarose, 1 x MEN) wird die Transkription überprüft.

Für die Translation wird 1 µg der RNA für 3 min bei 65 °C denaturiert und auf Eis gestellt. Es werden zwei Ansätze gemacht, mit und ohne [³⁵S] Methionin. Der Ansatz mit [³⁵S] Methionin dient lediglich zur Kontrolle der Translation. Der Ansatz ohne [³⁵S] Methionin wird dann im EMSA verwendet. In 50 µl werden folgende Komponenten zur *in vitro* Translation pipettiert: Aminosäure-Mix / -Leucin 0,5 µl, Aminosäure-Mix / - Methionin 0,5 µl, 40 units Ribonuklease-Inhibitor, 1 µg RNA, 35 µl Rabbit Reticulocyte Lysate. In den Ansatz, der mittels SDS-PAGE getestet wird gibt man 2 µl [³⁵S] Methionin und 1 µl Aminosäure-Mix / - Methionin, der Aminosäure-Mix / - Leucin wird nicht benutzt. Die beiden Ansätze werden bei 30 °C für 90 min inkubiert. Das SDS-Gel kann entweder getrocknet, oder geblottet und dann exponiert werden.

4.3.2 Native Gesamtproteinextrakte aus Hefe

Die Hefestämme werden in flüssigem Selektivmedium über Nacht bei 30 °C und 250 rpm angezogen. Mit dieser Vorkultur werden je 100 ml Selektivmedium auf eine OD₆₀₀ = 0,3 angeimpft. Die Kulturen werden dann weiter unter den genannten Bedingungen angezogen bis sie eine OD₆₀₀ von 1,0 erreicht haben. Die Kulturen werden per Zentrifugation geerntet und das Pellet in 400 µl Extraktionspuffer aufgenommen. Dazu werden 40 mg Glaskügelchen gegeben und die Lösung 10 min gemixt. Auf Eis lässt man die Kügelchen absinken, der Überstand wird in einem neuen Gefäß mit neuen Kügelchen und 200 µl Extraktionspuffer versetzt und die Lösung wieder 10 min auf dem Vortex gemixt. Die Kügelchen werden wieder abgetrennt und 5 µl des Überstands (normalerweise 10-20 mg Protein/ml) werden im EMSA eingesetzt. Der Rest wird bei -70 °C gelagert.

4.3.3 Denaturierte Gesamtproteinextrakte aus Tabak

Das Probenmaterial wird in Stickstoff aufgemörsert, in 500 µl Puffer aufgenommen und gut durchmischt. Die Proben werden dann für 20 min auf 65 °C und anschließend für 5 min auf 95 °C erhitzt. Nach einer Zentrifugation von 5 min bei 13000 rpm, werden 10 µl des Überstandes für eine SDS-PAGE eingesetzt.

4.3.4 Expression und Aufreinigung von Proteinen in *E. coli*

Zur Expression der rekombinanten Proteine in *E. coli* wird das pET-System von Novagen und das pDEST17 von Gateway verwendet. Das zu exprimierende Gen steht im pET28a-Vektor unter die Kontrolle des T7 RNA-Polymerase Promotors. Das Gen für die T7 RNA-Polymerase ist im Genom des lysogenen Phagen DE3 des Stamm BL21 und steht unter der Kontrolle des IPTG-induzierbaren *lacUV5*-Promotors. Die Expression des Gens ist somit durch IPTG induzierbar. Die Zellen werden nach der Expression durch Zyklen von Einfrieren und Auftauen lysiert. Die in *E. coli* exprimierten Proteine werden über den N-terminal angehängten HIS-tag mittels NiNTA-Matrix aufgereinigt.

200 ml LB-Flüssigmedium mit Ampicillin werden mit 0,4 ml ü. N.-Kultur des transgenen BL21 (DE3)-Stammes angeimpft. Die Kultur wird bei 37 °C unter Schütteln (250 rpm) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen. Im Anschluss wird die Kultur in zwei parallele Ansätze aufgeteilt und in einem der beiden Ansätze die Expression des Transkriptionsfaktors durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Kulturen werden 3 h bei 37 °C unter Schütteln weiter inkubiert und anschliessend die OD₆₀₀ bestimmt. Zum Aufschluss der *E. coli*-Zellen werden 50 ml der Kulturen in der Biofuge bei 5000 rpm für 5 min sedimentiert und das Pellet in 5 ml Lysepuffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol) resuspendiert. Der Aufbruch der Zellen erfolgt durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen des Extraktes. Gegebenenfalls lassen sich die Zellen zusätzlich durch eine Ultraschallbehandlung für 30 sek lysieren. Die Aufreinigung des rekombinanten Proteins aus dem Lysat erfolgt mit Hilfe der NiNTA[®]-Matrix von Qiagen. Die mit dem hexameren Histidinrepeat versehenen Proteine bilden mit dem Nickel der Matrix eine Chelatbindung, die durch Zugabe von Imidazol im Rahmen der Elution kompetitiv verdrängt werden. Die Aufreinigung erfolgt im Batch, wobei das Matrixvolumen 1 / 10 des Probevolumens entspricht.

4.3.5 SDS-PAGE

Durch die diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) werden Proteine in ihrer denaturierten Form der Grösse nach durch die Polyacrylamidgel-Matrix nach Anlegen eines elektrischen Feldes aufgetrennt (modifiziert nach Laemmli, 1970). Für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird das AGS-Gelsystem eingesetzt. Die Porengrösse der Polyacrylamid-Matrix kann durch das Verhältnis der Acrylamid-Konzentration zur Konzentration des Quervernetzlers N,N'-Methylenbisacrylsäureamid bestimmt werden. Die radikalische Polymerisation erfolgt nach Zugabe von Ammoniumperoxosulfat (APS) und wird durch N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) katalysiert. Für die optimale Auftrennung der nachzuweisenden Proteine mit einer Grösse von ca. 50 - 65 kDa wird ein 10%iges Trenngel (10 % (w / v) N,N'-Methylenbisacrylamid (19:1), 0,4 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,1 % (w / v) SDS, 0,1 % (v / v) TEMED und 0,1 % (w / v) APS) verwendet. Nach dem Giessen des Trenngels wird zur Oberflächenglättung mit Isobutanol oder optional bei höherprozentigen Gelen mit H₂O überschichtet. Zur gleichmässigen Auftrennung der Proteine wird, nach Abgiessen des Überstandes auf dem Trenngel, ein Sammelgel (5 % (w / v) N,N'-Methylenbisacrylamid (19:1), 125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 0,1 % (w/v) SDS, 0,2 % (v / v) TEMED und 0,1 % (w / v) APS) mit den Probeauftragstaschen gegossen. Vor der Elektrophorese werden die Proteinextrakte mit SDS-Probenpuffer (2 x : 0,2 M Tris, 15 % (v / v) Glycerin, 6 % (w / v) SDS, 10 % (v / v) β -Mercaptoethanol und 0,05 % (w/v) BPB) versetzt, 5' bei 100 °C

denaturiert und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in Laufpuffer (25 mM Tris, 190 mM Glycin und 0,1 % (w / v) SDS) circa 30 min bei 90 V zum Durchlaufen der Proteine durch das Sammelgel und anschliessend bei 120 V bis die BPB-Bande das untere Ende des Gels erreicht hat. Zur Bestimmung der Molekulargewichte wird auf jedes Gel ein Proteingrößenstandard (Prestained Protein Ladder, BenchMarkTM) mitaufgetrennt.

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

4.3.7 Immobilisierung von Proteinen

Um Proteine aus SDS-PAGE-Gelen immunologisch oder radioaktiv detektieren zu können, müssen diese auf einen Trägerfilter (PVDF oder Nitrocellulose) übertragen werden. Eine einfache, effektive Methode stellt der nach Kyhse-Andersen, 1984 modifizierte Semi-dry Blot (Western Blot) dar. Hierfür wird eine PVDF-Membran in Gelgrösse mit Methanol aktiviert und in Transferpuffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris, 20 % (v / v) Methanol, 0,01 % (w / v) SDS) equilibriert, ebenso wie jeweils 6 Lagen Whatmann-Papier. Der Aufbau der Apparatur erfolgt analog der folgenden Abbildung.

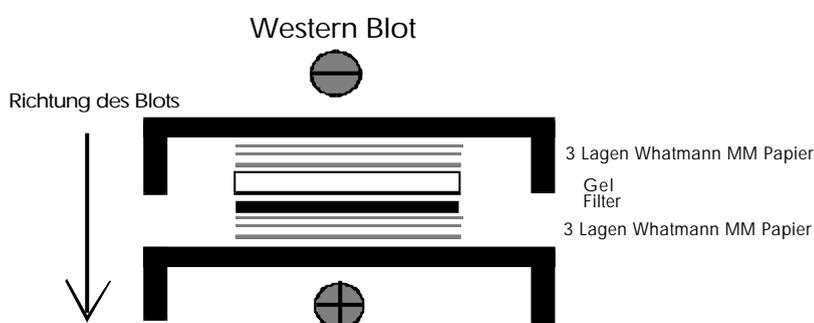


Abb. 4.3: Schematischer Aufbau eines Western Blots

4.3.8 Immunologische Detektion

Die Immunodetektion erfolgt mittels zweier Antikörper, wobei der Primärantikörper das zu detektierende Protein erkennt und der Sekundärantikörper, der mit dem Enzym Peroxidase gekoppelt ist, spezifisch an den Primärantikörper bindet. Die an den zweiten Antikörper gebundene Peroxidase katalysiert die Oxidation des Substrates Luminol. Bei dieser Reaktion kommt es zu einer Chemilumineszenz, die durch Belichtung eines Röntgenfilms nachgewiesen werden kann. Die Oberfläche der Membran wurde zu Beginn der Detektion mit unspezifischen Proteinen (Milchpulver) durch eine 2 h Inkubation mit TBS-T (Tris-buffered Saline; 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4 mit HCl mit 0,1 % Tween-20) mit 5 % Magermilchpulver abgesättigt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgt ebenfalls für

2 h in 20 ml TBS-T mit 5 % Magermilch. Der unspezifisch gebundene Antikörper wird durch dreimaliges 10 minütiges Waschen mit TBS-T entfernt. Vor der Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgt ein erneutes Blocken der Membran mit TBS-T mit 5 % Milchpulver für 1 h. Der Sekundärantikörper α -rabbit IgG (HRP-gekoppelt) wird 1:5000 verdünnt in 20 ml TBS-T mit 5 % Milchpulver eingesetzt. Zur Entfernung des unspezifisch gebundenen Antikörpers wird die Membran für 5 x 5 min mit TBS gewaschen. Alle Inkubationen erfolgten bei RT auf dem Schüttler. Zum indirekten Nachweis der Proteine wird der ECL⁺-Kit (EnhancedChemiLuminescence) der Firma Amersham verwendet. Die Signale werden durch die Exposition auf einem Röntgenfilm (Cronex 10T) dokumentiert. Die Entwicklung des Films erfolgte 5 min im Entwickler-Bad (LX24, Kodak), 5 min Stop-Bad und 5 min Fixier-Bad (AL4, Kodak)

4.3.9 EMSA

DNA-Fragmente, an die Proteine gebunden sind, zeigen in einem nativen Polyacrylamidgel ein anderes Laufverhalten als die entsprechende, ungebundene DNA. Der DNA-Proteinkomplex wandert aufgrund seines höheren Molekulargewichts langsamer als das proteinfreie Fragment. Diese Verzögerung wird auch als "Shift" bezeichnet. Man kann sich dieses Phänomen zunutze machen, um spezifische Bindungen von Proteinen an DNA-Fragmente zu charakterisieren. Hierzu wird das Fragment radioaktiv markiert und in einem geeigneten Puffer mit einem Proteinextrakt inkubiert. Nach abgeschlossener Elektrophorese kann das Gel getrocknet und eine Autoradiographie vorgenommen werden, um das Bandenmuster auszuwerten. Die Bindereaktion eines Ansatzes erfolgt in einem Volumen von 20 μ l. Dieses setzt sich zusammen aus 4 μ l Puffer F, 2 μ l Puffer D, 4 μ l radioaktiv markierten ds Oligonukleotiden (25 fmol), 2 μ l rekombinantem Protein oder 6 μ l Proteinextrakt und H₂O, wobei die Proteinkonzentration gegebenenfalls mit BSA (1mg / ml) abgeglichen wird. Die Bindereaktion erfolgt für 30 min bei RT und die Proben werden auf das native PAGE-Gel (10 ml 30 % PAA-Mix, 60 ml H₂O, 3,5 ml 10x TBE, 400 μ l APS, 40 μ l TEMED) aufgetragen. Als Laufpuffer dient 0,5 x TBE. Zur Kontrolle des Gellaufes wird der Ansatz mit dem freien Fragment mit BPB versetzt. Die Elektrophorese erfolgt bis die Front circa 4 / 5 des Gels durchlaufen hat. Zur Detektion wird das Gel auf einem Geltrockner 45 min bei 80 °C unter Unterdruck getrocknet und mit Hilfe eines IP-Screens und des Bioimagers (BAS-1000 von Fuji) und der Programme PCBAS[®]2.09 und TINA[®]2.0 der Firma Raytest ausgewertet.

4.3.9.1 Herstellen eines radioaktiv markierten DNA-Fragments für EMSA

Für die radioaktive Markierung von Oligonukleotiden wird das Enzym Polynukleotidkinase verwendet. Die PNK überträgt das γ -ständige, radioaktive Phosphat (P³²) auf das synthetische Oligonukleotid. Der Reaktionsansatz enthält: 2 pmol Oligonukleotide, 10x Kinase-Puffer für die forward reaction von MBI (zum Austausch von Phosphaten an isolierten DNA-Fragmenten) 10 units T4-Polynukleotidkinase und 25 μ Ci γ -[P³²]ATP (Hartmann SCP-401) in einem Reaktionsvolumen von 10 μ l. Der Ansatz wird 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschliessend werden die komplementären Oligonukleotide, wie im nächsten Absatz beschrieben, annealt. Das radioaktiv markierte Fragment wird nun mittels Gelfiltration über Micro Spin[™] G25 Säulen der Firma Pharmacia über eine Sephadexmatrix aufgereinigt. Nach der Aufreinigung wird das Fragment auf ein Volumen von 600-800 μ l verdünnt und je Ansatz 4 μ l [ca. 25 fmol mit 200-300 cpm) eingesetzt.

4.3.9.2 Annealen von Oligonukleotiden

Nach 10 min Kochen der komplementären Oligonukleotide zur Auflösung von Sekundärstrukturen erfolgt das gegenseitige Annealen durch langsames Senken der Temperatur. Die Temperatur wird jeweils in 15 min Inkubationsschritten von 65 °C auf 37 °C auf RT bis schliesslich auf 4 °C herabgesetzt. Eingesetzt werden je 1 nmol der Oligonukleotide in einem Reaktionsvolumen von 20 µl.

4.4 Ausmessen von Läsionsgrössen

Um Läsionsgrössen zu quantifizieren, wurden die Blätter fotografiert und 50 Läsionen im Programm "Corel Draw" vermessen. Mittels des Standards auf dem Bild konnten relative Grössen ausgemessen werden.

4.4.1 Formel für den Mittelwert

Der Mittelwert wurde mit der Funktion Mittelwert in MS Excel ausgerechnet.

4.4.2 Formel für die Standardabweichung

Die Standardabweichung wurde mit der Funktion StabwN in MS Excel ausgerechnet.

$$\text{Standardabweichung N} = \sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n^2}}$$

4.5 Verwendete Computerprogramme

VectorNTI Suite V 6.0 (InforMax, 2000)

VectorNTI ist ein umfangreiches Programm zur Bearbeitung von DNA- und Proteinsequenzdaten. Mit ihm wurden die Klonierungen geplant, Restriktionsmuster berechnet, Sequenzierungsergebnisse ausgewertet und Homologievergleiche durchgeführt.

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

Blast steht für Basic Local Alignment Search Tool. Dieses Programm wird benutzt, um Protein- und DNA-Datenbanken nach Sequenzen zu durchsuchen, die eine hohe Ähnlichkeit zu einer gegebenen Sequenz haben.

Adresse: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>

PCBAS®2.09 und TINA®2.0

Die Auswertung der Northern Blots erfolgt mit Hilfe der Programme PCBAS®2.09 und TINA®2.0 der Firma Raytest.

5 Ergebnisse

TEIL A

5.1 Isolierung zweier ERF-Transkriptionsfaktoren aus Tabak mit Hilfe des "Hefe-one-Hybrid"-Systems

Bereits in meiner Diplomarbeit wurde an der Identifizierung unbekannter Transkriptionsfaktoren, welche Gene der Pathogenabwehr regulieren, gearbeitet. Die gesuchten Proteine sollten an die C-Box, die H-Box oder die NF- κ B-Box binden. Letztere ist als notwendig für die Induktion des *PRI*-Gens in *Arabidopsis thaliana* beschrieben worden (Lebel *et al.*, 1998). Die H-Box ist als essentiell für die Regulation der Transkription des Gens der Chalconsynthase charakterisiert worden (Loake *et al.*, 1992). Dabei handelt es sich um ein Schlüsselenzym im Phenylpropanstoffwechsels. An das Motiv der C-Box bindet BZI1, ein bZIP-Transkriptionsfaktor, der im Rahmen der Pathogenabwehr eine Funktion übernimmt (Heinekamp *et al.*, 2002). Gesucht wurden Proteine, die nach Infektion einer Tabakzellkultur mit *Pseudomonas syringae*, oder Infektion von Tabakblättern mit TMV (Tobacco Mosaic Virus), im Vergleich zur uninfizierten Kontrolle, stärker an DNA binden. Mit Hilfe von South-Western Technik und EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) wurde die Bindung unbekannter Proteine aus Extrakten von infizierten mit nichtinfizierten Tabakblättern bzw. Tabakzellkulturen, an radioaktiv markierte Oligonukleotide verglichen.

Als Kontrolle für die Spezifität der Bindung wurde die K-Box (Kontroll-Box) verwendet, bei der die spezifische Bindestelle mutiert ist. Alle verwendeten Oligonukleotide haben um das variierte zentrale Motiv herum die gleichen flankierenden Sequenzen (Tabelle 5.1).

Tabelle 5.1: Zusammenfassung der Sequenz der verwendeten Oligonukleotide für South-Western und EMSA, zur Isolierung unbekannter DNA-bindender Proteine, die an der Regulation pathogen-induzierter Gene beteiligt sind.

K-Box	5' TAGATACAATT	AAGTAA	ATGTATCAT 3'
	3' CTATGTTAA	TTCATT	TACATAGTAAT 5'
C-Box	5' TAGATACAATT	GACGTC	ATGTATCAT 3'
	3' CTATGTTAA	CTGCAG	TACATAGTAAT 5'
H-Box	5' TAGATACAATT	CCTACC	ATGTATCAT 3'
	3' CTATGTTAA	GGATGG	TACATAGTAAT 5'
NF- κ B-Box	5' TAGATACAATT	GGGACTTTTCC	ATGTATCAT 3'
	3' CTATGTTAA	CCCTGAAAAGG	TACATAGTAAT 5'

Unerwartet war die spezifische, pathogeninduzierte Bindung zweier Proteine an die K-Box. Ein Protein, dessen DNA-Bindung nach Infektion der Tabakzellkultur mit *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* nach einer Stunde induziert wurde, hat eine Grösse von 70 kDa. Das zweite Protein, circa 38 kDa gross, liess sich drei Stunden nach der Infektion von Tabakblättern mit TMV durch Bindung an die K-Box nachweisen.

Um die unbekannt Proteine zu isolieren, wurde das "Hefe-one-Hybrid"-System verwendet (Li und Heskowitz, 1993). Damit können aus einer cDNA-Bibliothek Gene isoliert werden, die für Proteine kodieren, die an ausgewählte Sequenzen vor einem Reporter gen binden. Jedes Protein dieser Bibliothek ist mit der Aktivierungsdomäne des Hefetranskriptionsfaktors GAL4 fusioniert und aktiviert so, wenn es an DNA bindet, das Reporter gen. Die K-Box wurde im Vektor pHisi-1 in vierfacher Wiederholung vor das Reporter gen *HIS3* (Imidazol-Glyzerinphosphat-Dehydratase), und im Vektor pLacZi vor *lacZ* (β -Galaktosidase) inseriert. Diese Konstrukte wurden durch homologe Rekombination in das Genom des Hefestammes YM4271 eingefügt. Der Hefestamm, der beide Reporterstrukturen enthält, wird YM4271-32-60 genannt und kann nach erfolgreicher Rekombination auf Medium ohne Uracil und ohne Histidin wachsen. Die basale Aktivität der Imidazol-Glyzerinphosphat-Dehydratase in den Hefezellen wurde mit 45 mM 3AT (β -AminoHIS3-Gens über die basale Expression hinaus aktiviert. Mit dem beschriebenen Experiment wurden zwei unbekannte Transkriptionsfaktoren identifiziert. Sie gehören beide in die Familie der ERF-Faktoren. In dieser Familie sind zu diesem Zeitpunkt aus Tabak vier Proteine, NtERF1-4, bekannt, (Ohme-Takagi *et al.*, 1995), analog wurden die beiden Proteine NtERF5 und NtERF6 genannt.

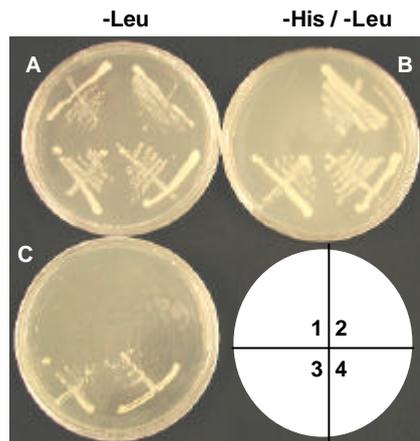


Abb. 5.1: Wachstum der Hefezellen YM4271-32-60 mit NtERF5, bzw. NtERF6 auf Selektivmedium (Das Experiment wurde dreimal wiederholt.)

- 1: Hefestamm YM4271-32-60
 - 2: Hefestamm YM4271-32-60 mit dem leeren Plasmid pGAD424
 - 3: Hefestamm YM4271-32-60 mit dem Plasmid pGAD424/NtERF6
 - 4: Hefestamm YM4271-32-60 mit dem Plasmid pGAD424/NtERF5
- A: Medium ohne Histidin
 B: Medium ohne Histidin, ohne Leucin
 C: Medium ohne Histidin, ohne Leucin, mit 45mM 3-AT

Die beiden Proteine NtERF5 und NtERF6 haben zwar das *HIS3*-Rportergen aktiviert, aber nicht das *lacZ*-Reportergen. Aufgrund der Klonierungsstrategie der vierfachen K-Box enthält der Bereich vor dem *HIS3*-Gen in Hefe weitere G / C reiche Sequenzen aus dem Plasmid pUK21. Diese befinden sich jedoch nicht vor dem *lacZ*-Gen, welches auch nicht aktiviert wurde (siehe Abbildung 5.2). Um die DNA-Bindung weiter zu charakterisieren wurden die Plasmide pGAD424 / NtERF5 und pGAD4242 / NtERF6 aus den Hefezellen isoliert und in einen anderen Hefestamm (YM4271-18) transformiert, der statt der K-Box die C-Box vor dem *HIS3*-Gen trägt. Die beiden ERF-Proteine aktivierten ebenfalls das Reportergen. Das *lacZ*-Reportergen wurde nicht in diesen Stamm integriert. Daraus wurde geschlossen, dass weder NtERF5 noch NtERF6 an das spezifische zentrale Motiv der K-Box binden, noch an einen Bereich der in den gemeinsamen flankierenden Sequenzen um das zentrale Motiv herum liegt. Das bedeutet, dass NtERF5 und NtERF6 vermutlich an den Bereich aus dem pUK21 binden (siehe Tabelle 5.2). Die weitere Charakterisierung der DNA-Bindung erfolgte mittels *in vitro* Bindestudien.

A

GAATTCGAAGCTTCTGCAGACGCGTCGACGTCA (K-Box)₄TGGATCCGATATCGCCGTGGCGGCCGCTCTAGA-*HIS3*
EcoRI *XbaI*

B

GAATTCGAAGCTTCTGCAGACGCGTCGACGTCA (K-Box)₄TGGATCCGATATC-*lacZ*
EcoRI *EcoRV*

Abb. 5.2: Sequenz der *HIS3* und *lacZ* Reporterengenkonstrukte im Hefestamm YM4271-32-60

A: Sequenz vor dem *HIS3* Reporter gen bei Verwendung der Schnittstellen *EcoRI* und *XbaI* zur Klonierung der vierfachen K-Box in den Vektor pHISi1. Fett dargestellt sind die zusätzlichen G / C reichen Sequenzen des intermediären Kloniervektors pUK21.

B: Sequenz vor dem *lacZ* Reporter gen bei Verwendung der Schnittstellen *EcoRI* und *EcoRV* zur Klonierung der vierfachen K-Box in den Vektor pLacZi.

Tabelle 5.2: Zusammenfassung der Aktivierung der Reporter gene *HIS3* und *lacZ* im Hefestamm YM4271-32-60 (multimerisierten K-Box), verglichen mit dem Hefestamm YM4271-18 (multimerisierten C-Box). n.t. = nicht getestet; + = Aktivierung des Reporter gens; - = keine Aktivierung des Reporter gens

	<i>HIS3</i>		<i>lacZ</i>	
	K-Box	C-Box	K-Box	C-Box
pGAD424	-	-	-	n.t.
pGAD424 / NtERF5	+	+	-	n.t.
pGAD424 / NtERF6	+	+	-	n.t.

NtERF5 ist aminoterminal mit der GAL4-Aktivierungsdomäne fusioniert. Um sicherzustellen, dass es sich um den gesamten Kodierbereich von NtERF5 handelt, wurde aus einer cDNA-Bibliothek der 5'-Bereich des Gens von NtERF5 mit einer RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) amplifiziert. Ein weiteres Startkodon wurde innerhalb der Leserahmens nicht gefunden (Sequenz siehe Anhang).

E F G T R K H Q K **M** S S N S S P L E I D T

1 GAA TTC GGC ACG AGA AAA CAC CAA AAG **ATG** TCA AGT AAC TCA AGC CCA CTA GAA ATA GAC ACT
 CTT AAG CCG TGC TCT TTT GTG GTT TTC TAC AGT TCA TTG AGT TCG GGT GAT CTT TAT CTG TGA
 S F S H S N F F F L Q D Q S P I L Q W D D

64 TCA TTT TCA CAT TCC AAC TTC TTC TTT CTC CAA GAT CAA TCA CCA ATT TTA CAA TGG GAT GAT
 AGT AAA AGT GTA AGG TTG AAG AAG AAA GAG GTT CTA GTT AGT GGT TAA AAT GTT ACC CTA CTA
 D L F F N D P W F D D D Q S P I I P C N S

127 GAT CTT TTC TTC AAT GAT CCA TGG TTT GAT GAT GAT CAA TCA CCA ATT ATA CCA TGT AAC TCA
 CTA GAA AAG AAG TTA CTA GGT ACC AAA CTA CTA CTA GTT AGT GGT TAA TAT GGT ACA TTG AGT
 E K D E N H Q V F E E S S D N T I M S K G

190 GAG AAA GAT GAA AAT CAT CAA GTA TTT GAA GAA TCC TCA GAC AAT ACA ATC ATG TCA AAA GGA
 CTC TTT CTA CTT TTA GTA GTT CAT AAA CTT CTT AGG AGT CTG TTA TGT TAG TAC AGT TTT CCT
 548 pER1

S S H G Q E L E E V T S Q E E K E K E E E

253 AGT AGC CAT GGT CAA GAA TTA GAA GAG GTA ACA TCC CAA GAA GAA AAA GAA AAA GAA GAA GAA
 TCA TCG GTA CCA GTT CTT AAT CTT CTC CAT TGT AGG GTT CTT CTT TTT CTT TTT CTT CTT CTT
 E K H Y I G V R K R P W G K Y A A E I R D

316 GAA AAA CAC TAT ATA GGA GTT AGA AAA AGG CCA TGG GGT AAA TAT GCA GCA ATA AGA GAT
 CTT TTT GTG ATA TAT CCT CAA TCT TTT TCC GGT ACC CCA TTT ATA CGT CGT CTT TAT TCT CTA
 504 pER4

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

379 TCA ACA AGA AAT GGA ATT AGG GTT TGG TTA GGG ACA TTT GAT ACA GCT GAA GAA GCT GCT TTA
AGT TGT TCT TTA CCT TAA TCC CAA ACC AAT CCC TGT AAA CTA TGT CGA CTT CTT CGA CGA AAT
A Y D Q A A L S M R G P W S L L N F P L E

442 GCT TAT GAT CAA GCT GCA TTA TCG ATG AGA GGT CCT TGG TCT CTT CTT AAT TTT CCA TTG GAG
 CGA ATA CTA GTT CGA CGT AAT AGC TAC TCT CCA GGA ACC AGA GAA GAA TTA AAA GGT AAC CTC
 523 pNt5RACE

K V K K S L E K I E Y S C K D G L S P A A

505 AAA GTC AAG AAA TCA CTT GAA AAA ATT GAG TAT TCT TGT AAA GAT GGA TTG TCT CCT GCT GCT
 TTT CAG TTC TTT AGT GAA CTT TTT TAA CTC ATA AGA ACA TTT CTA CCT AAC AGA GGA CGA CGA
 V L K A T H K T R R V K H K R S S R K K K

568 GTT CTA AAA GCT ACT CAT AAA ACA AGG AGA GTG AAG CAT AAA AGA AGT AGT AGA AAG AAA AAG
 CAA GAT TTT CGA TGA GTA TTT TGT TCC TCT CAC TTC GTA TTT TCT TCA TCA TCT TTC TTT TTC
 N K E T H N V I V F E D L G A E L L E E L

631 AAT AAA GAA ACT CAT AAT GTT ATT GTT TTT GAG GAC TTG GGT GCT GAG TTA TTA GAA GAG CTT
 TTA TTT CTT TGA GTA TTA CAA TAA CAA AAA CTC CTG AAC CCA CGA CTC AAT AAT CTT CTC GAA
 502 pER3

L M T S S Q H S C R R D *

694 TTA ATG ACT TCA TCA CAA CAT TCG TGT CGA AGG GAC TGA
 AAT TAC TGA AGT AGT GTT GTA AGC ACA GCT TCC CTG ACT

Abb. 5.3: Basensequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von NtERF5

Fett dargestellt ist das Startkodon und die AP2-Domäne. Markiert sind die verwendeten Primer. Grau dargestellt ist die *EcoRI* Schnittstelle des Vektors pGAD424.

NtERF6 war hingegen nicht mit der Aktivierungsdomäne fusioniert und muss folglich eine eigene Aktivierungsdomäne besitzen, mit der es das Reporter gen aktiviert. Es handelt sich hier um die Vollängensequenz, da Start- und Stopkodon vorhanden sind.

E F G T S L D T F S V K K K E V Y S V K N

1 GAA TTC GGC ACG AGT CTA GAT ACA TTT TCC GTA AAA AAG AAA GAA GTT TAC TCC GTC AAA AAC
 CTT AAG CCG TGC TCA GAT CTA TGT AAA AGG CAT TTT TTC TTT CTT CAA ATG AGG CAG TTT TTG

E T D F C I K L F C * E K T K S **M** C G G A

64 GAA ACT GAT TTC TGC ATA AAA CTT TTC TGC TGA GAG AAA ACA AAA AGC **ATG** TGT GGT GGT GCT
 CTT TGA CTA AAG ACG TAT TTT GAA AAG ACG ACT CTC TTT TGT TTT TCG TAC ACA CCA CCA CGA
 I I S D Y I A P S R T S R R L T A E L L W

127 ATA ATC TCC GAT TAC ATT GCC CCG AGC CGA ACT TCT CGC CGG CTC ACC GCC GAG TTG CTA TGG
 TAT TAG AGG CTA ATG TAA CGG GGC TCG GCT TGA AGA GCG GCC GAG TGG CGG CTC AAC GAT ACC
 G R S D L S N K Q K N P N N Y H S K P L R

190 GGC CGG TCC GAT CTG AGT AAT AAG CAA AAA AAT CCT AAC AAT TAT CAC TCC AAG CCG TTG AGA
 CCG GCC AGG CTA GAC TCA TTA TTC GTT TTT TTA GGA TTG TTA ATA GTG AGG TTC GGC AAC TCT
 S Q V V D L D D D F E A D F Q D F K D F S

253 TCC CAA GTA GTT GAC CTA GAC GAT GAC TTC GAG GCT GAT TTT CAG GAC TTT AAA GAT TTC TCC
 AGG GTT CAT CAA CTG GAT CTG CTA CTG AAG CTC CGA CTA AAA GTC CTG AAA TTT CTA AAG AGG

543PER30-1

316 D D E D V Q V D V K P F A F S A S K N S N
GAT GAC GAG GAT GTT CAA GTC GAT GTC AAG CCA TTT GCC TTC TCT GCT TCG AAA AAC TCT AAT
CTA CTG CTC CTA CAA GTT CAG CTA CAG TTC GGT AAA CGG AAG AGA CGA AGC TTT TTG AGA TTA

V E G S K S V K T D D S D K D A D R S F K
379 GTT GAA GGC TCC AAA TCT GTG AAA ACT GAT GAT TCA GAC AAG GAT GCT GAT AGA TCC TTT AAG
CAA CTT CCG AGG TTT AGA CAC TTT TGA CTA CTA AGT CTG TTC CTA CGA CTA TCT AGG AAA TTC
R K R K N Q Y R G I R Q R P W G K W A A E

442 AGA AAG AGG AAG AAT CAG TAT AGG GGG ATC AGA CAG CGA CNT TGG GGT AAG TGG GCA GCT GAA
TCT TTC TCC TTC TTA GTC ATA TCC CCC TAG TCT GTC GCT GNA ACC CCA TTC ACC CGT CGA CTT

501 pER30-3

I R D P R K G V R V W L G T F N T A E E A
505 ATA CGT GAC CCA AGA AAA GGG GTT CGG GTG TGG CTG GGA ACT TTC AAT ACT GCA GAA GAA GCT
TAT GCA CTG GGT TCT TTT CCC CAA GCC CAC ACC GAC CCT TGA AAG TTA TGA CGT CTT CTT CGA

500 pER30-2

A R A Y D V E A R R I R G N K A K V N F P
568 GCC AGA GCT TAT GAT GTT GAG GCT AGG AGG ATC AGA GGC AAT AAA GCT AAG GTA AAC TTT CCC
CGG TCT CGA ATA CTA CAA CTC CGA TCC TAG TCT CCG TTA TTT CGA TTC CAT TTG AAA GGG

D E A P V P A S R R T V K V N P Q K V L P
631 GAT GAA GCT CCA GTG CCT GCC TCG AGA CGT ACT GTT AAG GTG AAT CCT CAA AAG GTC CTT CCT
CTA CTT CGA GGT CAC GGA CGG AGC TCT GCA TGA CAA TTC CAC TTA GGA GTT TTC CAG GAA GGA
K E I L D S V Q P D S T I I N N M E D C C

694 AAG GAG ATC CTG GAC TCG GTT CAG CCC GAC TCG ACT ATC ATA AAC AAC ATG GAG GAT TGC TGT
TTC CTC TAG GAC CTG AGC CAA GTC GGG CTG AGC TGA TAG TAT TTG TTG TAC CTC CTA ACG ACA
Y D S L G F L E E K P M T K Q F G C E D G

757 TAT GAT TCT TTG GGA TTT CTT GAA GAG AAA CCC ATG ACG AAG CAG TTT GGA TGT GAG GAT GGG
ATA CTA AGA AAC CCT AAA GAA CTT CTC TTT GGG TAC TGC TTC GTC AAA CCT ACA CTC CTA CCC

522 pER6

S S A S G D T G F G S F A P S A G T D I Y
820 AGC AGT GCT TCT GGA GAT ACG GGA TTT GGC TCA TTT GCC CCT TCA GCT GGT ACC GAT ATC TAC
TCG TCA CGA AGA CCT CTA TGC CCT AAA CCG AGT AAA CGG GGA AGT CGA CCA TGG CTA TAG ATG
F N S D V G S N S F D C S D F G W G E P C

883 TTC AAC TCT GAT GTT GGA AGT AAC TCT TTT GAC TGC TCT GAT TTT GGT TGG GGA GAG CCA TGT
AAG TTG AGA TTA CAA CCT TCA TTG AGA AAA CTG ACG AGA CCA ACC CCT CTC GGT ACA

A R T P E I S S V L S A V I E S N E S Q L
946 GCC AGG ACT CCA GAG ATA TCA TCC GTT CTG TCA GCT GTT ATT GAA AGC AAT GAA TCT CAA CTT
CGG TCC TGA GGT CTC TAT AGT AGG CAA GAC AGT CGA CAA TAA CTT TCG TTA CTT AGA GTT GAA
V E D D T S P M K K L K S S P I N P V A D

1009 GTT GAA GAT GAT ACC AGT CCA ATG AAA AAA CTG AAA TCA AGC CCC ATT AAT CCA GTA GCT GAT
CAA CTT CTA CTA TGG TCA GGT TAC TTT TTT GAC TTT AGT TCG GGG TAA TTA GGT CAT CGA CTA
D G N T A N K L S E E L S A F E T Q M K F

1072 GAT GGA AAT ACC GCA AAC AAG CTA TCT GAA GAG CTT TCA GCT TTT GAA ACC CAG ATG AAG TTC
CTA CCT TTA TGG CGT TTG TTC GAT AGA CTT CTC GAA AGT CGA AAA CTT TGG GTC TAC TTC AAG

544 30-7

L Q I P Y L E G N W D A S V D T F L N S S
1135 CTT CAG ATC CCC TAT CTG GAG GGA AAT TGG GAT GCA TCA GTT GAT ACT TTC CTC AAC TCA AGT
GAA GTC TAG GGG ATA GAC CTC CCT TTA ACC CTA CGT AGT CAA CTA TGA AAG GAG TTG AGT TCA
A T Q D G D N A M D L W S F D A S V D T F

1198 GCA ACT CAG GAT GGT GAT AAT GCT ATG GAC TTA TGG TCC TTT GAT GCA TCA GTT GAT ACT TTC
CGT TGA GTC CTA CCA CTA TTA CGA TAC CTG AAT ACC AGG AAA CTA CGT AGT CAA CTA TGA AAG
L N S S A T Q D G D N A M D L W S F D D V

1261 CTC AAC TCA AGT GCA ACT CAG GAT GGT GAT AAT GCT ATG GAC TTA TGG TCC TTT GAT GAT GTT
GAG TTG AGT TCA CGT TGA GTC CTA CCA CTA TTA CGA TAC CTG AAT ACC AGG AAA CTA CTA CAA
P S L L G G V F *

1324 CCT TCT TTA TTG GGA GGT GTC TTT TAA
GGA AGA AAT AAC CCT CCA CAG AAA ATT

Abb. 5.4: Basensequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von NtERF6

Fett dargestellt ist das Stop- und Startkodon und die AP2-Domäne. Markiert sind die verwendeten Primer. Grau dargestellt ist die *EcoRI* Schnittstelle des Vektors pGAD424.

Für die weitere Charakterisierung der Transkriptionsfaktoren war es nötig, ihre Bindung an DNA in einem alternativen System nachzuweisen.

5.2 Charakterisierung der DNA-Bindung von NtERF5 mit Hilfe von *in vitro* Bindestudien

Eine Möglichkeit zum Nachweis von DNA-Bindung *in vitro* ist der EMSA. Dafür benötigt man eine geringe Menge Protein und ein radioaktiv markiertes DNA-Fragment. Binden diese beiden Moleküle aneinander, so durchläuft der DNA-Protein-Komplex das native Agarosegel langsamer als das DNA-Fragment alleine und die DNA-Bindung kann so nachgewiesen werden.

Gene lassen sich *in vitro* leicht transkribieren, mit Hilfe des Kaninchen-Retikulozyten Systems kann man die mRNA in kleinen Mengen *in vitro* exprimieren. Um die Translation zu überprüfen, wurde in einem Ansatz mit [³⁵S] markiertem Methionin gearbeitet. Als Positivkontrolle wurde TGA2.1 translatiert. AtERF1 diente später als Positivkontrolle für die DNA-Bindung (Fujimoto *et al.*, 2000). Die *in vitro* Transkription der Gene verlief zuverlässig (Abbildung 5.5A). In wiederholten Ansätzen wurde versucht, die Proteine NtERF5, NtERF6 und AtERF1 zu exprimieren. Im Gegensatz zum Kontrollansatz mit TGA2.1, gelang dies jedoch nicht (Abbildung 5.5B). Um die Translation von NtERF5 zu optimieren, wurde die Kozak-Sequenz vor das Startkodon integriert. Aber auch mit diesem Konstrukt gelang die *in vitro* Translation nicht in nachweisbaren Mengen.

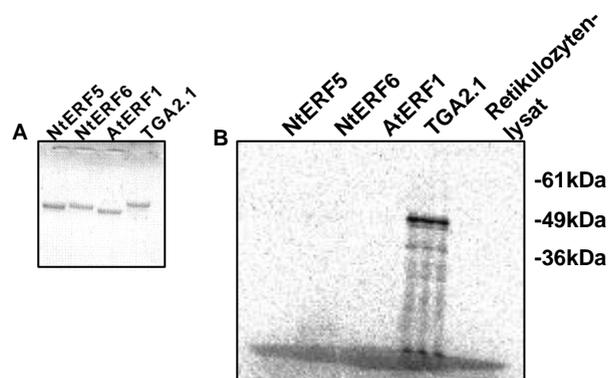


Abb. 5.5: *In vitro* Transkription und Translation von NtERF5 und NtERF6 (Das Experiment wurde dreimal wiederholt.)

A: Agarosegel mit der *in vitro* transkribierten RNA von NtERF5, NtERF6, AtERF1 und TGA2.1

B: SDS-PAGE mit den *in vitro* translatierten, [³⁵S]-markierten Proteinen.

Daraufhin wurde NtERF5 rekombinant in *E. coli* exprimiert. Die cDNA von NtERF5, wie auch die Positivkontrolle AtERF1, wurden in einen Expressionsvektor inseriert, so dass bei der Translation aminoterminal eine Fusion mit sechs Histidinen (6xHis-tag) entsteht (Porath *et al.*, 1975). Der 6xHis-tag diente zur späteren Aufreinigung der rekombinanten Proteine aus dem Bakterienlysate. Die Elution des markierten Proteins von der Matrix, erfolgte mit Hilfe

von höheren Imidazolkonzentrationen oder durch die Absenkung des pH-Wertes auf 5,9 (Sulkowsky, 1985).

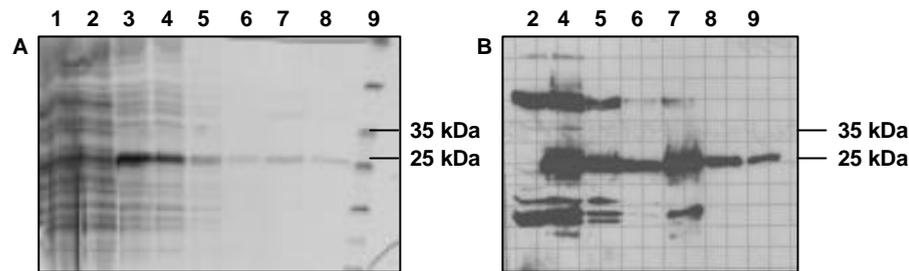


Abb. 5.6: Expression von NtERF5 in *E. coli* und Aufreinigung des rekombinanten Proteins (Das Experiment wurde dreimal wiederholt.)

A: Expression von NtERF5 in *E. coli*

- 1: Pellet der uninduzierten, lysierten Kontrollkultur
- 2: Überstand der uninduzierten, lysierten Kontrollkultur
- 3: Pellet der lysierten, mit 1 mM IPTG induzierten Expressionskultur
- 4: Überstand der lysierten, mit 1 mM IPTG induzierten Expressionskultur
- 5: Überstand über dem Pellet der Suspension aus induzierter, lysierter Kultur und NiNTA-Agarose nach 12 stündiger Bindung bei 4 °C
- 6: Waschfraktion der Suspension aus induzierter, lysierter Kultur und NiNTA-Agarose mit Lysispuffer mit 10 mM Imidazol.
- 7: Elutionsfraktion von NtERF5 von der NiNTA Agarose mit Puffer mit 250 mM Imidazol.
- 8: Elutionsfraktion von NtERF5 von der NiNTA Agarose mit Puffer mit 400 mM Imidazol.
- 9: Proteingrößenstandard

B: Nachweis der Expression und Aufreinigung von NtERF5 über Western Blot mit α 6xHIS-Antikörper 2,4,5,6,7,8 wie in A

9: NtERF5 nach der Dialyse. Es wurden jeweils 10 μ l aufgetragen

Um die grundsätzliche Durchführung des EMSA zu testen, wurde erst die Positivkontrolle AtERF1 benutzt, die an die GCC-Box (TAGCCGCC) bindet (Fujimoto *et al.*, 2000). AtERF1 bindet an die GCC-Box, sowohl wenn das unaufgereinigte Lysat der Expressionskultur im EMSA eingesetzt wird, als auch nachdem das rekombinante Protein aufgereinigt wurde.

Abgeleitet aus der Aminosäuresequenz, sollten NtERF5 und NtERF6 an die GCC-Box binden, da sie die notwendigen, konservierten Aminosäuren der ERF-Domäne besitzen (Sakuma *et al.*, 2002; Hao *et al.*, 2002) (siehe auch Einleitung). Im Coomassie-gefärbten SDS-Gel wurden die eingesetzten Proteinmengen gegeneinander abgeschätzt (Abbildung 5.7A). Aus den DNA-Bindestudien mittels EMSA wurde ersichtlich, dass unter den gewählten Bedingungen NtERF5 nur sehr schwach an die GCC-Box bindet. Trotz des Einsatzes vergleichbarer Mengen unaufgereinigten Proteins von AtERF1 und NtERF5, war nur ein sehr geringe Menge NtERF5-DNA-Komplex im EMSA nachzuweisen (Abbildung

5.7A / B; Spur 8 und 10). Wurde NtERF5 aufgereinigt, so war eine DNA-Bindung, auch durch steigende Mengen eingesetzten Proteins, nicht mehr nachweisbar (Abbildung 5.7A / B; Spur 4-6). Eine geringe Menge aufgereinigten Proteins war jedoch ausreichend, um eine DNA-Bindung von AtERF1 nachzuweisen (Abbildung 5.7A / B; Spur 2, 3).

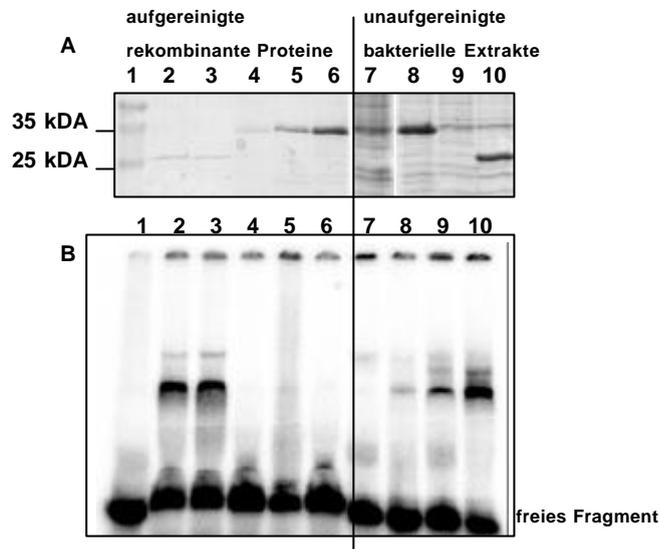


Abb. 5.7: *In vitro* Bindung von NtERF5 mit Hilfe von EMSA (Das Experiment wurde dreimal wiederholt.)

A: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel mit unangereicherten und aufgereinigten Fraktionen von NtERF5 und AtERF1.

1: Proteingrößenstandard

2 und 3: Elution von AtERF1 mittels pH 5,9.

4-6: Elutionsfraktionen von NtERF5 mittels pH 5,9.

7: Überstand der uninduzierten, lysierten Kontrollkultur von NtERF5.

8: Überstand der induzierten, lysierten Kultur von NtERF5.

9: Überstand der uninduzierten, lysierten Kontrollkultur von AtERF1.

10: Überstand der induzierten, lysierten Kultur von AtERF1. Es wurden je 15 µl aufgetragen.

B: EMSA mit den in A gezeigten Fraktionen und der GCC-Box aus dem Promotor von HLS1-29 (Fujimoto *et al.*, 2000)

1: freies Fragment alleine

2-10 wie in A. Es wurden je 5 µl Probe eingesetzt.

Eine mögliche Bindestelle von NtERF5 war die G / C-reiche Sequenz aus dem Plasmid pUK21 (siehe Abbildung 5.2) jedoch konnte ebenfalls keine Bindung gezeigt werden.

Weiterhin wurden die in Tabelle 5.3 aufgeführten DNA-Fragmente im EMSA verwendet. Jedoch auch mit diesen Sequenzen konnte eine DNA-Bindung von NtERF5 nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 5.3: Auflistung, der im EMSA verwendeten DNA Fragmente.

+ = Protein-DNA-Bindung; - = keine Protein-DNA-Bindung

		NtERF5	AtERF1
GCC 16 F/R (Hao <i>et al.</i> , 1998)	CAT AAG AGC CGC CAC T GTA TTC TCG GCG GTG A	-	+
GCCGCC F/R HLS1-29 (Fujimoto <i>et al.</i> , 2000)	ATG AGT TAA CGC AGA CAT AGC CGC CAT TT TAC TCA ATT GCG TCT GTA TCG GCG GTA AA	+	+
DREB F/R (Sakuma <i>et al.</i> , 2002)	ATG AGT TAA CGC AGA CAT ATA CCG ACA TAT TT TAC TCA ATT GCG TCT GTA TAT GGC TGT ATA AA	-	-
MCS pUK21 F/R (Hefescreen)	TGG ATC CGA TAT CGC CGT GGC GGC CGC TCT AGA ACC TAG GCT ATA GCG GCA CCG CCG GCG AGA TCT	-	-
K-Box	TAG ATA CAA TTA AGT AAA TGT ATC AT C TAT GTT AAT TCA TTT ACA TAG TAA T	-	-

Zur Klärung der DNA-Bindung wurden aus den Hefestämmen, die NtERF5 und NtERF6 exprimieren, native Gesamtproteinextrakte gewonnen und 5 µl davon für den EMSA verwendet. Eine ERF-spezifische DNA-Bindung an die GCC-Box konnte bei den Extrakten, die NtERF5 und NtERF6 enthalten, im Vergleich zur Kontrolle nicht beobachtet werden.

In der Arbeitsgruppe um Xue (2003) wurde gezeigt, dass sowohl in transienten Assays, als auch im EMSA, das Protein der DREB-Familie HvCBF2 erst bei tieferen Temperaturen (10°C-0°C) an die DREB-Box bindet. Versuche, diesen Effekt bei 4 °C auch für NtERF5 nachzuvollziehen, waren jedoch nicht erfolgreich.

Zusammenfassend kann mit den DNA-Bindungsstudien gezeigt werden, dass NtERF5 nur unaufgereinigt und in grossen, eingesetzten Mengen an die GCC-Box bindet.

5.3 Transkriptionsmuster von *NtERF5* und *NtERF6* in Tabak

Die bisher unbekanntenen Gene *NtERF5* und *NtERF6* wurden aus einer Tabakblatt-cDNA-Bibliothek isoliert. Einen ersten Hinweis auf ihre Funktion könnte die Untersuchung der Expression in verschiedenen Geweben geben.

Bei dieser Arbeit lag der Schwerpunkt auf der Pathogenabwehr von Tabak und *Arabidopsis*. Die Induzierbarkeit von NtERF5 und NtERF6 nach Infektion von Tabak mit Pseudomonaden und TMV war darum besonders interessant. Ebenso interessant ist welche Signaltransduktionkaskade und welche Signalmoleküle im Zuge der Pathogenabwehr, ihre Induktion bewirken.

5.3.1 Gewebespezifische Transkription von *NtERF5* und *NtERF6*

Um die Expression der Proteine in verschiedenen Geweben zu untersuchen, wurde daraus RNA isoliert.

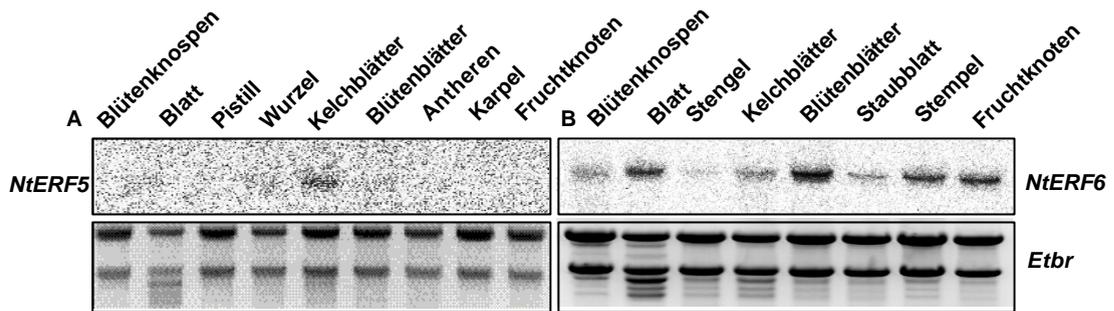


Abb. 5.8: Northern Blot mit RNA aus verschiedenen Tabakgeweben (Das Experiment wurde zweimal ausgeführt.)

A: Hybridisierung des Filters mit der Sonde für *NtERF5*

B: Hybridisierung des Filters mit der Sonde für *NtERF6*

Aus Abbildung 5.8 wird ersichtlich, dass *NtERF5* lediglich schwach in den Kelchblättern transkribiert wurde. Im Vergleich zu *NtERF5* wurde *NtERF6* in den Blütenblättern stärker transkribiert und darüberhinaus im Blatt, Stempel und Fruchtknoten stark transkribiert. In den Blütenknospen, dem Kelch und den Staubblättern war eine leichte Transkription zu erkennen. Diese unterschiedlich starke Transkription liess jedoch noch keinen Schluss auf eine Funktion im Rahmen der Pathogenabwehr zu.

5.3.2 Induktion der Transkription von *NtERF5* und *NtERF6* durch Signalmoleküle aus der Signalkette der Pathogenabwehr

NtERF5 und *NtERF6* gehören beide in die Familie der ERF-Faktoren. Für einige Proteine aus dieser Familie ist eine Beteiligung an der Regulation von PR-Genen (Pathogenesis Related) gezeigt worden (Riechmann *et al.*, 1998). Die Pathogenabwehr wird über Signaltransduktionswege geregelt, in denen Salizylsäure, Ethylen oder Jasmonsäure wichtige Botenstoffe sind, so sind z.B. *NtERF1-4* aus Tabak durch Ethephon (2-Chloroethylphosphonsäure; Yang, 1969), aus dem spontan Ethylen frei wird, induzierbar (Ohme-Takagi und Shinshi, 1995). Um die Funktion von *NtERF5* und *NtERF6* in einen der Signaltransduktionswege der Abwehr in der Pflanze einzuordnen, wurden Blätter von Wildtyp tabakpflanzen mit Salizylsäure, mit Methyljasmonat oder mit Ethephon behandelt. Aus dem Probenmaterial wurde RNA isoliert, um die Transkriptionsstärke von *NtERF5* und *NtERF6* im Northern Blot zu verfolgen.

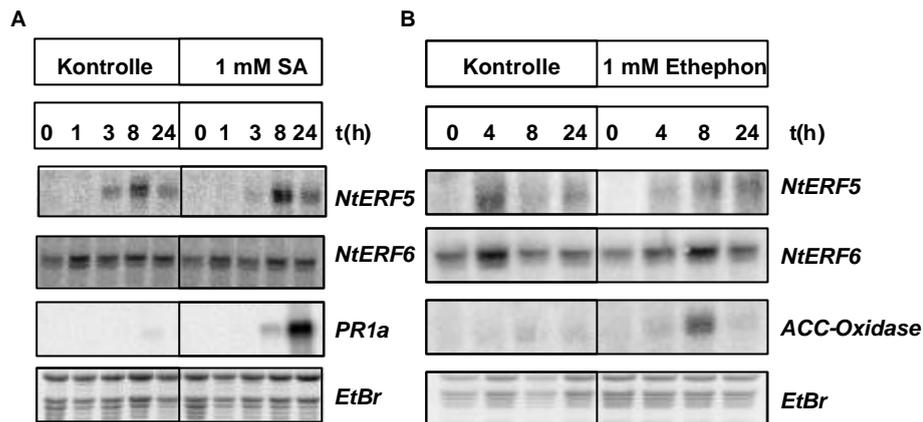


Abb. 5.9: Northern Blot zur Analyse der Transkription von *NtERF5* und *NtERF6* nach Applikation von Salizylsäure oder Ethephon. (Das Experiment wurde dreimal wiederholt.)

A: Northern Blot mit RNA aus Tabak SNN Blattscheiben, die auf Puffer mit 1 mM Salizylsäure (SA) gelegt wurden. Die Kontrolle wurden mit Puffer ohne Salizylsäure behandelt.

B: Northern Blot mit RNA aus Tabak SNN Blättern, die mit 1 mM Ethephon besprüht wurden. Die Kontrolle wurde mit Puffer ohne Salizylsäure behandelt.

Bei den in Abbildung 5.9A gezeigten Experimenten wurden Blattscheiben auf Puffer mit 1 mM Salizylsäure (SA) gelegt. Salizylsäure induziert die Transkription von PR-Genen wie *PR1a* (Pathogenesis Related 1 acidic) (Uknes *et al.*, 1992) daher diente *PR1a* hier als Positivkontrolle für die Behandlung mit Salizylsäure.

Die Transkription von *NtERF5* war nach acht Stunden maximal und liess nach 24 Stunden wieder nach, eine vergleichbare Transkriptionskinetik zeigt die Kontrolle. Es liess sich kein Einfluss von Salizylsäure auf die Transkription von *NtERF5* feststellen. Der transiente Anstieg der RNA-Menge bei *NtERF5* nach acht Stunden und bei *NtERF6* bereits nach drei Stunden, wurde offensichtlich durch die Verletzung der Blätter beim Ausstanzen der Blattscheiben verursacht. *NtERF6* blieb in seiner Transkriptionsstärke durch Salizylsäure ebenfalls unbeeinflusst.

Bei den in Abbildung 5.9B gezeigten Experimenten wurden Tabak-SNN-Pflanzen mit Ethephon besprüht. Als Positivkontrolle wurde das Gen *ACC* (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid)-*Oxidase*, das für ein Schlüsselenzym der Ethylensynthese kodiert, genutzt. Ähnlich wie in 5.8A stieg die RNA-Menge von *NtERF5* nach vier bis acht Stunden an. Da dies auch in der Kontrolle zu beobachten war, war die Transkription von *NtERF5* wohl nicht spezifisch durch Ethephon beeinflusst. *NtERF6* war durch Ethephon ebenfalls nicht in seiner Transkriptionsstärke verändert. Auch hier lag die Ursache der Transkriptzunahme in der Verletzung der Pflanze beim Ausstanzen der Blattscheiben für die Probennahme. Die

Versuche mit Methyljasmonat (Daten nicht gezeigt) zeigten ebenfalls keine spezifische Veränderung der Transkription von *NtERF5* und *NtERF6* im Vergleich mit der Kontrolle.

5.3.3 Induktion von *NtERF5* und *NtERF6* durch Verwundung

Bisher wurde die Induktion der beiden Transkriptionsfaktoren durch Signalmoleküle, die eine Pathogenabwehr auslösen, untersucht. Verwundung, wie beispielsweise durch Insektenfrass, ist ein Signal für die Pflanze, auf das sie reagieren muss, um das Gewebe vor grösserem Schaden zu bewahren. Mechanische Verletzung von Blattgewebe geht oft einher mit Infektionen der Pflanzen durch Mikroorganismen, die dann leichter in die Pflanze eindringen können. In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass einige ERF-Gene nach Verwundung 5.10 stärker exprimiert werden (Nishiuchi *et al.*, 2002).

In der Abbildung wird gezeigt, dass *NtERF5* und *NtERF6* auf verschiedene mechanische Reize unterschiedlich reagieren. Dazu wurden Blattscheiben auf Puffer aufgelegt (Abbildung 5.10A). Durch die Verletzung beim Ausstanzen der Blattscheiben wurde *NtERF5* nach drei Stunden leicht und nach acht Stunden deutlich induziert, nach 24 Stunden war die Transkriptmenge wieder reduziert. *NtERF6* reagierte nur sehr schwach nach einer Stunde und nahm dann wieder ab. Bei Abbildung 5.10B wurde das Blatt verletzt indem Wasser von der Blattunterseite in den Apoplasten gespritzt wurde. Nach einer Stunde wurden *NtERF5* und *NtERF6* dadurch vorübergehend leicht induziert. Basierend auf der Veröffentlichung von Nishiuchi *et al.*, 2002 wurde untersucht, ob es ein nach Verwundung ein mobiles Signalmolekül in den nichtverwundeten Bereich der Pflanze vordringt, das die Transkription von *NtERF5* und *NtERF6* reguliert. Bei den Proben in Abbildung 5.10C wurde die Blattoberfläche mit Carborundum eingerieben. Dabei nahm die Transkriptmenge von *NtERF5* nach 30 Minuten für zwei Stunden ganz leicht zu. *NtERF6* blieb unverändert. Für den Versuch in Abbildung 5.10D wurde bei sieben Pflanzen ein unteres Blatt abgeschnitten, zu den indizierten sieben Zeitpunkten wurde ein oberes Blatt geerntet. Die Transkriptmenge von *NtERF5* und *NtERF6* im oberen Teil der Pflanze blieb jedoch von der Verletzung im unteren Teil der Pflanze unbeeinflusst.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass *NtERF5* und *NtERF6* beide schnell und vorübergehend nach Verletzungen innerhalb des Blattes, lokal induziert werden.

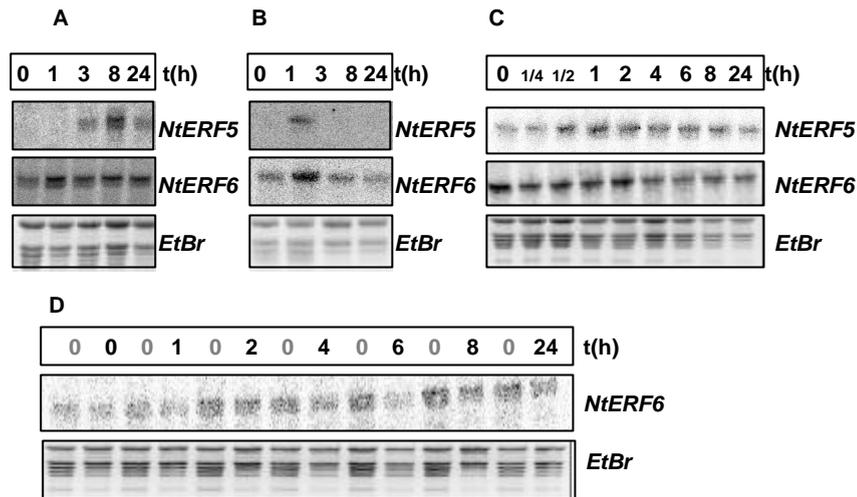


Abb. 5.10: Induktion von *NtERF5* und *NtERF6* durch verschiedene Verwundungen

A: Verwundung durch Ausstanzen von Blattscheiben aus SNN-Pflanze. (Das Experiment wurde dreimal wiederholt.)

B: Verwundung der Blätter von W38-Pflanzen durch Einspritzen von Wasser in den Apoplasten von der Blattunterseite. (Das Experiment wurde zweimal wiederholt.)

C: Verwundung der Blattoberfläche von SNN-Pflanzen durch Aufreiben von Carborundum. (Das Experiment wurde zweimal wiederholt.)

D: Verwundung durch Abschneiden eines unteren Blattes (grau) von sieben SNN Pflanzen. Zu den indizierten Zeitpunkten wurde ein oberes Blatt (schwarz) geerntet. (Das Experiment wurde einmal ausgeführt.)

Tabelle 5.4: Zusammenfassung der Transkriptionsstudien von *NtERF5* und *NtERF6* durch Signalmoleküle und abiotischen Stress. n.t.= nicht getestet; - = keine Induktion; + = Induktion

	<i>NtERF5</i>	<i>NtERF6</i>
Salizylsäure (1 mM)	-	-
Ethephon (1 mM)	-	-
Jasmonsäure (100 µM)	-	-
Verwundung	+	+
Natriumchlorid (200 mM)	n.t.	-
Glukose (100 mM)	n.t.	-

5.3.4 Induktion der Transkription von *NtERF5* und *NtERF6* durch Pathogene

Pseudomonas syringae pv. *pisi* ist ein Pathogen, welches das avr-Genprodukt sekretiert, dass in der Pflanze durch ein R-Genprodukt erkannt wird. Dieser Stamm wird als avirulent bezeichnet. Im Gegensatz dazu sekretiert *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* kein avr-Genprodukt und wird deswegen von der Tabakpflanze später erkannt. Dadurch kann es sich stärker in der Pflanze vermehren und wird deshalb als virulent bezeichnet.

Tabak W38 Wildtyppflanzen wurden mit je 5µl einer Suspension von avirulenten, bzw. virulenten Pseudomonaden (10^7 cfu/ml) infiziert. Die infizierten Stellen wurden für die Isolation von RNA zu den angegebenen Zeitpunkten ausgestochen. In den Kontrollen wurde steriles Leitungswasser verwendet. Die Pseudomonaden wurden auf der Blattunterseite in den

Apoplasten eingespritzt. In Abbildung 5.11 erkennt man, dass auch bei den mit Wasser behandelten Kontrollen nach drei Stunden transient die Transkription von *NtERF5* anstieg. Bei der Infektion mit dem avirulenten Stamm stieg die Transkription bereits acht Stunden nach der Infektion an. Der virulente Stamm dagegen wurde erst später von der Pflanze wahrgenommen, die Abwehr war verzögert. Bei dieser Infektion wurde *NtERF5* erst nach 24 Stunden transkribiert.

NtERF6 wurde durch die Verwundung der Blätter bei der Infektion nach drei Stunden vorübergehend stärker transkribiert. Durch die Infektion mit Pseudomonaden wurde *NtERF6* nicht induziert. Eine Beteiligung an der Pathogenabwehr war damit jedoch noch nicht auszuschliessen.

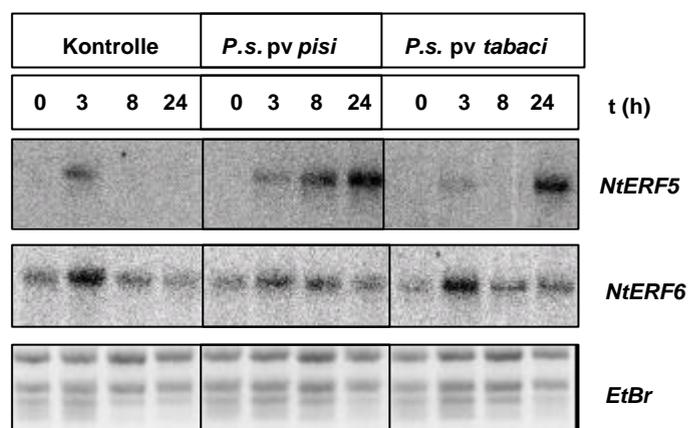


Abb. 5.11: Northern Blot Analyse nach Infektion von Tabakpflanzen mit Pseudomonaden. (Das Experiment wurde zweimal wiederholt.)

5 µl einer Suspension mit 10^7 cfu / ml *P.s. pv. pisi* bzw. *P.s. pv. tabaci* wurden von der Blattunterseite in den Apoplasten von Tabak-W38 eingespritzt. Für der Kontrolle wurde steriles Leitungswasser verwendet.

Ein weiteres bereits gut beschriebens Pathogen ist das Tabak Mosaik Virus (TMV) (Knapp und Lewandowski, 2001). Das RNA-Genom des Virus kodiert für vier Proteine, einem Capsid-Protein, einem Movement-Protein und zwei Replikasen. Wenn das RNA-Virus in die Pflanzenzelle eindringt, wird die Helikase-Domäne der Replikase in Pflanzen die das N-Genprodukt exprimieren erkannt, woraufhin bei diesen Pflanzen eine spezifische Abwehr, die HR (Hypersensitive Response) ausgelöst wird (Erickson *et al.*, 1999). Diese HR wird nach drei Tagen anhand von Läsionen auf dem Blatt sichtbar. Läsionen sind kleine Areale in denen Zellen dem induzierten Zelltod (Apoptose) unterworfen sind. Die abgestorbenen Zellen verhindern vermutlich die Ausbreitung des in ihnen befindlichen Virus. Die N-Genprodukt vermittelte Abwehr des TMV ist temperaturabhängig (Kassanis, 1952). Infiziert man die unteren Blätter und inkubiert diese Pflanze bei 32 °C für vier Tage, kann sich das Virus in dieser Zeit, von der Pflanze unerkant mittels eines Movement-Proteins über die

Plasmodesmata, ausbreiten. Es werden daher keine PR-Gene aktiviert und es bilden sich auch keine Läsionen. Senkt man dann die Temperatur auf 22 °C (Temperaturshift), setzt die N-Genprodukt vermittelte Abwehr ein und die unteren direkt infizierten Blätter brechen aufgrund einer massiv einsetzenden HR zusammen. Die nicht von Beginn an infizierten, oberen Blätter (systemisch infiziert) bilden Läsionen. Unterlässt man den Temperaturshift und inkubiert die Pflanzen weiter bei 32 °C, so zeigen die Blätter das typische Mosaikmuster, das auch Pflanzen, die das N-Gen nicht besitzen, nach Infektion bilden. Im Vordergrund stand hier die Arbeit mit Tabak-SNN-Pflanzen.

In Abbildung 5.12 wurden bei einem Temperaturshift Experiment nach Absenken der Temperatur lokal Blattproben geerntet und die Transkription von *NtERF5* und *NtERF6* im Northern Blot verfolgt. Um sicherzugehen, dass die Zunahme der Translation von *NtERF5* nicht nur auf der Verwundung der Blätter bei der Infektion mit TMV beruht, wurden die Blätter nur mit Puffer eingerieben. In Abbildung 5.12 sah man in der Kontrolle eine leichte Zunahme von *NtERF5* und *PR3* nach 24 Stunden in den lokal infizierten Blättern. Das beruhte vermutlich auf der Verletzung der Blätter durch das Ausstanzen der Blattproben. In den lokal infizierten Blättern kam es nach 24 Stunden zu einer deutlichen Zunahme des Transkripts von *NtERF5*. *PR3* wurde als Marker für die Pathogenabwehr verwendet.

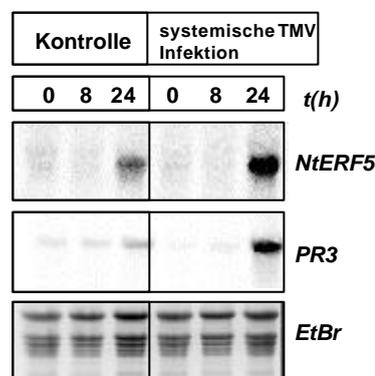


Abb. 5.12: TMV-Infektion von Tabakblättern. (Das Experiment wurde dreimal wiederholt.)

Tabak-SNN-Pflanzen wurden für vier Tage bei 32 °C kultiviert. Die Blätter wurden mit Carborundum eingerieben und mit TMV infiziert, die Kontrolle wurde nur mit Puffer und Carborundum eingerieben. Nach vier Tagen wurde die Temperatur auf 22 °C gesenkt und die Proben zu den angegebenen Zeitpunkten von den lokal infizierten Blättern geerntet.

Das Experiment wurde wiederholt wobei zusätzlich bei den systemisch infizierten Blättern Proben geerntet wurden. In Abbildung 5.13B sieht man in den lokal infizierten Blättern, dass *NtERF5* nach neun Stunden etwas stärker transkribiert wurde. In den systemisch infizierten Blättern nahm die Transkriptmenge nach neun Stunden sehr stark zu und blieb dann

annähernd unverändert bis zu 52 Stunden nach dem Temperaturshift. Die Transkriptmenge von *NtERF6* blieb in den lokalen Blättern unbeeinflusst. In den systemischen Blättern nahm die RNA Menge nach neun Stunden auch zu und blieb auch nach 52 Stunden leicht erhöht. *PR1a* wurde als Kontrolle für die Pathogenabwehr genutzt.

Wiederum konnte nach Infektion mit einem Pathogen gezeigt werden, dass die Transkription von *NtERF5* induziert wird. Hieraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass dieser Transkriptionsfaktor an der Regulation von Abwehrgenen beteiligt sein könnte.

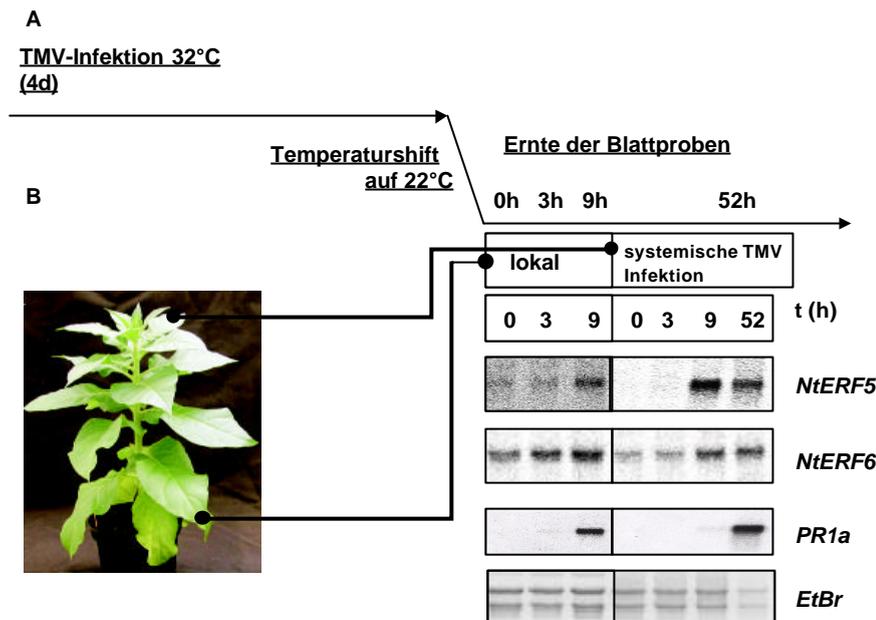


Abb. 5.13: Analyse der Transkription von *NtERF5* und *NtERF6* nach TMV-Infektion (Dieses Experiment wurde dreimal wiederholt.)

A: Schematische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der TMV-Infektion von Tabak-SNN-Planzen mit anschließender Temperatursenkung.

B: Northern Blot mit RNA aus einem Temperaturshiftexperiment mit Tabak-SNN-Pflanzen. Die Pfeile zeigen den Ort der Probennahme für lokal und systemisch infizierte Blätter.

5.4 Überexpression von *NtERF5* und *NtERF6* in Tabakpflanzen

In der Literatur gibt es bisher einige Beispiele dafür, dass die Überexpression bestimmter ERF-Proteine hinreichend ist, um Pflanzen resistenter gegen die Infektion mit bestimmten Pathogenen zu machen. Bei Überexpression von ERF1 in *A. thaliana* sind die Pflanzen resistenter gegen peritrophe Pilze (Berrocal-Lobo *et al.*, 2002). Konstitutive Expression von Tsi1 in *N. tabacum* macht die Pflanzen resistenter gegen die Vermehrung von *P.s. pv. tabaci* in ihren Blättern (Park *et al.*, 2001).

Für die Erforschung der Funktion von *NtERF5* wurden Pflanzen konstruiert, die *NtERF5* bzw. *NtERF6* konstitutiv exprimieren. Die konstitutive Expression von *NtERF5* und *NtERF6*

wurde erreicht durch eine starke Transkription der Gene unter der Kontrolle des CaMV (Cauliflower Mosaic Virus) 35S Promotors. Als Pflanzenspezies wurden Tabak SNN und W38 gewählt. Im Gegensatz zu SNN Pflanzen, tragen W38 Pflanzen kein N-Gen und es kann somit auch keine N-Genprodukt-vermittelte Abwehr des TMVirus stattfinden. Später kann so unterschieden werden, ob eine erhöhte Resistenz der transgenen Pflanzen im direkten Zusammenhang mit der durch das N-Genprodukt vermittelten Erkennung des Virus steht.

Abbildung 5.14 zeigt die getesteten, transgenen Linien im Northern Blot. W38 NtERF5#2 OEx, #3 OEx und #7 OEx zeigten starke Transkriptionssignale von *NtERF5*, geringere RNA Mengen zeigten die Linien SNN NtERF5#2 OEx und #5 OEx. *NtERF6* wurde in den Linien W38 NtERF6#10 OEx und #4 OEx und SNN NtERF6#4 OEx stark transkribiert. Geringere RNA Mengen wurden in den Linien W38 NtERF6#2 OEx und #5 OEx und SNN NtERF6#1 OEx, #2 OEx, #3 OEx, #5 OEx, #6 OEx und #7 OEx transkribiert.

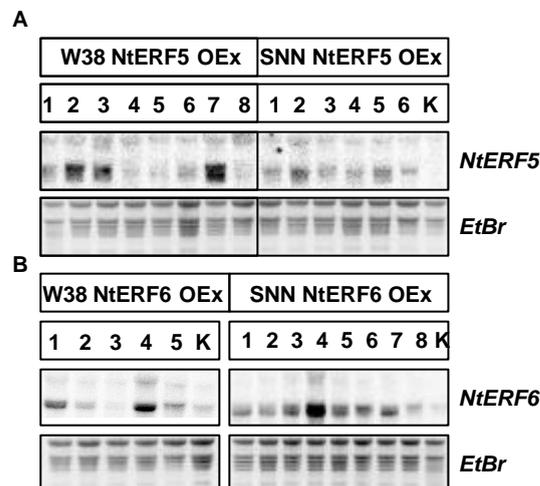


Abb.5.14: Northern Blot-Analyse der konstruierten Pflanzenlinien, die NtERF5, bzw. NtERF6 konstitutiv exprimieren K= Wildtyp RNA; OEx=Überexpression (Das Experiment wurde einmal ausgeführt.)

A: Tabak-W38 und Tabak-SNN-Pflanzen, die NtERF5 ektopisch unter Kontrolle der CaMV (Cauliflower Mosaic Virus) 35S Promotors exprimieren.

B: Tabak-W38 und Tabak-SNN-Pflanzen, die NtERF6 ektopisch unter Kontrolle der CaMV 35S Promotors exprimieren.

5.4.1 Einfluss der Überexpression von NtERF5 und NtERF6 auf die pflanzliche Abwehr gegen das bakterielle Pathogen *Pseudomonas syringae*

Im oben beschriebenen Experiment wurde gezeigt, dass die Transkriptmenge von *NtERF5* nach Infektion mit Pseudomonaden zunahm. Daraus leitete sich die Arbeitshypothese ab, dass Pflanzen, die NtERF5 ständig exprimieren, resistenter gegen die Vermehrung von Pseudomonaden sind. Geeignet, um diese Hypothese zu testen, sind sogenannte

Titerexperimente (Knoche *et al.*, 1987). Dafür wurden *Pseudomonaden* auf der Blattunterseite in den Apoplasten von Tabakpflanzen eingespritzt. Die Infektionsstellen wurden markiert und nach 2 und 4 Tagen wurden diese Stellen ausgestochen. Das Blattmaterial wurde in Wasser aufgemörsert, verdünnt und ausplattiert. Nach 2 Tagen Inkubation der Platten wurden die Kolonien gezählt und mittels Verdünnungsplattierungen, die Bakterienzahl im Blatt ermittelt. Für jeden Zeitpunkt wurden zwei Pflanzen verwendet. Jeweils ein Blatt wurde mit 5 Infektionsstellen auf jeder Blatthälfte (A; B) infiziert. Die sich so ergebenden 20 Infektionsstellen pro Zeitpunkt wurden getrennt aufgearbeitet.

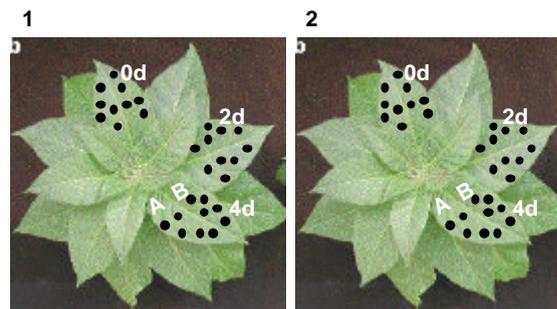


Abb. 5.15: Schematische Darstellung des Infektionsmusters zur Ermittlung des Wachstumsverlaufes von *Pseudomonaden* in Blättern d=Tage; Schwarze Punkte = Infektionsstellen

1 und 2 steht für vergleichbare Pflanzen einer Linie.

A und B steht für die beiden Blatthälften.

0d, 2d und 4d indizieren das Blatt, von dem direkt nach der Infektion, 2 und 4 Tage danach Blattproben genommen wurden.

Zuerst wurden Wildtyppflanzen und transgene Pflanzen, die NtERF5, bzw. NtERF6 überexprimieren, mit dem virulenten Stamm *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* infiziert. Es wurde in zwei verschiedenen genetischen Hintergründen gearbeitet, obwohl das bei der Abwehr der *Pseudomonaden* keine Rolle spielen sollte. Die exponentielle Vermehrung war in W38 Pflanzen deutlicher als in SNN Pflanzen. Zwischen Wildtyp und transgenen Pflanzen gab es jedoch keinen Unterschied in der Vermehrung der *Pseudomonaden* (siehe Abbildung 5.16A / B).

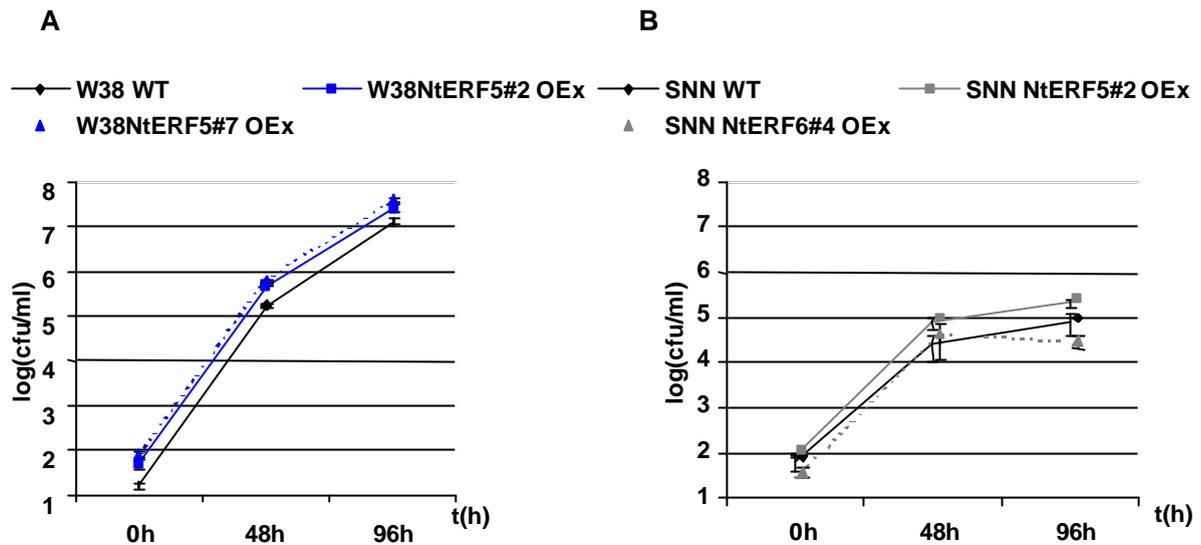


Abb. 5.16: Wachstumskurve von *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* in Blättern (Das Experiment wurde dreimal wiederholt.)

Zum Zeitpunkt 0, 48 und 96 Stunden wurden Proben geerntet. Dabei ist ein Messpunkt der Mittelwert aus 20 Proben.

A: W38-Wildtyp, W38 -NtERF5#2 OEx und W38-NtERF5#7 OEx

B: SNN-Wildtyp, SNN-NtERF5#2 OEx, SNN-NtERF6#4 OEx

In einem weiteren Experiment wurde getestet, ob Pflanzen, die die Transkriptionsfaktoren stark exprimieren, die Vermehrung von *Pseudomonas syringae* pv. *ptisi*, einem avirulenten Stamm, eindämmen. Wäre das der Fall, dann könnten die Proteine direkt an der durch das avr-Genprodukt vermittelten spezifischen Abwehr beteiligt sein. Abbildung 5.17 zeigt, dass sowohl in SNN-Pflanzen (Abbildung 5.17B) als auch in W38-Pflanzen (Abbildung 5.17A), die NtERF5 bzw. NtERF6 konstitutiv exprimieren, keine Einschränkung der Vermehrung von avirulenten Pseudomonaden nachweisbar ist. Die geringere Vermehrung der Bakterien in der Linie W38 NtERF5#2 weicht im Rahmen der ermittelten Schwankung ab und konnte nicht reproduziert werden. Im Vergleich mit der Wachstumskurve von virulenten Pseudomonaden sieht man, dass sich bei einer inkompatiblen Interaktion die Pseudomonaden nicht so stark in der Pflanze vermehren wie bei einer kompatiblen Interaktion.

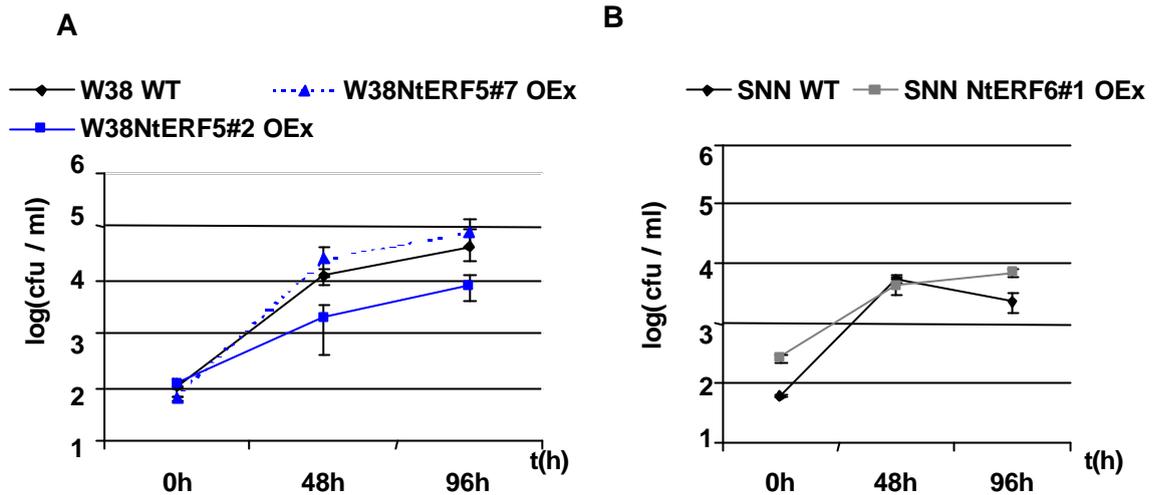


Abb. 5.17: Wachstumskurve von *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* in Blättern (Das Experiment wurde dreimal wiederholt)

Zum Zeitpunkt 0, 48 und 96 Stunden wurden Proben geerntet. Dabei ist ein Messpunkt der Mittelwert aus 20 Proben.

A: W38-Wildtyp, W38-NtERF5#2 OEx und W38-NtERF5#7 OEx

B: SNN-Wildtyp, SNN-NtERF6#1 OEx

Hat eine Pflanze ein Pathogen erkannt und darauf mit einer HR reagiert, so baut sie innerhalb der nächsten Tage eine erhöhte Abwehr gegen ein grösseres Spektrum verschiedener Pathogene auf, diese wird als SAR (systemic acquired resistance) bezeichnet. Möglicherweise bewirkt NtERF5 eine stärkere Induktion der SAR wenn es konstitutiv exprimiert wird. Wildtyp und transgene Linie wurden mit *P. s. pv. pisi* infiziert und die Vermehrung mittels Wachstumskurve verfolgt (Abbildung 5.18A). Neun Tage nach der ersten Infektion wurde mit dem virulenten Stamm die Infektion in den selben Pflanzen wiederholt (Abbildung 5.18B). Die Vermehrung der Pseudomonaden sollte nun durch die bereits etablierte SAR eingeschränkt sein. Es ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und transgenen Pflanzen hinsichtlich der Vermehrung der Pseudomonaden.

Vergleicht man das Wachstum von *P. s. pv. tabaci* in Abbildung 5.16A mit ihrer Vermehrung in Abbildung 5.18B, so sieht man in letzterer deutlich die Einschränkung des Wachstums der Pseudomonaden, in Folge der SAR, zwischen dem zweiten und vierten Tag nach der Infektion.

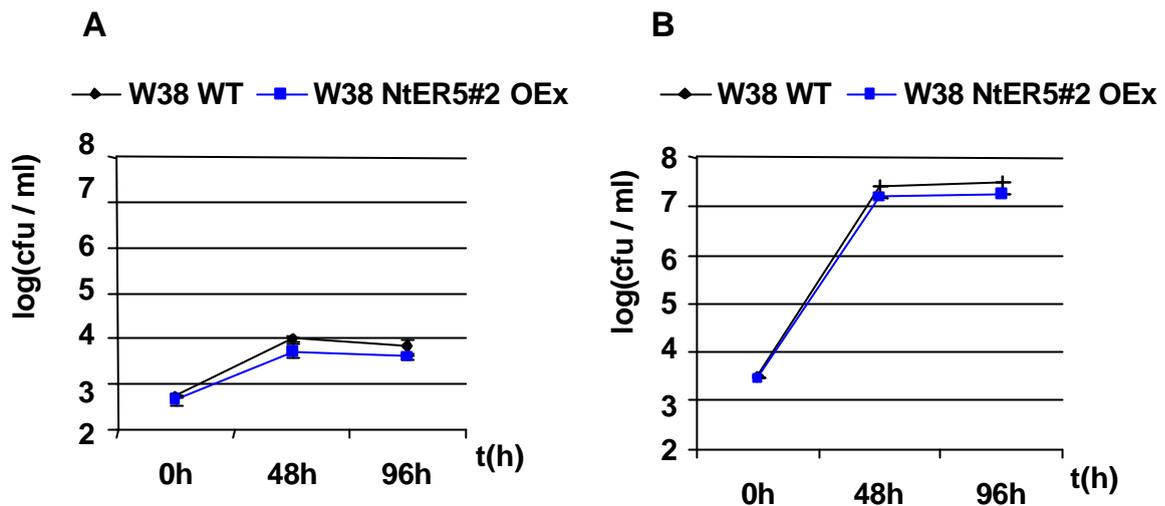


Abb. 5.18: Wachstumsversuche mit Pseudomonaden in Tabakblättern nach Erst- und Zweitinfektion (Das Experiment wurde einmal ausgeführt.)

Zum Zeitpunkt 0, 48 und 96 Stunden wurden Proben geerntet. Dabei ist ein Messpunkt der Mittelwert aus 20 Proben.

A: Erstinfektion mit *P. s. pv. pisi* in W38-Wildtyp und W38-NtERF5#2 OEx

B: Zweitinfektion 9 Tage später, mit *P. s. pv. tabaci* in den selben Pflanzen

5.4.2 Einfluss der Überexpression von NtERF5 und NtERF6 auf die pflanzliche Abwehr gegen TMV

Es konnte bereits gezeigt werden, dass nach der Infektion mit TMV die Transkription von *NtERF5* zunimmt. Das trifft für lokal infizierte Blätter, als auch für systemisch infizierte Blätter zu. Diese Beobachtung warf die folgende Fragestellung auf: Ist NtERF5 an der Abwehr des TMV beteiligt? In den Versuchen wurde mit Tabak-SNN-Wildtyp und SNN-Pflanzen gearbeitet, die NtERF5 konstitutiv exprimieren, da diese Pflanzen, wie oben bereits beschrieben, das Virus erkennen und die N-Genprodukt-vermittelte Abwehr einschalten. In einem Temperaturshiftexperiment war phänotypisch zu beobachten, dass beim Wildtyp, wie zu erwarten, die lokal infizierten Blätter 24 Stunden nach der Temperatursenkung völlig zusammenbrachen. In den systemisch infizierten Blättern bildeten sich erst Läsionen und einige Tage später auch diese Blätter zusammen. Im Gegensatz dazu sahen die systemisch infizierten Blätter der transgenen Pflanzen, die NtERF5 überexprimieren, gesund aus (siehe Abbildung 5.19). Pflanzen die NtERF6 überexprimieren verhalten sich nach TMV-Infektion phänotypisch wie der Wildtyp.



Abb. 5.19: Einfluss der Überexpression von NtERF5 auf die Abwehr gegen TMV (Das Experiment wurde dreimal wiederholt.)

SNN Wildtyp und SNN NtERF5#2 wurden mit TMV infiziert und vier Tage bei 32 °C kultiviert, dann wurde die Temperatur auf 22 °C gesenkt. 48 Stunden später wurden diese Aufnahmen gemacht. Unten: ganze Pflanze mit zusammengebrochenen, unteren, direkt infizierten Blättern. Oben: systemisch infizierte Blätter.

Aufgrund dieser Beobachtung war es interessant zu untersuchen, wie sich die Abwehr der transgenen Pflanzen molekular verändert hat. Es wurde ein Experiment mit Tempershift, wie beschrieben durchgeführt. Im Northern Blot (Abbildung 5.20), wurde die RNA-Menge von *TMV* und *NtERF5* verfolgt. Im Wildtyp sah man wieder die Zunahme der RNA von *NtERF5* in lokalen und systemisch infizierten Blättern. In den transgenen Linien war eine weitere Zunahme der RNA-Menge, über die konstitutiv vorhandene Menge infolge der Überexpression, in den lokal und systemisch infizierten Blättern zu verfolgen. Auffällig ist der Unterschied in der RNA-Menge von TMV zwischen Wildtyp und den transgenen Pflanzen. In den lokal infizierten Blättern der Wildtyppflanze liessen sich wesentlich grössere Mengen TMV-RNA nachweisen als in den Blättern der transgenen Pflanzen (siehe auch Abbildung 5.21A / B). Möglicherweise war die Replikation des Virus in den transgenen Pflanzen eingeschränkt. In den systemisch infizierten Blättern war die TMV-RNA bei keiner der Pflanzen nachzuweisen. Sie lag wahrscheinlich unterhalb der Nachweisgrenze der Methode. Dass sich das TMVirus in der Wildtyppflanze weiter ausgebreitet hat als in den transgenen Pflanzen, sah man an der unterschiedlichen Expression von PR-Genen in den systemisch infizierten Blättern. Es wurde die Induktion von drei verschiedenen PR-Genen untersucht: *PR3* (Chitinase), *HMGR* (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA- Reduktase) und *SAR8.2* (Herbers *et al.*, 1995). Diese Gene wurden in den lokal infizierten Blättern des Wildtyp und der transgenen Pflanzen vergleichbar transkribiert. *PR3* war erst nach

24 Stunden induziert, *HMGR* und *SAR8.2* konnten bereits nach acht Stunden nachgewiesen werden. In den systemisch infizierten Blättern des Wildtyps sind die drei PR-Gene nach 24 Stunden ebenfalls detektierbar. Das bedeutet, dass bei der Pflanze bereits eine Abwehr induziert wurde, sich das Virus im Wildtyp also schon in der Pflanze ausgebreitet hatte, obwohl es im Northern Blot noch nicht nachweisbar war. An dieser Stelle wurde der Unterschied zu den transgenen Pflanzen deutlich. In deren oberen Blättern liess sich keine Induktion der drei PR-Gene nachweisen. Dies bedeutet wiederum, dass in den transgenen Pflanzen keine Abwehr induziert wurde, sich das Virus also wahrscheinlich nicht in die oberen Blätter ausgebreitet hat.

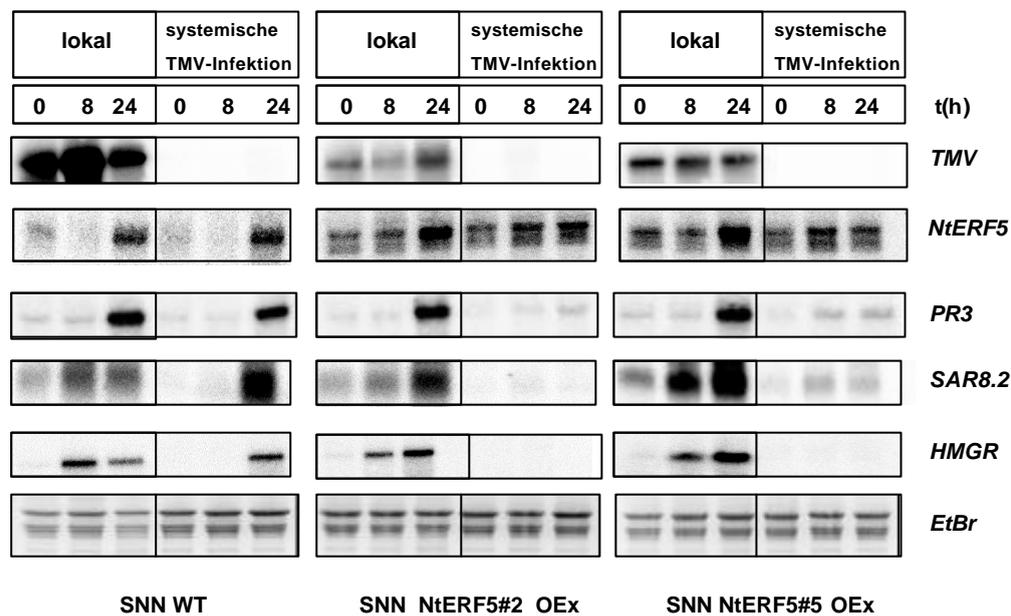


Abb. 5.20: Northern Blot zur Analyse der Verbreitung von TMV und der Expression von PR-Genen
(Das Experiment wurde dreimal wiederholt.)

RNA aus lokal und systemisch infizierten Blattproben von SNN-Wildtyp, SNN-NtERF5#2 OEx und SNN-NtERF5#5 OEx.

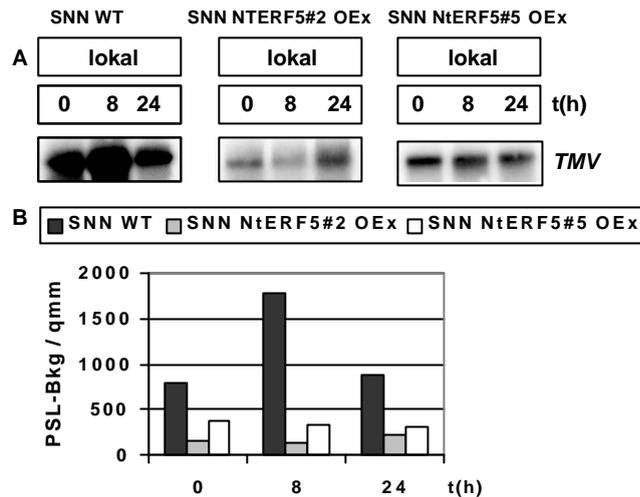


Abb. 5.21: Quantifizierung der TMV-RNA Menge im Wildtyp, NtERF5#2 OEx und NtERF5#5 OEx (Das Experiment wurde einmal mit vier NtERF5 OEx-Linien ausgeführt.) PSL-Bkg / qmm = Schwärzung - Hintergrund pro Fläche

A: Northern Blot Signale für TMV. Eingelesen mit dem Bioimager.

B: Die mit dem Bioimager eingelesenen Signale aus dem Northern Blot für das TMVirus wurden mit dem Programm TINA quantifiziert.

In einem zweiten Experiment wurden Blattproben für denaturierte Gesamtproteinextrakte zum Zeitpunkt des Temperaturshifts und nach 24 Stunden geerntet. Die Proteine wurden mit Hilfe einer denaturierenden SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese) in einem 10%igen Gel aufgetrennt und anschliessend auf einer Nitrocellulose-Membran immobilisiert. Im Western-Blot (Abbildung 5.22) wurde mittels Antikörper gegen PR1a dieses Kontrollprotein nachgewiesen. In den lokalen und systemisch infizierten Blättern des Wildtyps war nach 24 Stunden, wie zu erwarten, das PR1a-Protein detektierbar. In den Kontrollen blieb das Signal für PR1a, wie erwartet, aus. Die transgene Pflanze verhielt sich hinsichtlich der lokal infizierten Blättern wie der Wildtyp, das heisst, sie exprimierte nach Infektion mit TMV ebenfalls PR1a. Bei den Kontrollen ist das PR1a-Protein nicht nachweisbar. Im Gegensatz zum Wildtyp konnte in den systemisch infizierten Blättern der transgenen Pflanze das PR1a-Protein nach 24 Stunden nicht nachgewiesen werden. In einem zugehörigen Northern Blot Experiment war die RNA für das PR1a-Protein jedoch bereits nachzuweisen (Abbildung 5.23). Das könnte bedeuten, dass sich das Virus langsamer über die transgene Pflanze verbreitet hat, die oberen Blätter später infiziert wurden und deshalb auch nach 24 Stunden zwar das Transkript, aber noch nicht das Protein für PR1a nachweisbar war.

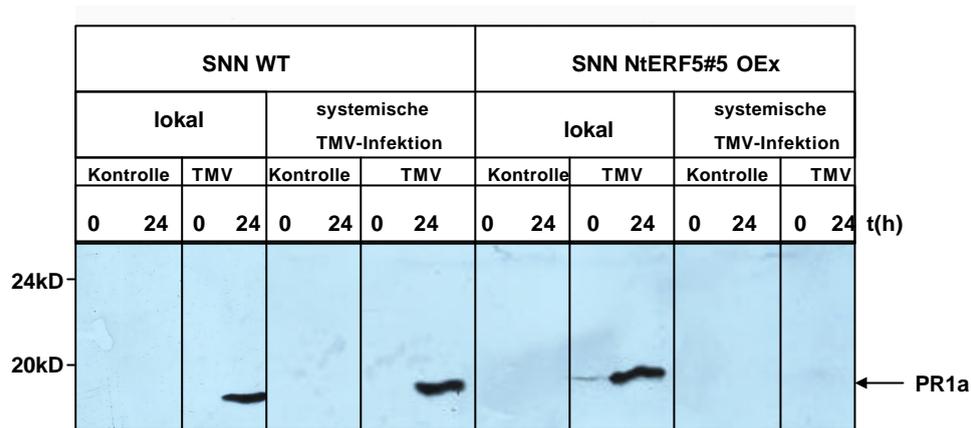


Abb. 5.22: Western Blot zum Nachweis der Expression von PR1a nach TMV Infektion (Das Experiment wurde einmal ausgeführt.)

Temperaturshiftexperiment mit Tabak-SNN-Wildtyppflanzen und SNN-NtERF5#5 OEx. Proben für Gesamtproteinextrakte aus lokal und systemisch infizierten Blättern wurden zum Zeitpunkt der Temperatursenkung und 24 Stunden später geerntet. Verwendet wurde ein polyklonaler Antikörper gegen PR1a.

Von den Pflanzen die im Western Blot untersucht wurden, wurden gleichzeitig Proben für ein Northern Blot Experiment geerntet (Abbildung 5.23). Bereits im Ethidiumbromidbild war zu erkennen, dass die Menge an TMV-RNA in den lokal infizierten Blättern im Wildtyp gleich bleibt. In den systemisch infizierten Blättern ist die TMV-RNA erst nach 24 Stunden sichtbar. In der Pflanze, die NtERF5 konstitutiv exprimiert, nahm in den lokalen Blättern nach 24 Stunden die RNA-Menge von TMV ab. In den systemischen Blättern war zu keinem Zeitpunkt TMV-RNA sichtbar.

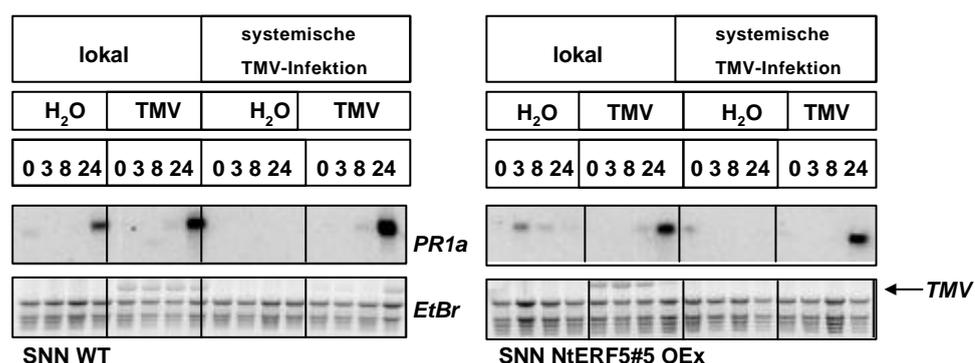


Abb. 5.23: Northern Blot zum Nachweis der Induktion von PR1a nach TMV Infektion (Das Experiment wurde dreimal wiederholt.)

Die Blattproben von Tabak-SNN-Wildtyppflanzen und SNN-NtERF5#5 OEx wurden nach Beginn des Temperaturshift zu den gezeigten Zeitpunkten geerntet. Zeitpunkte 0h und 24h identisches Material wie in Abbildung 5.22.

In diesem Abschnitt wurde weiter die bereits beschriebene, verringerte Replikation von TMV in den transgenen Pflanzen untersucht. Werden SNN-Planzen bei 22 °C mit TMV infiziert, so kann man nach einigen Tagen erste Symptome der Abwehr in Form von Läsionen beobachten. Die Grösse der Läsionen ist ein Indiz, wie stark sich das Virus bereits in der resistenten Pflanze repliziert hat und verbreiten konnte. Abbildung 5.24 zeigt exemplarisch die Unterschiede hinsichtlich der Läsionsgrösse zwischen SNN- Wildtyp und SNN-NtERF5#2 OEx am achten Tag nach der Infektion. Hier wurde bereits deutlich, dass in der Linie NtERF5#2 OEx die Läsionen im Vergleich zum Wildtyp wesentlich kleiner sind. Um das Ergebnis weiter zu quantifizieren, wurden jeweils 50 Läsionen auf einem Blatt ausgemessen (Abbildung 5.25). Dabei wurde die Erwartung bestätigt, dass eine verringerte Replikation des Virus auch zu einer eingeschränkten Ausbreitung in der Pflanze führt und die Läsionen somit kleiner sein sollten.

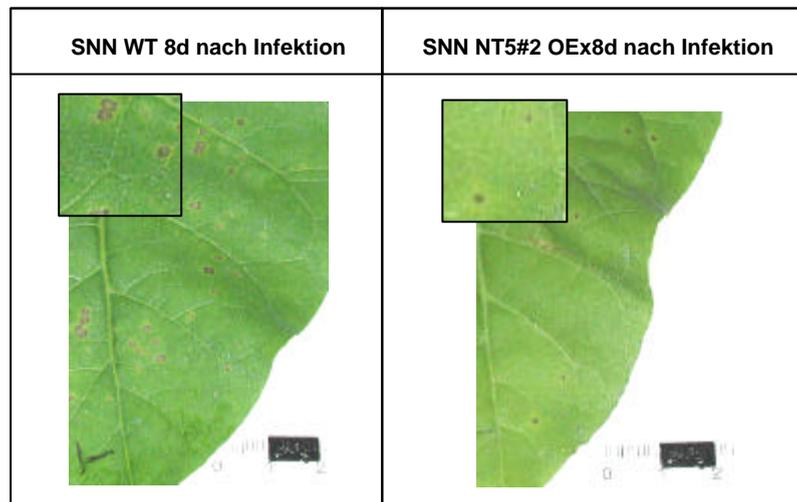


Abb. 5.24: Bildung TMV-induzierter HR-Läsionen in Wildtyp- und überexprimierenden Pflanzen

(Das Experiment wurde einmal ausgeführt.)

Blätter von SNN-Wildtyp und SNN-NtERF5#2 OEx wurden mit TMV infiziert und bei 22 °C kultiviert.

Links oben befindet sich jeweils eine Ausschnittvergrößerung des dargestellten Blattes. Die Fotos wurden 8 Tage nach der Infektion aufgenommen.

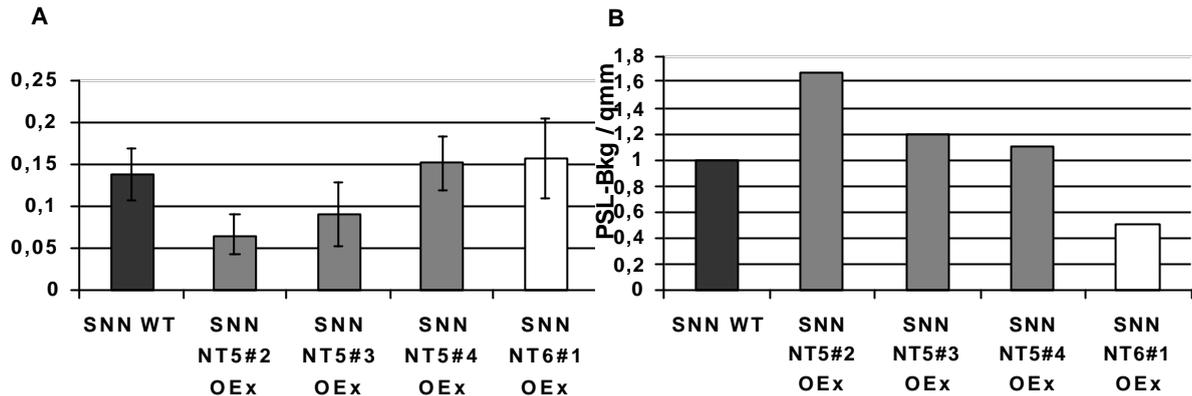


Abb. 5.25: Quantifizierung der TMV-induzierten HR-Läsionen in Wildtyp- und überexprimierenden Pflanzen (Das Experiment wurde einmal ausgeführt.)

A: Darstellung der mittleren Läsionsgrösse 8 Tage nach der TMV-Infektion bei 22 °C. Jeweils 50 Läsionen auf einem Blatt / Linie wurden vermessen. Die y-Achse gibt Einheiten der relative Grössenverhältnisse an.

B: Quantitative Darstellung der Transkriptmenge von *NtERF5* in einem oberen Blatt 8 Tage nach der Infektion. PSL - Bkg / qmm = Schwärzung - Hintergrund pro Fläche

Bricht man ein Temperaturshiftexperiment zu einem frühen Zeitpunkt ab, so brechen die direkt infizierten Blätter nicht komplett zusammen sondern man kann kleine Läsionen erkennen, ähnlich wie im oben beschriebenen Experiment. Diese Läsionsgrössen geben ebenfalls einen Hinweis darauf wie weit sich das Virus in den Blättern der einzelnen Pflanzen nach z.B. 30 Stunden Kultivierung der Pflanzen bei 32 °C bereits ausgebreitet hat. In Abbildung 5.26A sieht man die infizierten Blätter von SNN-Wiltyp und SNN-NtERF5#2 OEx. Dabei fällt auf, dass das Blatt der Wildtyppflanze bereits grössere Läsionen hat. Das wird in Abbildung 5.26B bei der Quantifizierung der Läsionen im Vergleich des Wildtyps zu weiteren Linien noch deutlicher. Auch dieses Experiment deutet daraufhin, dass die Replikation bzw. die Ausbreitung des TMV in den transgenen Pflanzen negativ beeinflusst wird.

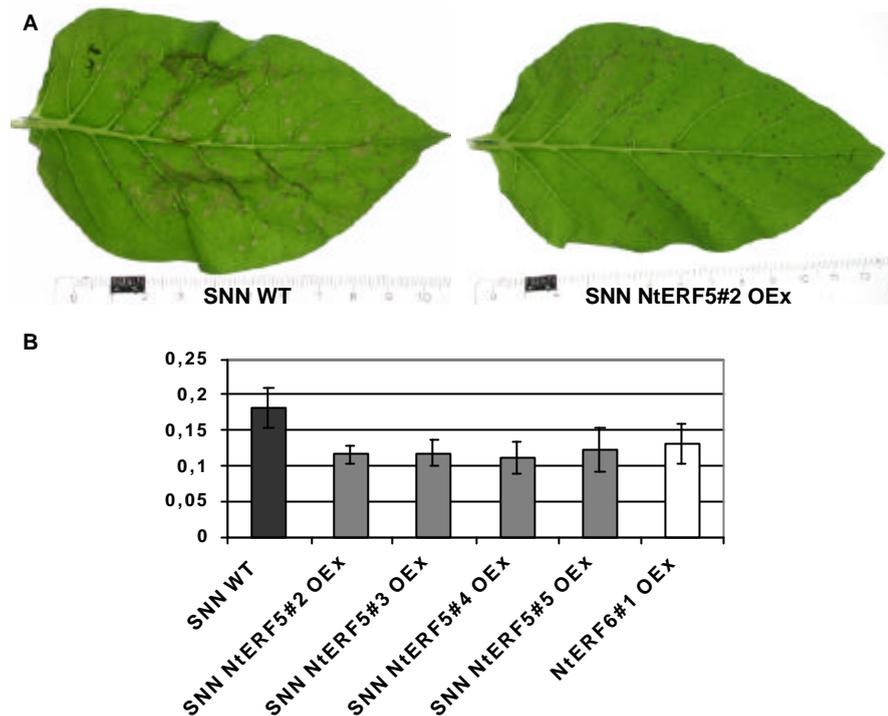


Abb. 5.26: Quantifizierung der TMV-induzierten HR-Läsionsgrößen in Wildtyp und überexprimierenden Pflanzen. (Das Experiment wurde einmal durchgeführt.)

TMV-infizierte Tabak SNN Wildtyp und überexprimierende Pflanzen wurden für 30 Stunden bei 32 °C kultiviert.

A: TMV-Infiziertes Blatt mit HR-Läsionen von SNN Wildtyp und SNN NtERF5#2

B: Jeweils 30 Läsionen auf einem Blatt / Linie wurden vermessen. Die y-Achse gibt Einheiten der relative Grössenverhältnisse an.

5.4.3 Einfluss der Überexpression von NtERF5 auf PR3

Mit Wildtyppflanzen konnte bereits gezeigt werden, dass die Art und der Ort der Verwundung Einfluss auf den zeitlichen Verlauf und die Stärke der Induktion von *NtERF5* und *NtERF6* hat. Es war interessant zu untersuchen, ob sich durch Verwundung die Induktion von PR-Genen in den transgenen Pflanzen verändert. Dafür wurden Tabakblätter mit Carborundum eingerieben und im Verlauf von 24 Stunden Proben geerntet. In Pflanzen, die NtERF5 überexprimieren, war eine basische Chitinase (*PR3*) nach vier bis sechs Stunden induziert. Im Wildtyp war das Einreiben mit Carborundum nicht ausreichend, um *PR3* zu induzieren.

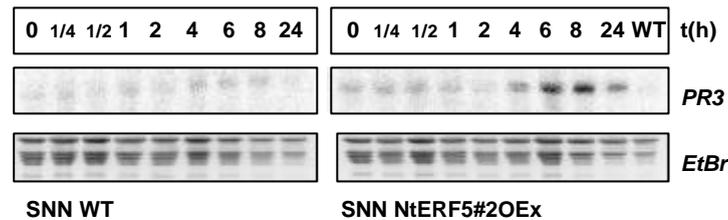


Abb. 5.27: Induktion von *PR3* durch Verwundung von Tabakblättern mit Carborundum (Das Experiment wurde zweimal ausgeführt.)

Blätter von Tabak SNN Wildtyppflanzen und SNN NtERF5#2 OEx wurden mit Carborundum eingerieben.

Falls *PR3* ein Zielgen von NtERF5 ist, sollte es im Promotorbereich GCC-Boxen enthalten. Um die Sequenz des Promotors von *PR3* zu ermitteln, wurde die Methode des "Genome-Walking" angewendet. Damit wurden 197 Basen des Promotors isoliert (Abbildung 5.28). Nach Sequenzierung wurden mehrere G / C-reiche Bereiche gefunden, von denen jedoch keiner eine vollständige GCC-Box umfasst. Im EMSA konnte keine Bindung von NtERF5 an den Promotorbereich von *PR3* gezeigt werden. Da die Bindung von NtERF5 an DNA in *in vitro* Systemen, wie EMSA, generell schwierig ist, sollte die Aktivierung des vollständigen Promotors von *PR3* durch NtERF5 in transienten Assays überprüft werden.

```

ATATGGTCGA CCTGCAGGCG GCCGCACTAG TGATTACTAT AGGGCACGGC GTGGTCGACG
TATACCAGCT GGACGTCCGC CGGCGTGATC ACTAATGATA TCCCGTGCCG CACCAGCTGC
                                     NtPRIIIbGSP4
GCCCGGGCTG GTCGGTATTT TTCACTCAAT TTTGAGCGTG TGAAACCCGA AAAAAAGTGA
CGGGCCCGAC CAGCCATAAA AAGTGAGTTA AAACTCGCAC ACTTTGGGCT TTTTTCCT
NtPRIIIbGSP3
~~~~~
                                     NtPRIIIbGSP5
AGAAATTTTA AGGAACCCCTC TAAAGTTCCA AACTTTTCA AGGC'TTTGCC TATAAACAC
TCTTTAAAAT TCCTTGGGAG ATTTCAAGGT TTGAAAAAGT TCCGAAACGG ATATTTGTG

ATGTTGCATA CTCCACATTA CTCATCCAAT TGAAAAATAT AGGTTCTTTC CCAATGAAATT
TACAACGTAT GAGGTGTAAT GAGTAGGTTA ACTTTTATA TCCAAGAAAG GGTACTTAA

AACAATGAGC ATTAAGCTAT CTTTACTTTT CATTCTACCA ATATTCTTGC TTCTCCTAAC
TTGTTACTCG TAATTCGATA GAAATGAAAA GTAAGATGGT TATAAGAACG AAGAGGATTG
                                     NtPRIIIbGSP2
CAGCAAAGAA TCCCGCGGCC ATGGCGGCCG GGAGCATGCG ACGTCGGGCC CAATTCGCCA
GTCGTTTCTT AGGGCGCCGG TACCGCCGCG CCTCGTACGC TGCAGCCCGG GTTAAGCGGT

```

Abb. 5.28: Sequenz des Promotorbereiches von *PR3* der mit Hilfe der RAGE isoliert wurde

Mit der Methode des "Genome Walking" wurden 197 Basenpaare des Promotorbereiches des basischen *PR3* Gens isoliert. Fett gedruckt sind die G / C-reichen Bereiche, grau sind die Bereiche des Plasmids pGEM-T, in das das Fragment für die Sequenzierung inseriert wurde. Markiert sind die verwendeten Primer, fett und kursiv ist das Start-Kodon des *PR3*-Gens.

TEIL B

5.5 Genomweite Analyse von ERF-Transkriptionsfaktoren aus *Arabidopsis thaliana*

Ziel dieser Arbeit war nicht nur die Aufklärung der Funktion von NtERF5 und NtERF6 aus Tabak, sondern auch die Funktion zu NtERF5- und NtERF6-verwandter ERF-Proteine aus *Arabidopsis* im Rahmen der Pathogenabwehr. Im Januar 2000 wurde von der Europäischen Union das Projekt REGIA (Regulatory Gene Initiative in Arabidopsis) ins Leben gerufen. Das Ziel war dabei, möglichst viele Transkriptionsfaktoren aus *Arabidopsis thaliana* funktionell zu charakterisieren. Die unterschiedlichen Ansätze werden im folgenden Abschnitt geschildert.

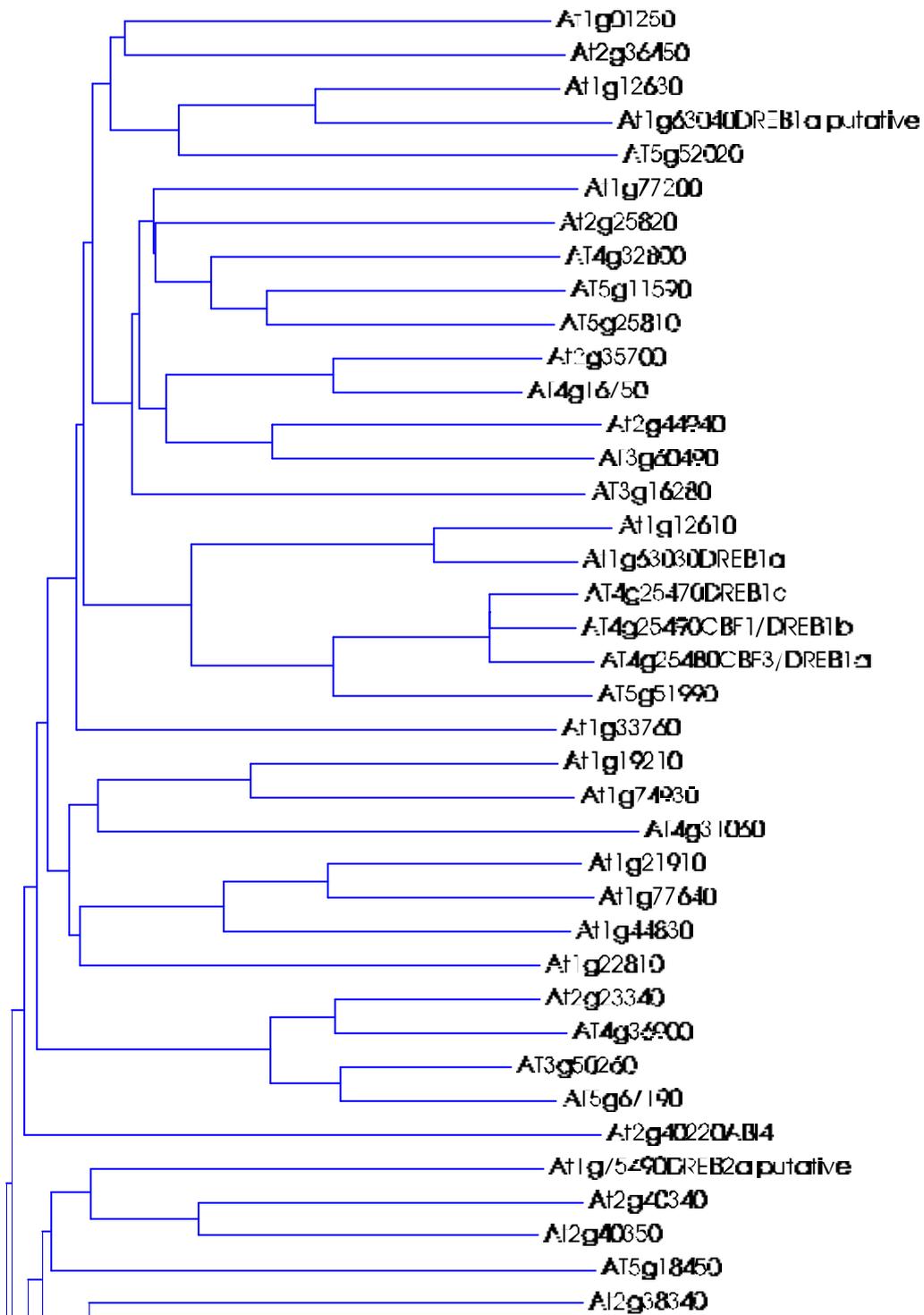
Der erste Ansatz diente der Aufklärung des Funktionszusammenhangs der Proteine. Dabei kann ein Interaktionspartner mit einer bereits bekannten Funktion Hinweise liefern. In einem "Hefe-two-Hybrid"-System wurden alle Transkriptionsfaktoren auf ihre Interaktion untereinander getestet. Dafür wurden im Rahmen dieser Arbeit 19 vollständige Kodierbereiche, die für ausgewählte ERF-Proteine kodieren, amplifiziert und diese jeweils in einen Aktivierungsdomänen- und Bindedomänenvektor inseriert. Die Klonierung erfolgte mit Hilfe des Gateway-Systems. Hierbei werden keine Restriktionsenzyme verwendet. Die Insertion in einen Vektor erfolgt mit Hilfe von Enzymen aus dem Phagen Lambda, die eine genaue ortsspezifische Rekombination erlauben. Mit Hilfe eines Ausgangsplasmids mit einem entsprechenden Gen der Wahl, kann man dieses Gen sehr schnell in weitere Plasmide inserieren.

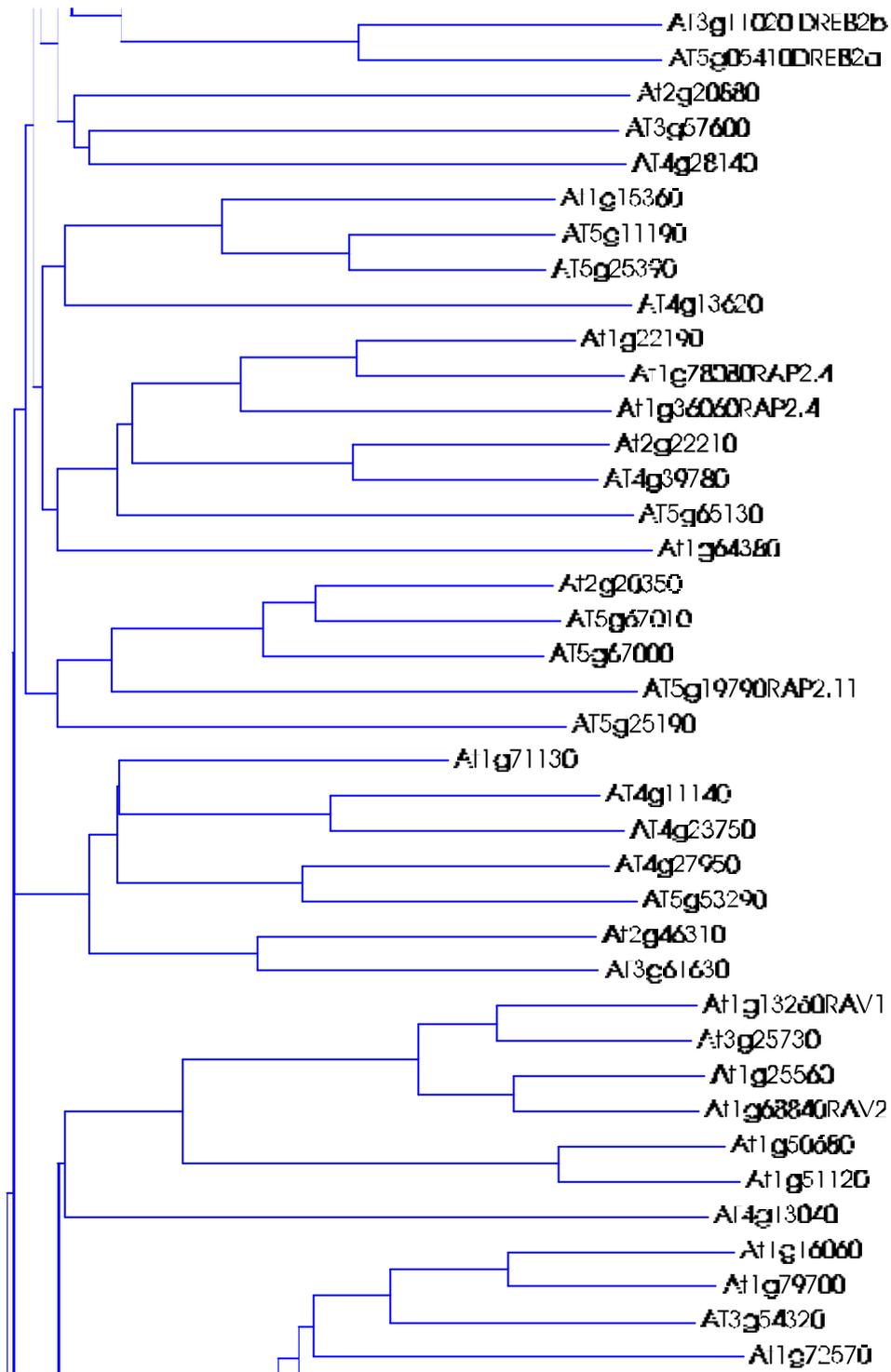
Hinweise auf die Funktion eines Transkriptionsfaktors ergeben sich auch aus seiner transkriptionellen Induktion durch verschiedene Stimuli. Um gleichzeitig möglichst viele Gene unter gleichen Bedingungen zu analysieren, wurden 300 Basenpaare des nicht-homologen Bereiches jedes Transkriptionsfaktors mittels PCR amplifiziert und in Form von Filterarrays auf Membranen immobilisiert. Insgesamt können mit diesen Filtern ca. 1200 unterschiedliche Gene gleichzeitig untersucht werden.

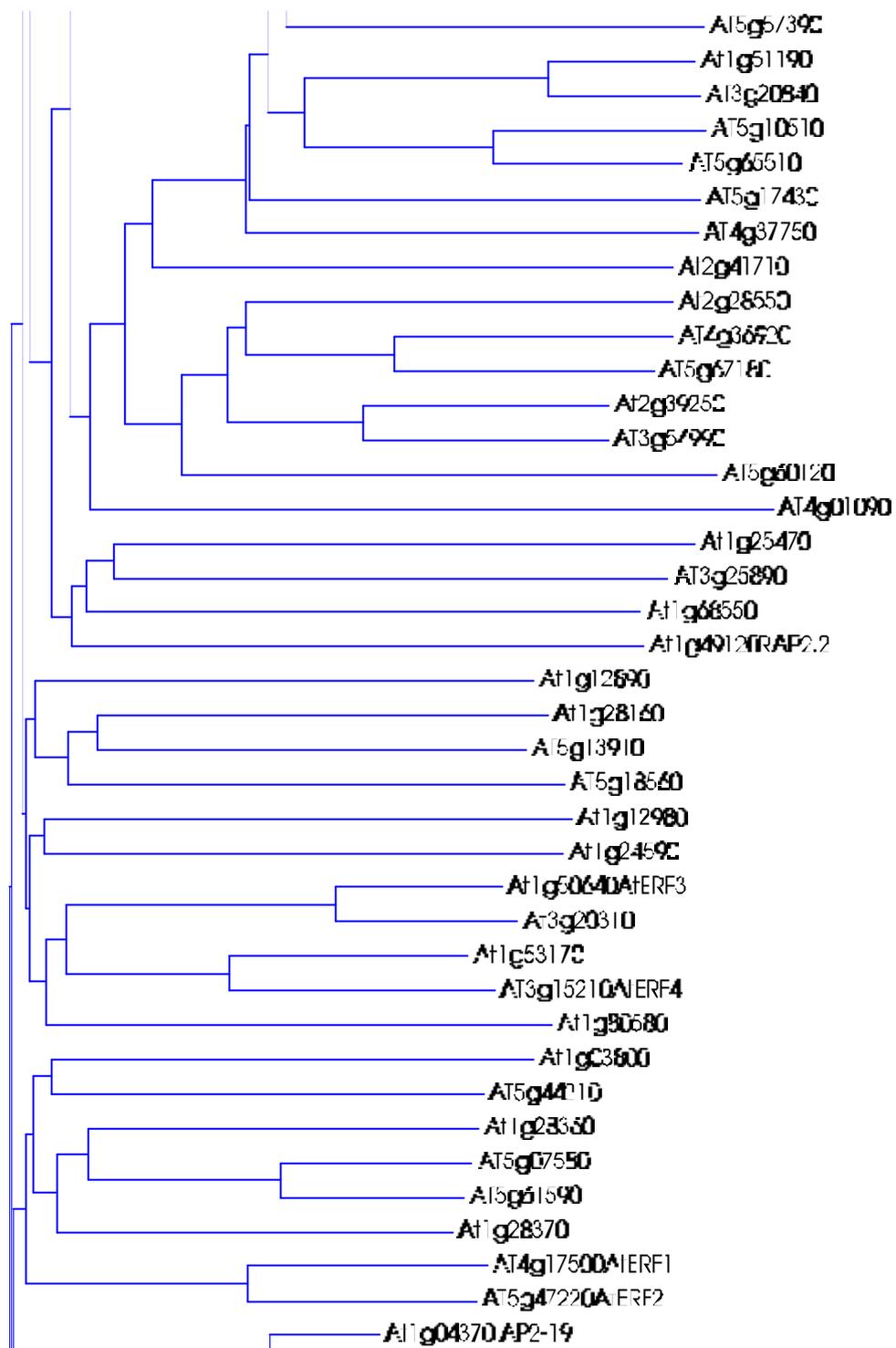
Der dritten Arbeitsansatz beinhaltet die veränderte Expression ausgewählter Transkriptionsfaktoren in der Pflanze. Gearbeitet wurde dabei mit Arabidopsispflanzen, die das Gen von Interesse überexprimieren, und mit Pflanzen die mittels RNAi und T-DNA Insertionslinien, die Expression eines Gens reduzieren, bzw. völlig unterbinden.

Für eine eventuell landwirtschaftlich nutzbare Anwendung wurden im vierten Teil des Projektes zwei Gene aus *A. thaliana* in einer Nutzpflanze, in diesem Fall *L. esculentum*, überexprimiert, bzw. mittels RNAi deren Expression unterdrückt.

Um nahe verwandte Proteine zu NtERF5 und NtERF6 zu finden, wurden die vollständigen abgeleiteten Aminosäuresequenzen aller AP2-Transkriptionsfaktoren aus *A. thaliana*, mit denen von NtERF5 und NtERF6, als Stammbaum dargestellt. Dies geschah mit Hilfe des "Alignment" Moduls aus dem Programm "Vector NTI". 30 nahe verwandte ERF-Proteine zu NtERF5 und NtERF6 wurden dann für das REGIA Programm ausgewählt und bearbeitet.







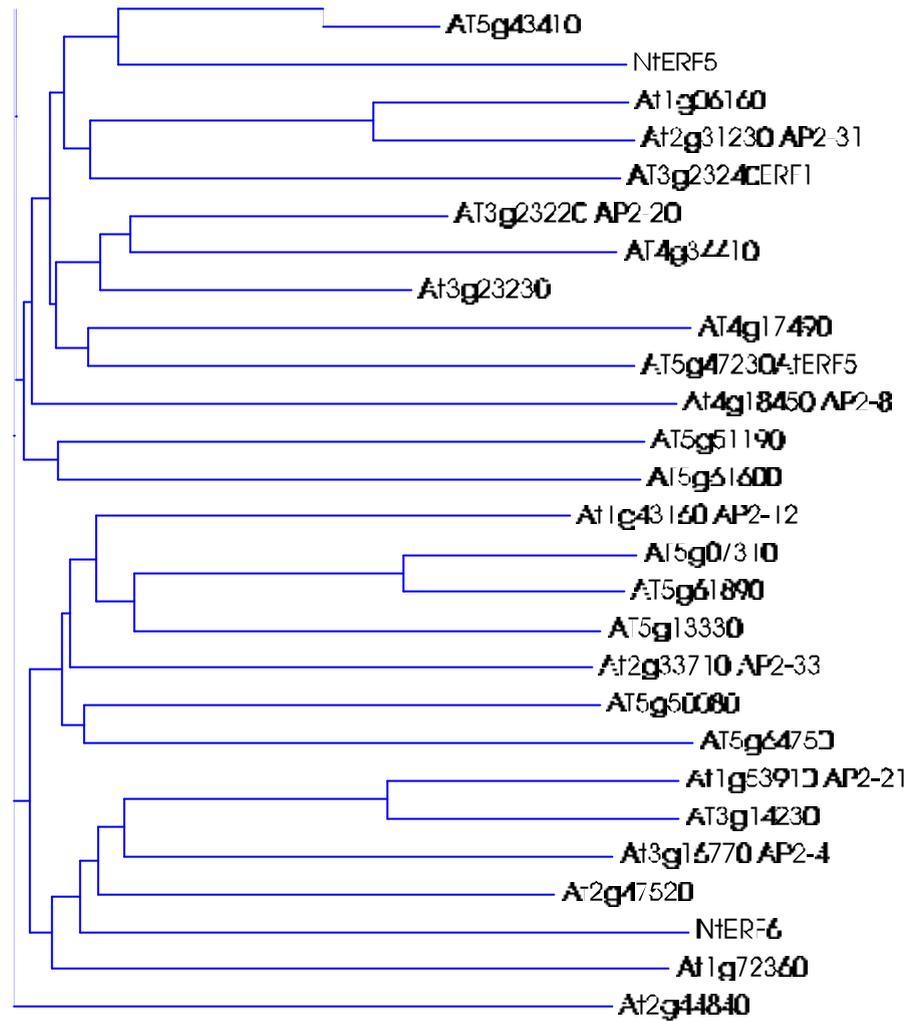


Abbildung 5.29: Stammbaum der ERF-Proteine aus *Arabidopsis thaliana* mit NtERF5 und NtERF6 aus *Nicotiana tabacum*

Tabelle 5.5: Zusammenfassung der für REGIA erstellten Konstrukte.

Unter "Name" ist der in REGIA verwendete Name des Gens aufgeführt. Die zweite Spalte gibt die Annotation der Gene in der MIPS-Datenbank wieder. In der dritten Spalte ist die Grösse des Proteins in Aminosäuren (AS) genannt. Die vierte Spalte verzeichnet die Anzahl der ESTs (Expressed Sequence Tags). Die fünfte Spalte gibt wieder, welche Gene für das Array amplifiziert wurden. In der sechsten Spalte ist verzeichnet, welche Proteine im "Hefe-two-Hybrid"-System (YTH) getestet wurden. In der siebten und achten Spalte ist angegeben, aus welchen T-DNA-Insertionslinien Samen vorliegen. Die neunte Spalte gibt an, mit welchen Genen RNAi Pflanzen erzeugt wurden. Die zehnte Spalte gibt die beiden Gene an, mit denen *L. esculentum* transformiert wurde, um Überexpressions- und RNAi Linien zu erzeugen.

1 Identifikation in REGIA	2 MIPS	3 Protein (AS)	4 ESTs	5 ARRAY	6 YTH	7 SAIL / Garlic	8 GABI KAT	9 RNAi	10 <i>L. esc.</i>
RG AP2-1	At5g47220	243	1	+	+				
RG AP2	At3g15210	222	16	+	+				
RG AP2-3	At3g14230	388	45	+		+			
RG AP2-4	At3g16770	248	18	+	+	+		+	
RG AP2-5	At1g13260	344	12	+					
RG AP2-	At5g47230	329	3	+	+				
RG AP2-7	At2g47520	171	0	+		+			
RG AP2-8	At4g18450	303	1	+	+	+		+	
RG AP2-9	At1g68840	352	7	+					
RG AP2-12	At1g43160	192	3	+	+	+	+	+	
RG AP2-13	At1g80580	256	0	+					
RG AP2-14	At1g50640	225	3	+	+				
RG AP2-15	At1g24590	306	0	+	+				
RG AP2-18	At1g03800	245	0	+					
RG AP2-19	At1g03470	133	0	+				+	
RG AP2-20	At3g23220	128	0	+	+			+	
RG AP2-21	At1g53910	358	46	+	+	+	+	+	OEx / RNAi
RG AP2-31	At2g31230	236	2	+	+			+	OEx / RNAi
RG AP2-32	At4g34410	268	6	+	+				
RG AP2-33	At2g33710	218	0	+	+	+	+	+	
RG AP2-34	At4g17400	246	3	+	+				
RG AP2-35	At1g12980	328	0	+	+				
RG AP2-36	At1g28370	166	4	+					
RG AP2-37	At1g79700	308	3	+					
RG AP2-38	At1g28360	189	0	+					
RG AP2-41	At4g36900	196	2	+	+				
RG AP2-110	At5g67000	160	0	+	+				
RG AP2-111	At5g53290	354	0	+			+		
RG AP2-112	At2g46310	294	0	+	+				
RG AP2-113	At3g61630	315	0	+	+		+		
ó 30				ó 30	ó 19	ó 7	ó 5	ó 8	ó 4

5.5.1 Pathogen-induzierte Transkription der ERF-Gene mit Hilfe eines transkriptionsfaktorspezifischen Makro-ARRAY

Der Schwerpunkt der Forschung bei dieser Arbeit lag auf den ERF-Transkriptionsfaktoren und ihrer möglichen Funktion im Rahmen der Pathogenabwehr. Für die Hybridisierung der Array-Filter aus dem REGIA Projekt wurden deshalb Arabidopsispflanzen für drei Wochen auf Erde angezogen und dann mit 1 mM Salizylsäure besprüht. Bei anderen Arabidopsispflanzen wurde eine Suspension mit Pseudomonaden in die Blätter eingespritzt. Bei der Regulation von Transkriptionsfaktoren sind frühe Zeitpunkte interessant, da eine schnelle Regulation der Abwehrgene auch eine schnelle Reaktion der Pflanze bedeutet, wie sie gerade nach Pathogeninfektion notwendig ist. Deshalb wurden drei und sechs Stunden nach der Infektion Blattproben für das Array geerntet. Um die erfolgreiche Infektion mit avirulenten und virulenten Pseudomonaden und die erfolgreiche Applikation von Salizylsäure hinsichtlich ihrer Induktion der Pathogenabwehr zu überprüfen, wurden nach 24 Stunden noch einmal Proben geerntet. Im Northern Blot wurde die Induktion von *PR1*, einem Markergen der Pathogenabwehr, getestet (Abbildung 5.30). Nach Salizylsäureapplikation wurde *PR1* sehr stark transkribiert, durch die Infektion mit virulenten und avirulenten Pseudomonaden Stämmen wurde *PR1* ebenfalls induziert. Bei den Pflanzen wurde eine Pathogenabwehr ausgelöst.

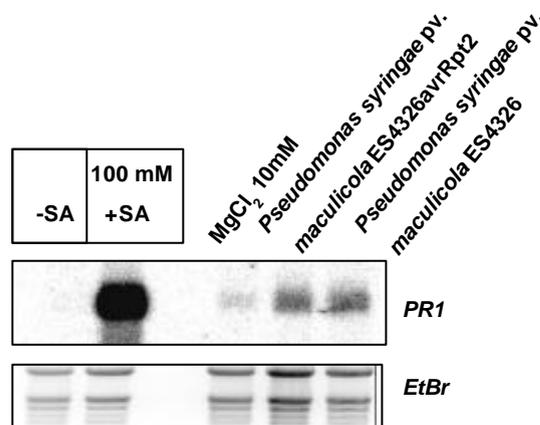


Abb. 5.30: Induktion der Pathogenabwehr nach Applikation von Salizylsäure bzw. Infektion mit Pseudomonaden (Das Experiment wurde einmal ausgeführt.)

Arabidopsispflanzen wurden drei Wochen auf Erde angezogen. Sie wurden dann mit 1 mM Salizylsäure besprüht, bzw. 5 µl einer Pseudomonadensuspension (10^5 cfu/ ml) wurden in die Blattunterseiten gespritzt. Als Kontrolle wurde Wasser, bzw. 10 mM MgCl₂ verwendet. Nach 24 Stunden wurde das Blattmaterial geerntet. *PR1* wird hier als Markergen der Induktion einer Pathogenabwehr genutzt.

Die beiden frühen Zeitpunkte (3h, 6h) wurden jeweils zusammen aufgearbeitet. Die spätere Auswertung der Filter erfolgte mit dem Programm "Array Vision".

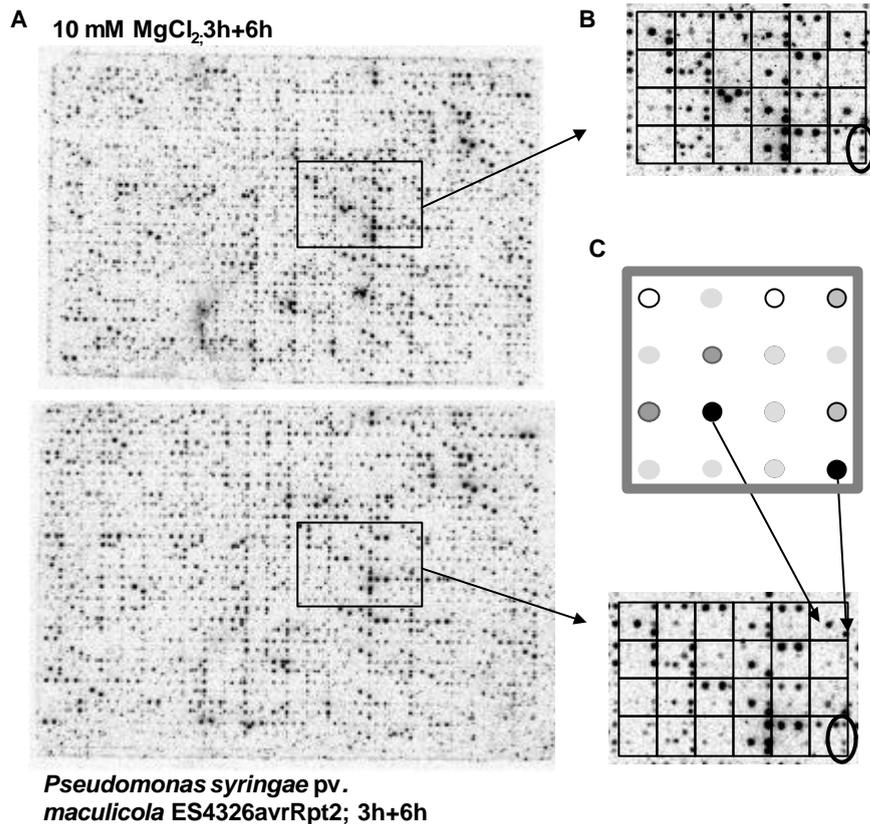


Abb. 5.31: Beispiel zur Auswertung der hybridisierten Filter mit "Array Vision"

A: Abbildung der zu vergleichenden ARRAY-Filter. Oben die Kontrolle: Drei Wochen alte Pflanzen wurden auf Erde angezogen, dann wurde als Kontrolle eine Lösung mit 10 mM MgCl₂ in die Blattunterseite eingespritzt. Der untere Filter wurde mit einer Probe hybridisiert, bei der drei Wochen alte Pflanzen auf Erde angezogen und dann 5 µl einer avirulenten Pseudomonadensuspension (10⁵ cfu/ ml) in die Blattunterseiten gespritzt wurde.

B: Ausschnittvergrößerung von "A" mit der Markierung der einzelnen Spotgruppen. Die umkreisten Punkte sind Doppelspots von unterschiedlich stark transkribierten Genen in der Kontrolle und der infizierten Probe.

C: Schematische Darstellung einer Spotgruppe. Die Pfeile auf den unteren Ausschnitt aus "B" zeigen Doppelspots. Grau = keine DNA, gleich markierte Punkte sind jeweils Doppelspots eines PCR Fragments.

Besonders interessant waren die Transkriptveränderungen der 30 ERF-Transkriptionsfaktoren, die nahe verwandt zu NtERF5 und NtERF6 sind. Als Beispiel werden sieben ausgewählte Faktoren dargestellt. In Abbildung 5.32A ist zu erkennen, dass das Verhältnis der Transkriptmenge der ausgewählten AP2-Faktoren drei und sechs Stunden nach Salizylsäurebehandlung im Vergleich zur Kontrolle wenig verändert ist. In Abbildung 5.32B ist das Verhältnis der Transkriptmenge zwischen Pflanzen, die mit *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* ES4326avrRpt2 infiziert wurden und der Kontrolle abzulesen. Die Faktoren AP2-8, AP2-12 und AP2-20 waren dabei mehr als zweifach stärker in Folge der Behandlung mit avirulenten Pseudomonaden transkribiert, AP2-21 und AP2-31 waren in ihrer Transkriptmenge nicht beeinflusst. Bei der Infektion mit virulenten Pseudomonaden

(Abbildung 5.32C) sieht man eine ähnliche, wenn auch schwächere Induktion, als nach der Infektion mit avirulenten Pseudomonaden (5.32B). Durch die verzögerte Erkennung der virulenten Pseudomonaden in den Pflanzen sind die ERF-Gene noch nicht so stark transkribiert. Die Tendenz eines jeden hier untersuchten Faktors ist sowohl bei der Infektion mit avirulenten, als auch bei der mit virulenten Pseudomonaden die gleiche.

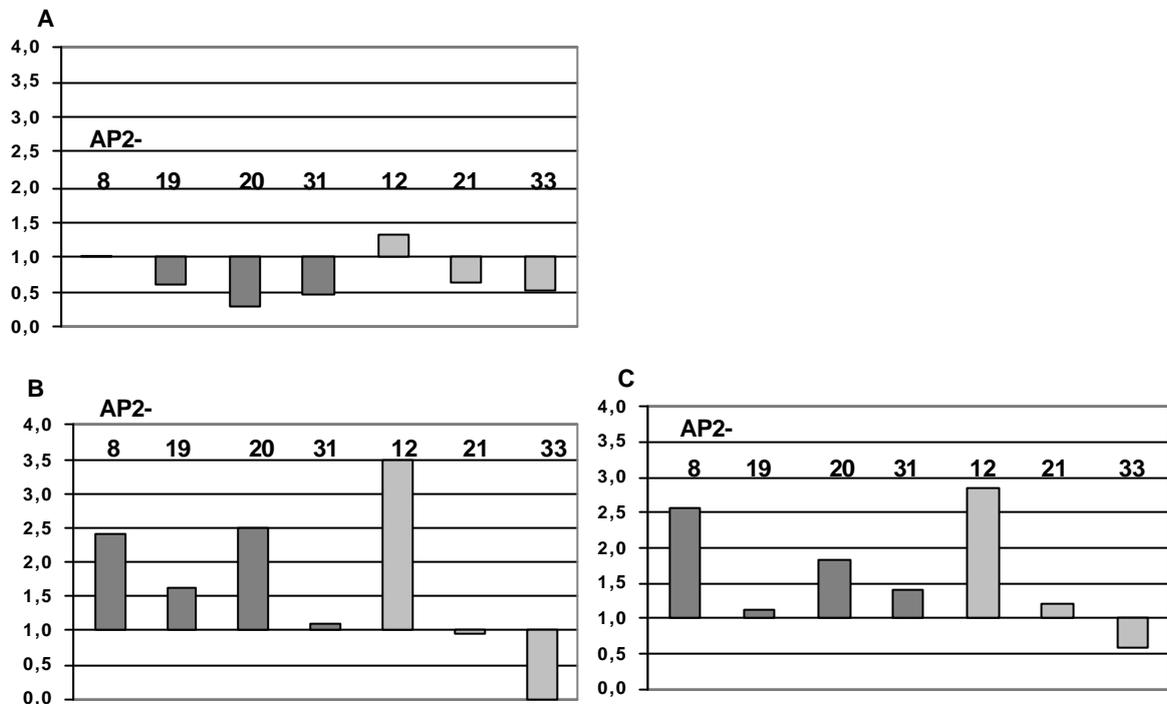


Abb. 5.32: Regulation ausgewählter ERF-Faktoren durch Salizylsäure und Pseudomonaden

(Das Experiment wurde dreimal wiederholt.) dunkelgrau = zu *NtERF5* nahe verwandte Gene; hellgrau = zu *NtERF6* nahe verwandte Gene

A: Verhältnis der Transkriptmenge ausgewählter ERF-Faktoren nach der Behandlung mit Salizylsäure (1 mM) für 3 und 6 Stunden zur Kontrolle.

B: Verhältnis der Transkriptmenge ausgewählter AP2-Faktoren nach der Behandlung mit *P. s. pv. m.* 4326avrPt2 (avirulent) nach 3 und 6 Stunden zur Kontrolle.

C: Verhältnis der Transkriptmenge ausgewählter AP2-Faktoren nach der Behandlung mit *P. s. pv. m.* 4326 (virulent) nach 3 und 6 Stunden zur Kontrolle.

Um die Ergebnisse aus der Hybridisierung des Makro-Array zu überprüfen, wurde aus denselben Proben nocheinmal RNA isoliert, wobei die beiden Zeitpunkte (3 und 6 Stunden) getrennt aufgearbeitet wurden. In Abbildung 5.33 sieht man, dass *AP2-21* scheinbar durch Besprühen mit Salizylsäure nach drei und sechs Stunden leicht induziert wurde. Auch die Infektion mit Pseudomonaden, die das avirulenz-Gen exprimieren, führte zur geringen Induktion von *AP2-21*. *AP2-31* wurde durch Applikation von Salizylsäure nach sechs Stunden

leicht induziert. Die Infektion mit Pseudomonaden beeinflusste nicht die Transkription von *AP2-31*.

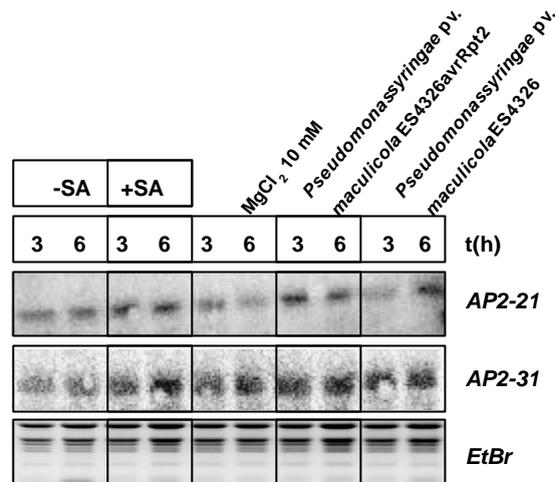


Abb. 5.33: Induktion von *AP2-21* und *AP2-31* nach Applikation von Salizylsäure, bzw. Infektion mit Pseudomonaden (Das Experiment wurde einmal ausgeführt.)

Arabidopsispflanzen wurden drei Wochen auf Erde angezogen. Sie wurden dann mit 1 mM Salizylsäure besprüht, bzw. 5 µl einer Pseudomonadensuspension (10^5 cfu/ml) wurden in die Blattunterseiten gespritzt. Als Kontrolle wurde Wasser oder 10 mM MgCl₂ verwendet. Nach 24 Stunden wurde das Blattmaterial geerntet.

5.5.2 Funktionsanalyse von ERF-Faktoren mittels RNA-Interferenz (RNAi)

Ein relativ neuer Ansatz, die Expression eines Gens zu unterdrücken, ist die RNA-Interferenz (RNAi) (Smith *et al.*, 2000). Man bezeichnet das Ausschalten der Expression eines Gens auf diese Weise auch als PTGS (Post Transcriptional Gene Silencing). Dafür wird der kodierende Bereich in antisense und in sense Orientierung in einen Vektor gesetzt. Diese beiden Bereiche sind durch ein Intron voneinander getrennt. Wird diese Kasette abgelesen, lagern sich sense-RNA und antisense-RNA zu einem dsRNA-Molekül zusammen. Das Intron wird ausgeschnitten. Die doppelsträngige RNA wird durch Endonukleasen der Dicer-Familie in kleine Stücke von etwa 21 bp geschnitten. Dicer-Proteine schneiden spezifisch doppelsträngige RNA. Eine Helicase trennt die Doppelstränge, an je einen der entstandenen Einzelstränge setzt sich ein Komplex aus vielen Proteinen namens Risc (Risc = RNA induced silencing complex) (Bernstein *et al.*, 2001; Grishok *et al.*, 2001). Dieser Einzelstrang lagert sich an die komplementäre mRNA des fraglichen Gens an und wird durch eine RNA-abhängige RNA-Polymerase aufgefüllt. Die so entstandene doppelsträngige RNA, wird dann mit Hilfe des Risc-Komplexes zerschnitten (Hammond *et al.*, 2000, 2001; Zamore *et al.*, 2000). Der beschriebene Kreislauf wiederholt sich, die transkribierte mRNA wird spezifisch abgebaut und somit nicht translatiert.

Es wurden jeweils vier Gene ausgewählt, die zu NtERF5, bzw. NtERF6 nahe verwandt sind (Abbildung 5.29 und Abbildung 5.34 und 5.35). Für die Klonierung wurde wieder das Gateway-System verwendet.

Als Vektor stand pFGC5941 zur Verfügung, der das Intron bereits enthält. Das Intron flankieren die Orte der homologen Rekombination, mit denen kodierende Sequenzen in den Vektor inseriert werden. Mit den konstruierten Vektoren wurden Agrobakterien transformiert. Die Transformation von *Arabidopsis thaliana* erfolgte durch Eintauchen der Blüten in eine Lösung mit transformierten Agrobakterien. Als Marker der erfolgreichen Transformation enthalten die Pflanzen der nächsten Generation zusätzlich eine Resistenz gegen das Herbizid "BASTA"[®].

		1	50
At1g04370 AP2-19	(1)	-----	-----
AT3g23220 AP2-20	(1)	-----	-----
At2g31230 AP2-31	(1)	-----MYSSPSSWSSSQESLLWNESCFLDQS	
NtERF5	(1)	-----MSSNSSPLEIDTSFHSNFFFLQDQSPILQWDDDLFFNDPWFDD	
At4g18450 AP2-8	(1)	MAFGNIQELDGEILKNVWANYIGTPQTDTRSIQVPEVSRWTWEALPTLDDI	
Consensus	(1)		S W D
		51	100
At1g04370 AP2-19	(1)	-----MDQGG-----RSSGS	
AT3g23220 AP2-20	(1)	-----	
At2g31230 AP2-31	(27)	SEPQAFFFCPNYDYSDDFFSFESPEMMIKKEIQNGDVSN-----SEEEE	
NtERF5	(46)	QSPIIPCNSEKDNENHQVFEESSDNTIMSKGSSHGQEELEEV-----TSQEE	
At4g18450 AP2-8	(51)	PEGSREMLQSLDMSTEDQEWTEILDALASFPNKTNHDP LTNPTIDSCSL	
Consensus	(51)		D I S
		101	150
At1g04370 AP2-19	(11)	GGGGAEQGKYRGVRRPWPWKYAAEIRDSTRKGERVWLGTFD TAE DAARAY	
AT3g23220 AP2-20	(1)	-----MKYRGVRRPWPWKYAAEIRDSTRHGARVWLGTFNTAE DAARAY	
At2g31230 AP2-31	(70)	KVGIDERSYRGVRRPWPWKFAAEIRDSTRNGIRVWLGTFDKAE E AALAY	
NtERF5	(91)	KEKEEFEEKHYIGVRRPWPWKYAAEIRDSTRNGIRVWLGTFD TAE E AALAY	
At4g18450 AP2-8	(101)	SRVSCGTRKYRGVRRPWPWKFAAEIRDSTRNGVRVWLGTFQTAE E AAMAY	
Consensus	(101)		E RKYRGVRRPWPWKYAAEIRDSTRNGIRVWLGTFD TAE E AALAY
		151	200
At1g04370 AP2-19	(61)	DR AAYS MRG -KAAILNFPHEYNMGTG-----	
AT3g23220 AP2-20	(44)	DR AAF GMRG -QRAILNFPHEYQMMKDGPN-----	
At2g31230 AP2-31	(120)	DQ AAFATKG -SLATLNFPVEVRESLKKMENVNLHDGGSPVMALKRKHSL	
NtERF5	(141)	DQ AALS MRG -PWSLLNFPLEKVKKSLEKIE-----	
At4g18450 AP2-8	(151)	DK AAVRI RGTQKAHTNFQLETVIKAMEMDCNPNYRMMNSNTSDPLRSSR	
Consensus	(151)	DRAAFSMRG AILNFPLE VM SL	
		201	250
At1g04370 AP2-19	(86)	-----SSSTAANS SSS-----	
AT3g23220 AP2-20	(73)	-----SHENAVAS SSSSGYRGGGGG--	
At2g31230 AP2-31	(169)	-----RNRPRGKKRS SSSSSSS SSSSCSSS STSS	
NtERF5	(170)	-----YCKDGLSPA AVLKATHKTRR	
At4g18450 AP2-8	(201)	KIGLRTGKEAVKAYDEVVDGMVENHCALSYCS TKEHSETRGLRGSEETWF	
Consensus	(201)		SSSTA S SS RGS T
		251	300
At1g04370 AP2-19	(97)	-----SQQVFE FEYLDDSVLDEL	
AT3g23220 AP2-20	(92)	-----DDGREVIE FEYLDDSLLEEL	
At2g31230 AP2-31	(200)	TSRSSSKQ-----SVVKQESGTLVV FEDLGAEYLEQLL	
NtERF5	(191)	VKHKRSSR-----KKNKETHNVLV FEDLGAELLEEL	
At4g18450 AP2-8	(251)	DLRKRSSNEDSMCQEVEMQKTVTGEETVCDV FGLFE FEDLGS DYLETLL	
Consensus	(251)		DS VIEFEDLGAELLEEL
		301	319
At1g04370 AP2-19	(116)	EYGENYNKTHNINMGKRQ-	
AT3g23220 AP2-20	(113)	DYGERSNQDNCNDANR---	
At2g31230 AP2-31	(233)	MSSC-----	
NtERF5	(224)	MTSSQHSCRRD-----	
At4g18450 AP2-8	(301)	SSF-----	
Consensus	(301)		S

Abb. 5.34: Alignment der vollständigen abgeleiteten Aminosäuresequenz der zu NtERF5 verwandten ERF-Proteine aus *Arabidopsis thaliana*

Rot mit grau unterlegt = identische AS, blau = konservierte AS, grün = gleiche AS, schwarz mit grau unterlegt = schwach ähnliche AS

		1	50
At1g43160 AP2-12	(1)	-----MVSMLTNV	
At2g33710 AP2-33	(1)	-----MHSGKRPLSPESMA	
At1g53910 AP2-21	(1)	MCGGAIISDFIPPPR-SRRVTSEFIWPD LKKNLK----GSKKSSKNRSNF	
NtERF6	(1)	MCGGAIISDYIAPSRTSRRLTAE LLWGRSDLSNKQKNPNNYHSKPLRSQV	
At3g16770 AP2-4	(1)	MCGGAIISDYAPLVT-----KAKGRKLTAEELW	
Consensus	(1)	MCGGAIISDY	R LS SN
		51	100
At1g43160 AP2-12	(9)	VSGETEP SASATWTMGHK-----RERE-----FSLPPQPLITG	
At2g33710 AP2-33	(15)	GNREKKELCCSTLSE S-----DVSDFVSELTGQIPSS	
At1g53910 AP2-21	(46)	FDFDAEF EADFQGFKDDSSIDCDDDFDVGDFADV KPFVFTSTPKPAVSA	
NtERF6	(51)	VDLDDDF EADFQDFKDF S-----DDEDVQVDVKPFAFSASKNSNVEG	
At3g16770 AP2-4	(29)	SELDASAADDFWGFYST S-----KLHPTNQVNV	
Consensus	(51)	D D E EADF F S	DV F FSLTPQP VSG
		101	150
At1g43160 AP2-12	(43)	SAVT---KECESSMSLER---PK---KYRGVQRQRPWGKWA AEIRDPHK	
At2g33710 AP2-33	(50)	IDDQSSSLTLQEKSNRQR-----NYRGVQRQRPWGKWA AEIRDENK	
At1g53910 AP2-21	(96)	AAEGSVFGKQVTGLDGA EK SANRKRKNQYRGIRQRPWGKWA AEIRDPRE	
NtERF6	(93)	SKS-----VKTDDSDKDADRSSKRKRKNQYRGIRQRPWGKWA AEIRDPRK	
At3g16770 AP2-4	(57)	KEEAVK--KEQATEPGKRR---KRK--NVYRGIRKRPWGKWA AEIRDPRK	
Consensus	(101)	S E K E S R RK NQYRGIRQRPWGKWA AEIRDPRK	
		151	200
At1g43160 AP2-12	(82)	ATRVWLGTFFETAEAAARAYDAAALRFRGSKAKLNFPENVGTQTIQRNSHF	
At2g33710 AP2-33	(91)	AA RVWLGTFFDTAEAAALAYDKAAFEFRGHKAKLNFP EHIRVNPT-----	
At1g53910 AP2-21	(146)	GARIWLGTFFKTAEAAARAYDAAARRIRGSKAKVNFPEENMKAN-----S	
NtERF6	(138)	GV RVWLGTFFNTAEAAARAYDVEARRIRGNKAKVNFPEDELQCLPR--DVLL	
At3g16770 AP2-4	(100)	GV RVWLGTFFNTAEAAAMAYDVA AKQIRGDKAKLNFPDLHHPPPP-----	
Consensus	(151)	G RVWLGTFF TAEAAARAYD AARRIRG KAKLNFP E I P	
		201	250
At1g43160 AP2-12	(132)	LQNSMQPSLTYIDQCP TLLSYSRCMEQQQPLVGM LQPT EENHFF EKPWT	
At2g33710 AP2-33	(135)	-QLYSPATSHDRIIVT PPSPPPP IAPDILLDQYGHFQSRSSDSSANLSM	
At1g53910 AP2-21	(190)	QKRSVKANLQKPVAKPNPNPSPALVQNSNISFENMCFMEEKHQVSNNNMN	
NtERF6	(186)	SESSKGPSLRRSWTRFS P-DSTIINMEDCCYDSLGFLEEKPMTKQFG-C	
At3g16770 AP2-4	(144)	-NYTPPSSPRSTDQPAKKVCVVSQSES---ELSQSFPVEICIGFNGND	
Consensus	(201)	Q S PSL R PTP IIQ E E L F EE	
		251	300
At1g43160 AP2-12	(182)	EYDQYNYSSFG-----	
At2g33710 AP2-33	(184)	NMLSSSSSSLNHQGLRPNLEDGENVKNISIHKRRK-----	
At1g53910 AP2-21	(240)	QFGMTNSVDAGCNGYQ-----YFSSDQGSNSFDCSEFGWSDQAP---I	
NtERF6	(234)	EDGSSASGDTGFGSFAPSAGTDIYF TPDVGSNSLTALILVGESHVGLQR	
At3g16770 AP2-4	(190)	EFQNL SYGFEPDYDLKQQISSLESFLELDGNTAEQPSQLDESVSVEVDMWM	
Consensus	(251)	EF SSS G F G S	
		301	350
At1g43160 AP2-12	(193)	-----	
At2g33710 AP2-33	(219)	-----	
At1g53910 AP2-21	(280)	TPDISSAVINNNNSALFFEEANPAKKLKS-----	
NtERF6	(284)	YHPVLSAVIESNESQLVEDDTS PMKKLKSSPINPVADDGNTANKLSEELS	
At3g16770 AP2-4	(240)	LDDVIASYE-----	
Consensus	(301)	V SA	
		351	400
At1g43160 AP2-12	(193)	-----	
At2g33710 AP2-33	(219)	-----	
At1g53910 AP2-21	(309)	--MD----FETPYNNTEWDASLD FLNEDAVTTQ-----	
NtERF6	(334)	AFETQMKFLQIPYLEGNWDASVDTFLNSSATQDGDNAMDLWSFDASVDTF	
At3g16770 AP2-4	(249)	-----	
Consensus	(351)		
		401	430
At1g43160 AP2-12	(193)	-----	
At2g33710 AP2-33	(219)	-----	
At1g53910 AP2-21	(336)	DN-----GANPMDLWSIDEIHSMIGGVF-	
NtERF6	(384)	LNSSATQDGDNAMDLWSFDVPSLLGGVF-	
At3g16770 AP2-4	(249)	-----	
Consensus	(401)		

Abb. 5.35: Alignment der vollständigen abgeleiteten Aminosäuresequenz der zu NtERF6 verwandten ERF-Proteine aus *Arabidopsis thaliana*
 Rot mit grau unterlegt = identische AS, blau = konservierte AS, grün = gleiche AS, schwarz mit grau unterlegt = schwach ähnliche AS

Bei der phänotypischen Analyse der transformierten Pflanzen fiel wiederholt eine Linie auf, die etwa eine Woche früher als alle anderen Linien aus der gleichen Transformation Blüten bildet. Dabei handelte es sich um Linie Nummer 16, aus der Transformation mit *AP2-31* (siehe Abbildung 5.36).



Abb. 5.36: Frühzeitige Blütenbildung der Linie RNAi AP2-31#16 (Das Experiment wurde dreimal wiederholt.)

Verschiedene *Arabidopsis*-Linien, die drei Wochen auf Erde angezogen wurden. Links: RNAi AP2-33#1; Mitte: RNAi AP2-31#16; Rechts: RNAi AP2-31#21

Da diese Beobachtung nur bei einer Linien gemacht wurde, ist der Phänotyp wahrscheinlich nicht auf den RNAi-Effekt zurückzuführen, sondern eher auf den Insertionsort der T-DNA bei der Transformation, in einen kodierenden Bereich. Die Menge-RNA von *AP2-31* in der transgenen Pflanze wurde mit der RNA-Menge von *AP2-31* des Wildtyp verglichen. Da vorher schon getestet wurde, dass *AP2-31* in Stengeln des Wildtyp exprimiert wird, wurde dieses Gewebe hinsichtlich der RNA-Menge von *AP2-31* bei den verschiedenen Linien mittels RT-PCR untersucht. Es wurden dazu Primer verwendet, die das Gen in voller Länge amplifizieren. Als Kontrolle für eine gleichmässige Amplifikation in verschiedenen Ansätzen wurde Aktin-mRNA gleichzeitig amplifiziert. Die Primer für *AP2-31* amplifizieren ein Produkt von 810 bp. Um sicherzustellen, dass nur mRNA als Matrize für die RT-PCR diente, wurde ein Primer im 5' Bereich 77 bp vor dem Start-ATG verwendet. So wurde sichergestellt, dass das in die Pflanzen eingebrachte Konstrukt nicht als Matrize in der PCR diente. In Abbildung 5.37A sieht man im Wildtyp, wie zu erwarten, eine Bandevon circa 800 bps für *AP2-31* und die 750 bp-grosse Bande für *Aktin*. In den anderen Ansätzen ist *Aktin* etwas schwächer amplifiziert worden. Offensichtlich ist auch, dass *AP2-31* in den Linien #1, #10, #13 und #16 nicht mit PCR nachzuweisen ist. Die mRNA ist also in den Stengeln nur noch in sehr geringen Mengen vorhanden. Nur bei Linie #21 konnte *AP2-31* noch amplifiziert werden. *Aktin* besitzt ein Intron und ist deshalb bei seiner Amplifikation von genomischer

DNA etwas grösser. Die Analyse im Northern Blot (Abbildung 5.37B) zeigte vergleichbare Ergebnisse mit der RT-PCR. Im Wildtyp wurde RNA von *AP2-31* transkribiert, ebenso bei der Linie AP2-31#21. Bei den restlichen Linien liess sich im Northern Blot kein Transkript für *AP2-31* nachweisen. Die Beobachtung des frühen Blühens der Linie AP2-31#16 war somit nicht auf den RNAi-Effekt zurückzuführen, da unabhängige Linien, die ebenfalls AP2-31 nicht mehr exprimieren, diesen Phänotyp nicht zeigten. Es besteht weiterhin die Möglichkeit einer Insertion in einen kodierenden Bereich, der an der zeitlichen Regulation der Blütenbildung beteiligt ist.

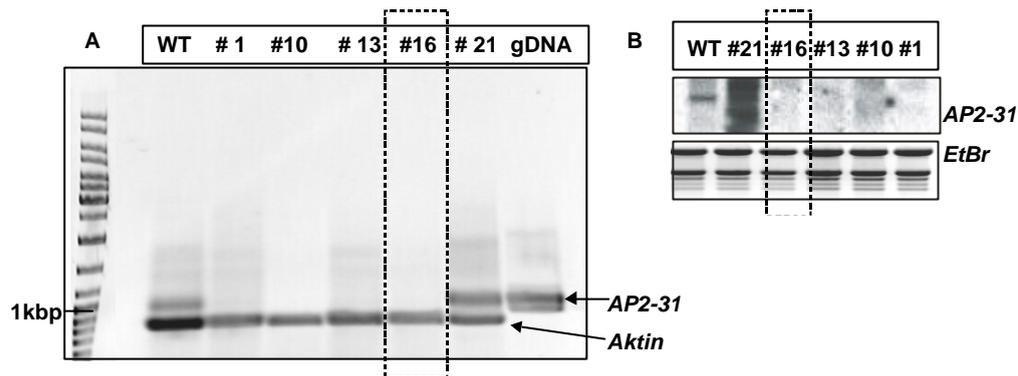


Abb. 5.37: RT-PCR Analyse von AP2-31 in unabhängigen RNAi-Linien.

A: RT-PCR mit RNA aus Stengeln der Linien AP2-31#1, #10, #13, #16, #21, Wildtyp (WT) und genomischer DNA (gDNA). Als Kontrolle wurde Aktin amplifiziert. 1kbp = 1kilobasenpaare (Das Experiment wurde dreimal wiederholt.)

B: Northern Blot mit RNA aus den Stengeln der Linien AP2-31#1, #10, #13, #16, #21, Wildtyp (WT). (Das Experiment wurde einmal ausgeführt.)

5.5.3 Analyse einer T-DNA Insertionslinie

Ein weiterer wirkungsvoller Ansatz, die Translation eines Gens zu unterbinden, ist die Insertionsmutagenese. Dabei wird ein grosser DNA-Bereich in den kodierenden Bereich, den Promotor oder den Terminator des zu untersuchenden Gens inseriert. Diese Insertion geschieht zufällig und nicht ortsspezifisch. Die Transformanten müssen daher in der ersten Generation auf den Ort der Insertion untersucht werden. Eine dafür geeignete Methode ist die TAIL-PCR. In der GARLIC-Kollektion (http://www.nadii.com/pages/collaborations/garlic_files/Garlic_Description.html) von T-DNA Insertionslinien konnte eine Linie (GARLIC_1215_H10.b.1a.Lb3Fa) identifiziert werden, bei der die T-DNA im kodierenden Bereich für *At1g53910* (*AP2-21*) liegt.

In der F3 Generation wurde mittels PCR nach homozygoten Linien gesucht. Dafür wurde ein Primer eingesetzt, der auf der T-DNA hybridisiert (LB2) und ein Primer (AP2-21R), der den 3' Bereich von *At1g53910* erkennt. Das erwartete Produkt ist ungefähr 700 bp gross (siehe

Abbildung 5.38B und Abbildung 5.39A). Das PCR-Produkt wurde in den Vektor pGEM-T inseriert und sequenziert. Man überprüft damit, ob die T-DNA Insertion, wie in der Datenbank angegeben, im gewünschten Gen vorliegt.

A

```

ATGTGTGGAG GAGCTATAAT ATCCGATTTC ATTCCACCGC CGAGGTCTCG CCGTGTACT
AGCGAGTTTA TTTGGCCGGA TCTGAAGAAG AATTTGAAAG GATCGAAGAA AAGCTCGAAG
AATCGTTTCA ATTTCTTCTGA TTTTGACGCT GAGTTCGAAG CTGATTTCCA AGGTTTCAAA
GATGATTCGT CTATCGATTG CGATGATGAT TTCGACGTCG GTGATGTTT CGCCGATGTG
AAACCATTTC TTTTCACTTC GACTCCAAA CCCGCCGTCT CCGCCGCTGC GGAAGgtaaa
tatttaggga ttgacttttag tttgagcga tgaattggtt agaaattaag tttcgattct
atntagctct gttcatagat acctttatct gcttacgatt ttgattggtt tataaagcat
gaggtttgat ttgtgtgata tttatatgca tatgaggttg agtgatgaga cttgatttgt
gtgatgagat ttgattagag attggtgatg agttatttat agaagaactc ttttgttttg
ttgttgtttc actactagGT TCAGTTTTTG GTAAGAAAGT TACTGGCTTG GATGGGGACG
CTGAGAAATC TGCAAATAGG AAGAGGAAGA ATCAGTACCG AGGGATTAGG CAACGTCCTT
GGGAAAATG GGCTGCTGAG ATACGTGATC CAAGGGAAGG TGCTAGAATC TGGCTTGAA
CGTTCAAGAC AGCTGAGGAA GCTGCTAGAG CTTACGATGC TGCAGCGCGG AGAAT-----
-----CCGTG
GATCTAAAGC TAAGGTGAAT TTCCCTGAAG AAAACATGAA GGCTAATCT CAGAAACGCT
CTGTGAAGGC TAATCTTCAG AAACCAGTGG CTAAACCTAA CCCTAACCCA AGTCCAGCTT
TGGTTCAGAA CTCGAACATC TCCTTTGAAA ATATGTGTTT CATGGAGGAG AAACACCAAG
TGAGCAACAA CAACAACAAC CAGTTTGGGA TGACAAACTC CGTTGATGCT GGATGTAATG
GGTATCAGTA TTTTCACTTC GACCAGGGTA GTAATCTTTT CGATTGTTTC GAGTTTGGTT
GGAGCGATCA AGCTCCGATA ACTCCCGACA TCCTTCTGTC GGTTATCAAC AACACAACCT
CAGCTCTGTT CTTTGAGGAA GCCAATCCAG CTAAGAAGCT CAAGTCTATG GATTTTCGAGA
CACCTACAA CAACACTGAA TGGGACGCTT CACTGGATT CCTCAACGAA GATGCTGTA
CGACTCAGGA CAATGGTGCA AACCCATGAG ACCTATGGAG TATTGATGAA ATTCATTCCA
TGATTGGAGG AGTCTTC TGA

```

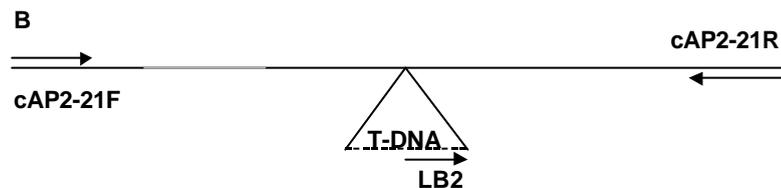


Abb. 5.39: Genomische Sequenz von *At1g53910* (*AP2-21*) in der T-DNA Linie GARLIC_1215_H10.b.1a.Lb3Fa

A: In Grossbuchstaben sind die zwei Exons dargestellt. In grauen Kleinbuchstaben ist das Intron dargestellt. Unterstrichen sind die Primer Bereiche. Mit der unterbrochenen Linie ist die Stelle der T-DNA Insertion in der Linie GARLIC_1215_H10.b.1a.Lb3Fa markiert. Start- und Stopkodon sind fett dargestellt.

B: Schematische Darstellung der Genstruktur von *At1g53910* in der Linie GARLIC_1215_H10.b.1a.Lb3Fa mit der Position der verwendeten Primer cAP2-21F, cAP2-21R und LB2. Die T-DNA ist dabei nicht massstabsgerecht zu *At1g53910* wiedergegeben. Das Intron ist grau-gepunktet dargestellt, die beiden Exons sind schwarz dargestellt.

In der vierten Generation der Linien wurden mit den Primern cAP2-21F, cAP2-21R und LB2 die beiden homozygoten Linien AP2-21-3-5 und AP2-21-8-5 identifiziert. Mit dem Primerpaar cAP2-21R und LB2 sollte in den T-DNA Insertionslinien ein PCR-Produkt von ca. 700 bp amplifiziert werden. Das Primerpaar cAP2-21F und cAP2-21R sollte bei homozygoten Linien kein PCR-Produkt bilden können, da die T-DNA zu gross ist, um unter Standardbedingungen ein PCR-Produkt zu erhalten. Als Kontrolle der PCR-Bedingungen wurde genomische DNA des Wildtyp verwendet (siehe Abbildung 5.39A). Die unterbundene Transkription von *AP2-21* wurde im Northern Blot nochmals getestet. Als Kontrolle wurde

RNA aus Blättern von *Arabidopsis*-Wildtyppflanzen und von der RNAi-Linie AP2-31#16 mitgeführt. Während in den Blättern von Wildtyppflanzen und RNAi AP2-31#16 das Transkript von *AP2-21* eindeutig nachweisbar war, konnte man es in den beiden homozygoten Linien AP2-21-3-5 und AP2-21-8-5 nicht mehr nachweisen (Abbildung 5.39B).

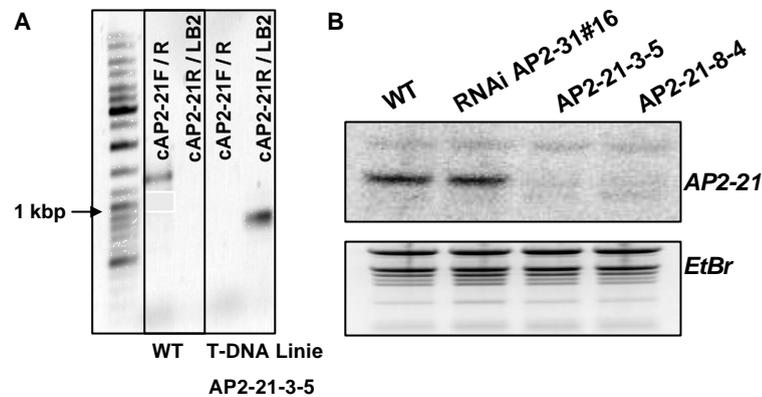


Abb. 5.39: Analyse homozygoter T-DNA Linien im Gen *At1g53910* (*AP2-21*) (Das Experiment wurde einmal ausgeführt.)

A: PCR auf genomischer DNA zur Analyse der T-DNA Insertion. Es wurden die Primer cAP2-21F, cAP2-21R und LB2 verwendet. 1 kbp = 1000 Basenpaare

B: Es wurde RNA aus Blättern von *Arabidopsis*-Wildtyppflanzen, RNAi AP2-31#16 und den beiden Linien AP2-21-3-5 und AP2-21-8-4 isoliert und im Northern Blot analysiert

5.5.4 Infektion der transgenen Pflanzen mit *Pseudomonaden* und *Botrytis cinerea*

In den vorangegangenen Abschnitten wurde die Analyse der konstruierten RNAi-Linien und der T-DNA Insertionslinie beschrieben. Für eine funktionelle Analyse im Rahmen der Pathogenabwehr von AP2-21 und AP2-31 wurden einige der konstruierten Pflanzenlinien mit *Pseudomonaden* infiziert. Die Blätter der Pflanzen wurden dafür in eine Lösung mit *Pseudomonaden* einer OD_{600} von 0,2 (das entspricht ca. 10^9 cfu / ml) getaucht. Besonders interessant war dabei auf der Frage, ob das Ausschalten eines ERF-Proteins bereits zu einer schwächeren Abwehr von virulenten oder avirulenten *Pseudomonaden* führt. In Abbildung 5.40 sieht man die Pflanzen eine Woche nach der Infektion. Bei den Kontrollpflanzen, die mit $MgCl_2$ behandelt wurden, sieht man keine Läsionen. Im Vergleich zum Wildtyp sind die Pflanzen der RNAi-Linie AP2-31#13 und T-DNA Linie AP2-21-3-5 hinsichtlich der Ausprägung der Symptome, nach Infektion mit *Pseudomonaden* nicht verändert.

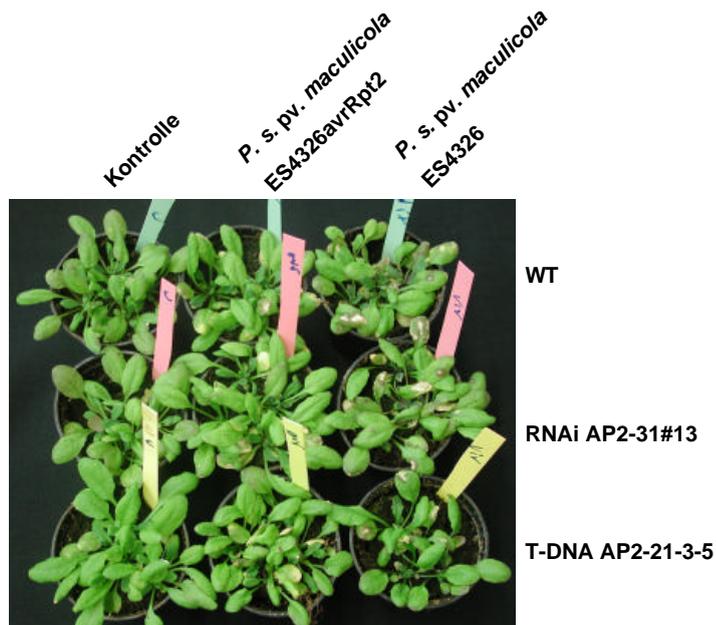


Abb. 5.40: Infektion von transgenen Arabidopsispflanzen mit Pseudomonaden (Das Experiment wurde einmal ausgeführt.)

Drei Wochen alte Arabidopsispflanzen der Linie RNAi AP2-31#13, T-DNA AP2-21-3-5 und Wildtyp wurden mit 10^9 cfu / ml *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* ES4326 avrRpt2, bzw. *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* ES4326 infiziert. Die Kontrollpflanzen wurde mit 10 mM $MgCl_2$ behandelt. Das Foto wurde eine Woche nach der Infektion aufgenommen.

Botrytis cinerea ist ein peritropher Pilz. Für einige ERF-Proteine ist beschrieben worden, dass deren Überexpression ausreicht, um die Pflanzen resistenter gegen die Infektion mit diesem Pilz zu machen. Beispielsweise ist die Überexpression von ERF1 ausreichend für eine erhöhte Resistenz der Pflanzen gegen peritrophe Pilze, u.a. auch *B. cinerea* (Berrocal-Lobo *et al.*, 2002). Für die Infektion wurden die Sporen in eine Nährlösung aufgenommen und unter dem Mikroskop ausgezählt. 5 μ l einer Lösung mit 5×10^4 Konidien / ml wurden danach auf ein Blatt getropft. Die Pflanzen müssen danach bei hoher Luftfeuchtigkeit gehalten werden, um das Auskeimen der Sporen zu ermöglichen. In Abbildung 5.41 wurden jeweils zwei Töpfe mit infizierten Pflanzen einer Linie aufgenommen. Die Ausprägung des Pilzbefalls war in den transgenen Linien RNAi AP2-31#13 und T-DNA AP2-21-3-5 vergleichbar mit dem Wildtyp.

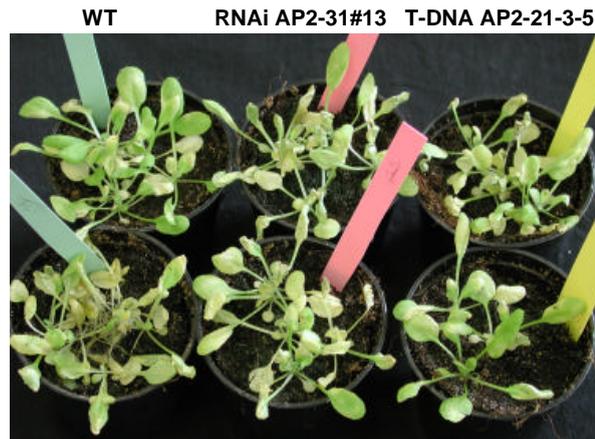


Abb. 5.41: Infektion von transgenen Arabidopsispflanzen mit Sporen von *Botrytis cinerea* (Das Experiment wurde einmal ausgeführt.)

Drei Wochen alte Arabidopsispflanzen der Linie RNAi AP2-31#13, T-DNA AP2-21-3-5 und Wildtyp wurden mit 5 μ l einer Konidienlösung mit 5×10^4 Konidien / ml pro Blatt infiziert. Das Bild wurde eine Woche nach der Infektion aufgenommen.

Mit den bisher getesteten Pathogenen konnten keine Unterschiede in der Resistenz der transgenen Arabidopsispflanzen, im Vergleich zum Wildtyp, gezeigt werden.

6 Diskussion

6.1 NtERF5 und NtERF6 sind Mitglieder der ERF-Familie

Die cDNAs von *NtERF5* und *NtERF6* wurden mit Hilfe des "Hefe-one-Hybrid"-Systems aus einer Tabakblatt-cDNA-Bibliothek isoliert. Aufgrund ihrer abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurden sie in die ERF-Familie eingeordnet. Für die DNA-Bindung besitzen sie jeweils eine AP2-Domäne (Hao *et al.*, 1998). Bei einigen ERF-Proteinen konnte eine Repressordomäne eingegrenzt werden, die als EAR-Motiv (ERF-associated amphiphilic repression motif) bezeichnet wird (Ohta *et al.*, 2001). Im EAR-Motiv $^L/FDLN^L/F(X)P$, wechseln sich hydrophile und hydrophobe Aminosäuren ab, wobei die Asparaginsäure amphiphil ist. NtERF5 und NtERF6 besitzen diese Domäne jedoch nicht. Ein Hinweis, dass es sich bei NtERF6 um einen Aktivator handelt, ergibt sich aus der Tatsache, dass dessen Leserahmen in der cDNA-Bibliothek durch eine Verschiebung nicht mit der GAL4-Aktivierungsdomäne fusioniert war, jedoch im "Hefe-one-Hybrid"-System den *HIS3*-Reporter aktiviert hat.

6.2 Die DNA-Bindung von NtERF5

Neben der zumindest temporären Lokalisierung im Zellkern und der aktivierenden, bzw. reprimierenden Eigenschaft ist eine wichtige Anforderung an einen Transkriptionsfaktor seine Fähigkeit, an DNA zu binden. Bei NtERF5 wird die DNA-Bindung durch die AP2-Domäne vermittelt. Proteine mit dieser Domäne binden an die Basensequenz 5'-TAAGAGCCGCC-3', die auch als GCC-Box bezeichnet wird, als Monomere (Hao *et al.*, 1998).

Die GCC-Box ist häufig im Promotorbereich von Genen zu finden, die durch Ethylen induzierbar sind und im Rahmen der Pathogenabwehr reguliert werden. GCC-Boxen sind in Tabak bereits im Promotor (-1164 bis -1118) einer β -1,3-Glukanase (*Glu2*) der Klasse 1 (Ohme-Takagi und Shinshi, 1995), der basischen Chitinase 48 (*CHN48*; -503 bis -358) der Klasse 1 (Yamamoto *et al.*, 1999) und im Promotor von *Osmotin*, einem PR5-Gen (Sato *et al.*, 1996), identifiziert worden. In *Arabidopsis* befinden sich GCC-Boxen im Promotor von *PR1b* (-201 bis -191) (Büttner und Singh, 1997) und des Gens *HOOKLESS* (*HLS*) (Fujimoto *et al.*, 2000). Nicht ganz geklärt ist bisher der DNA-Bereich, an den NtERF5 und NtERF6 im "Hefe-one-Hybrid"-Hefestamm YM4271-32-60, der die K-Box vor den Reporter genen trägt, bindet.

Im multimerisierten Bereich der K-Box vor dem *HIS3*-Reporter ist keine GCC-Box enthalten. Ausserhalb der Box befindet sich jedoch aufgrund der Klonierungsstrategie ein Bereich aus dem Plasmid pUK21, das einige G / C-reiche Elemente enthält. Im genannten Hefestamm gibt es mit *lacZ* noch ein weiteres Reportergen. Dieses konnte von den beiden Transkriptionsfaktoren nicht aktiviert werden und enthält auch nicht den G / C-reichen Abschnitt aus dem pUK21. Verwendet man einen Hefestamm, der statt der K-Box die C-Box enthält (YM4271-18), sonst aber vor dem *HIS3*-Reportergen sequenzidentisch ist, so aktivieren NtERF5 und NtERF6 ebenfalls das Reportergen. Resultierend aus den beschriebenen DNA-Bindestudien in verschiedenen Hefestämmen, wurde geschlossen, dass NtERF5 und NtERF6 an den G / C reichen Abschnitt aus dem pUK21 binden.

Die DNA-Bindung von ERF-Proteinen wurde bereits detailliert untersucht (Sakuma *et al.*, 2002). Die ERF-Proteine aus *A. thaliana* wurden basierend auf der abgeleiteten Aminosäuresequenz der AP2-Domäne hinsichtlich der Ähnlichkeit der einzelnen Aminosäuren in sechs Gruppen (B1-B6) unterteilt. Für die spezifische Bindung an die GCC-Box wurden hier die konservierten Aminosäuren Alanin an Position 14 und Asparaginsäure an Position 19 mittels EMSA als notwendig charakterisiert. Mitglieder der Gruppen B1- B3 sind bereits bekannte und charakterisierte Proteine, wie AtERF1-5, ERF1 und AtEBP, die spezifisch an die GCC-Box binden. NtERF6 lässt sich aufgrund seiner Aminosäuresequenz in die Gruppe B2 einordnen, NtERF5 gehört in die Gruppe B3. Konserviert in allen ERF-Proteinen ist desweiteren auch das Motiv WLG an Position 27-29 und an Position 37 ein Alanin. NtERF5 besitzt ebenfalls die genannten, konservierten Aminosäuren und Motive und erfüllt theoretisch alle Voraussetzungen, um an die GCC-Box zu binden. Es band *in vitro* im EMSA jedoch nur sehr schwach an das Fragment mit der GCC-Box aus dem Promotor des Gens *HOOKLESS* (Fujimoto *et al.*, 2000), wenn unaufgereinigter Gesamtextrakt der *E. coli*-Expressionskultur eingesetzt wurde. Im Gegensatz dazu band die Positivkontrolle AtERF1 sowohl im unaufgereinigten Extrakt, wie auch nach der Aufreinigung mittels His₆-tag im EMSA schon in kleineren Mengen sehr gut an die GCC-Box. Diese eingeschränkte Bindung von NtERF5 legt die Vermutung nahe, dass eine postranslationale Modifikation des Faktors, wie z.B. eine Phosphorylierung, zur Bindung an DNA nötig sein könnte. Für Pti4 ist bereits gezeigt worden, dass nach *in vitro* Phosphorylierung mit der Kinase Pto die DNA-Bindung von Pti4 an die GCC-Box im EMSA verstärkt wird (Gu *et al.*, 2000). Die Phosphorylierungsstudien von NtERF5 durch eine WIPKinase, wie auch durch eine SIPKinase erhöhten im *in vitro* System jedoch nicht dessen Bindefähigkeit an die GCC-Box (mündliche Mitteilung von Frank Menke).

Da NtERF5 und NtERF6 im "Hefe-one-Hybrid"-System das Reporter-gen aktiviert haben, müssen sie in Hefe in der Lage sein, an DNA zu binden. Aus diesem Grund wurden native Gesamtextrakte aus Hefezellen, die NtERF5 und NtERF6 exprimierten, im EMSA eingesetzt. Eine *in vitro* DNA-Bindung konnte aber auch mit diesen Extrakten nicht nachgewiesen werden. Es wurden daraufhin weitere DNA-Fragmente, wie die DRE-Box, getestet, an die NtERF5 möglicherweise binden könnte, ausserdem wurde die Bindungsreaktion an die GCC-Box bei 4 °C durchgeführt (nach Xue, 2003). Dabei wurden jedesmal unaufgereinigte und aufgereinigte Extrakte von NtERF5 verglichen. Keiner dieser Ansätze resultierte in einer Bindung von NtERF5 an die angebotene DNA.

Um die DNA-Bindung von NtERF5 zu erreichen, könnte eine Modifikation in Form einer Phosphorylierung nötig sein. Denkbar ist auch, dass die gewählten Bedingungen im EMSA nicht optimal für die DNA-Bindung von NtERF5 waren. Möglicherweise ist die GCC-Box aber auch nicht das richtige *cis*-Element. Zur Isolierung möglicher Zielgene ist die Anwendung des Differential Display denkbar. Damit können Gene identifiziert werden, die in der transgenen Pflanze abweichend reguliert sind. Mit Hilfe von Footprint-Analysen mit deren Promotorbereich könnte man die Bindestelle von NtERF5 eingrenzen.

6.3 NtERF5 und NtERF6 sind nicht an der Regulation der pflanzlichen Entwicklung beteiligt

Im Wildtyp lässt sich ein Transkript von *NtERF5* lediglich sehr schwach in den Kelchblättern nachweisen. Für *NtERF6* war ebenfalls in den Kelchblättern und darüberhinaus in allen getesteten Geweben der Blüte mehr oder weniger stark ein Transkript über einen Northern Blot nachweisbar. In der Literatur gibt es Hinweise, dass spezifisch bei der Blütenentwicklung in einzelnen Geweben der Tabakblüten bestimmte PR-Gene exprimiert werden (Lotan *et al.*, 1989; Santamaria *et al.*, 2001). Deren Funktion in diesem Zusammenhang ist noch unklar. So werden Gene der PR1-Familie in den Kelchblättern exprimiert. Eine β -1,3-Glukanase wird im Pistill exprimiert. In allen weiteren Blütengeweben kommt es im Laufe ihrer Entwicklung zu einer messbaren β -1,3-Glukansaseaktivität (Cote *et al.*, 1991). Die Überexpression von NtERF5 oder NtERF6 hatte jedoch keine Auswirkungen auf die Blütenbildung. Sie resultierte auch nicht in der Verkleinerung der Pflanze, wie es beispielsweise bei der Überexpression von ERF1 oder Pti4 in *Arabidopsis* der Fall ist (Lorenzo *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2002).

Der β -1,3-Glukanase wird auch bei der Samenkeimung eine Funktion zugeordnet. Beim Durchbrechen des Keimlings durch das Endosperm, wird das Transkript von *NtERF3* kurz vor dem der β -1,3-Glukanase induziert und übernimmt deshalb wahrscheinlich dessen Regulation (Leubner-Metzger *et al.*, 1998). Der Einfluss der Überexpression von NtERF5 oder NtERF6 auf die Auskeimung der transgenen Samen wurde allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht getestet.

6.4 NtERF5 ist an der Pathogenabwehr beteiligt

Transkriptionsfaktoren, die an der Signalkaskade der Pathogenabwehr beteiligt sind, sind oft bereits durch einzelne Signalmoleküle, wie etwa Pflanzenhormone, induzierbar. *NtERF1-4* aus Tabak sind beispielsweise durch Ethylen induzierbar (Ohme-Takagi und Shinshi, 1995). Um die Induzierbarkeit von *NtERF5* und *NtERF6* zu untersuchen, wurden die Signalmoleküle Salizylsäure, Jasmonat und Ethylen, das aus Ethephon freigesetzt wurde, verwendet. Mit Hilfe des Northern Blot wurde sichtbar, dass innerhalb des getesteten Zeitraumes von 24 Stunden keines dieser Pflanzenhormone die Transkription von *NtERF5* und *NtERF6* in Blättern spezifisch veränderte. Die Applikation dieser Hormone allein war möglicherweise nicht ausreichend für die Induktion von *NtERF5* und *NtERF6*, oder NtERF5 und NtERF6 sind nicht in die bereits bekannten Signalwege eingebunden. Eine Funktion im Rahmen der Pathogenabwehr konnte damit aber noch nicht ausgeschlossen werden. Es wurde deshalb die Induktion der beiden Gene nach Infektion der Tabakpflanzen mit verschiedenen Pathogenen untersucht.

Im Gegensatz zur Applikation von Signalmolekülen war die Infektion mit ausgewählten Pathogenen ausreichend, um die Transkription von *NtERF5*, jedoch nicht von *NtERF6* zu induzieren. Der Fokus wurde daher in den folgenden Experimenten auf die Funktion von NtERF5 bei der Pathogenabwehr gerichtet. Nach Infektion mit avirulenten Pseudomonaden wurde *NtERF5* bereits nach acht Stunden vermehrt in Blättern transkribiert, nach Infektion mit virulenten Pseudomonaden erst nach 24 Stunden. Dieser Unterschied in der Induktionskinetik zwischen der kompatiblen und der inkompatiblen Abwehr deutete darauf hin, dass NtERF5 sowohl in die spezifische, durch ein Avirulenzgenprodukt ausgelöste Abwehr involviert ist, als auch in die Pathogenabwehr, die nicht auf der Erkennung eines Avirulenzgenprodukts in der Pflanze beruht. Dieser Befund und die Tatsache, dass in *Arabidopsis* die Überexpression von Pti4 aus Tomate zu einer eingeschränkten Vermehrung von avirulenten Pseudomonaden führt (Gu *et al.*, 2002), bildeten die Basis für eigene Versuche mit Tabak-Mutanten. Es wurden dazu transgene Tabakpflanzen erzeugt, die

NtERF5 konstitutiv exprimieren. Als Kontrolle wurden Pflanzen erzeugt, die NtERF6 konstitutiv exprimieren. In den Blättern dieser Pflanzen wurde die Vermehrung von avirulenten und virulenten Pseudomonaden mit Hilfe von Titerexperimenten untersucht. Im Vergleich zu Wildtyppflanzen und Pflanzen, die NtERF6 überexprimieren, konnte in den Pflanzen, die NtERF5 überexprimieren, kein Unterschied des Wachstums der Bakterien im Verlauf von vier Tagen festgestellt werden. Sowohl bei der kompatiblen, als auch bei der inkompatiblen Interaktion war die Überexpression von NtERF5 folglich allein nicht ausreichend für eine erhöhte Toleranz der Pflanzen gegen die Infektion mit Pseudomonaden. Im Gegensatz dazu ist beispielsweise die Überexpression des ERF-Proteins Pti5 aus Tomate ausreichend, um die Vermehrung von Pseudomonaden einzuschränken.

Ebenfalls mit Hilfe von Titerexperimenten wurde die möglicherweise veränderte Induktion der SAR getestet. Jedoch wurde auch diese durch die alleinige Überexpression von NtERF5 nicht verändert.

Weiterhin gibt es in der Literatur bereits einige Beispiele dafür, dass die Überexpression von ERF-Proteinen u. a. zur konstitutiven Expression von PR-Genen führt. Die Überexpression von ERF1 in *Arabidopsis* beispielsweise führt zur konstitutiven Expression einer basischen Chitinase und PDF1.2 (Berrocal-Lobo *et al.*, 2002). Diese Pflanzen sind dann resistenter gegen die Infektion mit pertotrophen Pilzen, aber weniger tolerant gegen die Infektion mit *P. s. pv. tomato* DC3000. Pti4 aus Tomate aktiviert bei Überexpression in *Arabidopsis* Gene der durch Salizylsäure vermittelten Abwehr, wie *PR1* und *PR2* und Gene der durch Jasmonat und Ethylen vermittelten Abwehr, wie *PR3*, *PR4*, *PDF1.2* und *Thi1.2*. Diese Pflanzen sind resistenter gegen die Infektion mit *Erysiphe orontii* und *P. s. pv. tomato* (Gu *et al.*, 2002). Bei Pflanzen, die NtERF5 überexprimieren, wurde jedoch keines der getesteten Abwehrgene, wie *PR1a*, *PR3*, *HMGR* und *SAR8.2* konstitutiv exprimiert. Hier ist offensichtlich entweder ein noch unbekannter Stimulus erforderlich, um einige PR-Gene zu induzieren, oder es wurden Abwehrgene aktiviert, die nicht getestet wurden, oder NtERF5 hat keinen Effekt auf die Induktion von PR-Genen.

Demnächst können Wildtyppflanzen schnell und umfassend mit den transgenen Pflanzen hinsichtlich einer veränderten Expression von Abwehrgenen mit Hilfe von Micro-Arrays verglichen werden. Momentan wird an der Amplifizierung von rund 400 Abwehrgenen gearbeitet, die auf Array-Filter gespottet werden, um damit die konstitutive Expression einzelner Abwehrgene in den transgenen Pflanzen schnell und umfassend zu untersuchen.

Für Tsi1 ist gezeigt worden, dass die Überexpression dieses ERF-Proteins aus Tabak in Paprika zu einer erhöhten Resistenz der Pflanzen gegen Virusinfektionen beiträgt (Shin *et al.*,

2002). Ein bisher noch nicht im Zusammenhang mit der Überexpression von ERF-Proteinen publiziertes Pathogen ist TMV. Tabakpflanzen, die das N-Gen im Genom tragen und somit TMV erkennen können, wurden an den Blättern infiziert. Bei Temperaturshiftexperimenten wurden Pflanzen an den unteren Blättern mit TMV infiziert. Diese Pflanzen wurden für vier Tage bei 32 °C inkubiert, in dieser Zeit breitete sich das Virus in der Pflanze aus, danach wurde die Temperatur auf 22 °C abgesenkt. Ab diesem Zeitpunkt wurde die Expression von *NtERF5* und *NtERF6* im Northern Blot verfolgt. *NtERF5* war in den lokal und den systemisch infizierten Blättern von Wildtyppflanzen nach neun Stunden induziert. *NtERF6* war dagegen in seiner Transkription nicht signifikant verändert. *NtERF5* könnte also an der Abwehr von TMV in der Pflanze beteiligt sein. Es wurden deshalb Temperaturshiftexperimente mit transgenen Pflanzen, die *NtERF5* überexprimieren, durchgeführt. Dabei zeigten die systemisch infizierten Blätter im Gegensatz zum Wildtyp keine HR in Form von kleinen Läsionen. Die lokal infizierten Blätter brachen dagegen vergleichbar mit dem Wildtyp aufgrund der massiv einsetzenden HR vollkommen zusammen. Dieser Effekt beruhte entweder auf der eingeschränkten Replikation des Virus in den transgenen Pflanzen oder dessen Ausbreitung mittels des Movementproteins wurde negativ beeinflusst.

Ein Enzym, das die Verbreitung von Viren in Pflanzen indirekt beeinflussen kann, ist die oben bereits erwähnte β -1,3-Glukanase. Das Gen der β -1,3-Glukanase enthält im Promotor eine GCC-Box (Hart *et al.*, 1993). Dieses PR2-Gen wird nach TMV-Infektion in Tabakpflanzen induziert (Antoniw *et al.*, 1980). TMV breitet sich von Zelle zu Zelle über die Plasmodesmata aus. Diese sind mit dem β -1,3-Glukan Kallose ausgekleidet. Der Abbau dieser Kallose wird durch die β -1,3-Glukanase bewirkt. Pflanzen, die dieses Enzym nicht exprimieren, sind resistenter gegen die Infektion mit Viren. Die Resistenz resultiert aus einer eingeschränkten Verbreitung des Virus in diesen Pflanzen, deren Ursache in der vermehrten Ablagerung von Kallose liegt, die zu einem verkleinerten "size exclusion limit" der Plasmodesmata führt (Iglesias und Meins, 2000). Überexprimiert man dagegen die β -1,3-Glukanase zusammen mit dem Virus, so führt das lokal zu einer erhöhten Hydrolyse der Kallose und zu einer schnelleren Ausbreitung des Virus (Bucher *et al.*, 2001). Soweit scheint die Induktion dieses PR2-Gens sich bei der Infektion mit TMV nachteilig für die Pflanze auszuwirken. Die β -1,3-Glukanase wird ebenfalls in den oberen, nicht direkt infizierten Blättern einer Pflanze exprimiert, es wird daher eine Rolle in der SAR diskutiert (Cote *et al.*, 1991). Andere Möglichkeiten, die diskutiert werden, sind ein Einfluss der β -1,3-Glukanase auf das Zytoskelett und damit auf den Transport des Virus zu den Plasmodesmata hin oder die

Vergrößerung des "size exclusion limit" allein durch den Einfluss des Virus gänzlich ohne eine Beteiligung der β -1,3-Glukanase (Iglesias und Meins, 2000).

Die Expression der β -1,3-Glukanase wurde in den transgenen Pflanzen, die NtERF5 überexprimieren, bisher noch nicht getestet. Vielmehr wurde die Ausbreitung und Replikation des Virus im Northern Blot und indirekt mit Hilfe der HR-Läsionen untersucht.

Infizierte man die Pflanzen mit TMV und kultivierte sie bei 22 °C, so bildeten sie nach fünf Tagen sichtbare Läsionen. Diese waren in den Blättern der transgenen Pflanzen, die NtERF5 stark exprimieren, im Vergleich zum Wildtyp deutlich kleiner. Die Ausbreitung des Virus wurde nach Kultivierung der infizierten Pflanzen bei 32 °C für 30 Stunden, statt wie normalerweise für 4 Tage in Temperaturshiftexperimenten, genauer beobachtet. Die direkt infizierten Blätter brachen nicht vollständig zusammen, sondern nur eingeschränkte Bereiche. Vermutlich handelte es sich dabei um die Areale, in die sich das Virus bis dahin bereits ausgebreitet hatte. Dabei waren die Läsionen der Blätter der Wildtyppflanze grösser als bei den Blättern der transgenen Pflanzen, die NtERF5 überexprimieren. Die Läsionen der Blätter von Pflanzen, die NtERF6 überexprimieren, waren ebenfalls etwas kleiner als die der Wildtyppflanzen, aber grösser als die der transgenen Pflanzen, die NtERF5 überexprimieren. In zwei unterschiedlichen Experimenten konnten Hinweise auf eine eingeschränkte Replikation, bzw. Verbreitung des Virus gesammelt werden.

Im Northern Blot mit RNA aus Blättern sah man deutlich die eingeschränkte Replikation der Virus-RNA bei Temperaturshiftexperimenten. So ist nach vier Tagen Kultivierung der infizierten Pflanzen bei 32 °C im Wildtyp mindestens doppelt und oft sogar fünfmal soviel Virus-RNA wie in den getesteten, transgenen Linien, die NtERF5 konstitutiv exprimieren, nachweisbar. Die starken Schwankungen in der Transkriptmenge resultierten aus der Methode der Infektion, bei der Virus-RNA mit Watte auf das Blatt appliziert wurde. Dabei war es schwierig, eine stets gleiche Menge Virus-RNA zu applizieren. Um die Replikation des TMV zu messen, kann zukünftig mit Zellkulturen gearbeitet werden. Dabei wird der Transport des Virus von Zelle zu Zelle ausgeschlossen, und es kann mit exakt vergleichbaren Virus-Mengen infiziert werden. Die Replikation des Virus in den Zellkulturen kann mittels RT-PCR bestimmt werden.

Um die Ausbreitung des Virus näher zu untersuchen, kann weiterhin ein TMV eingesetzt werden, das durch ein GFP markiert ist (Quelle B. Baker). So kann man das Virus wesentlich einfacher und direkter mikroskopisch verfolgen.

6.5 Die unterschiedliche Induktion von *NtERF5* und *NtERF6* nach Verwundung

Verwundung ist ein weiteres wichtiges Signal, das der Pflanze den Angriff von Frassfeinden meldet. Eine Induzierbarkeit durch Verwundung konnte bereits für viele ERF-Proteine gezeigt werden. *AtERF1-5* und *NtERF1-4* z.B. sind durch Verwundung innerhalb kurzer Zeit induzierbar (Fujimoto *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 1998; Nishiuchi *et al.*, 2002).

Auch für *NtERF5* und *NtERF6* konnte durch unterschiedliche Verwundungsformen (Reiben der Blätter mit Carborundum, Einspritzen von Wasser in den Apoplasten oder Ausstanzen von Blattscheiben) eine Zunahmen der Transkripte gezeigt werden. Die Kinetik der Induktion war dabei abhängig von der Art und Weise der Verwundung. Nach 1-3 Stunden nahmen die Transkripte von *NtERF5* und *NtERF6* nach Ausstanzen von Blattscheiben und Einspritzen von Wasser in den Apoplasten zu. Dabei kam es jedesmal zu Verletzungen der Blattadern. Rieb man die Blattoberfläche mit Carborundum ein, nahm die Transkriptmenge von *NtERF5* bereits nach 30 Minuten leicht zu.

Für *PR3*, einer basischen Chitinase, konnte eine veränderte Induktionskinetik nach Verwundung der Blätter mit Carborundum beobachtet werden. Das war in den transgenen Pflanzen, die *NtERF5* überexprimieren, ausreichend, das Transkript von *PR3* nach sechs Stunden zu induzieren. Im Wildtyp wurde *PR3* nicht induziert. Der Promotor von *PR3* enthält zwar G / C-reiche Abschnitte, jedoch keine vollständige GCC-Box. In Bindestudien mit *NtERF5* und diesem Promotorabschnitt konnte *in vitro* keine Bindung nachgewiesen werden. Der Transport eines potentiellen Signals vom Ort der Verwundung in andere Bereiche der Pflanze, wie es von der Gruppe um Shinshi 2002 postuliert wird, in denen es dann *NtERF6* induzieren könnte, kann ausgeschlossen werden, da in den nicht verletzten Bereichen der Pflanze *NtERF6* nicht induziert wurde. Eine Funktion von *NtERF5* und *NtERF6* bei der Abwehr von Frassfeinden ist noch nicht getestet worden und kann somit nicht ausgeschlossen werden.

6.6 Versuche zur genomweiten Analyse von ERF-Faktoren aus *Arabidopsis thaliana*

In *Arabidopsis* sind eine Reihe ERF-Proteine näher in ihrer Funktion untersucht worden. Die grosse Anzahl der Gene (145) wirft die Frage auf, ob jedes einzelne Protein eine spezifische Funktion hat, oder ob mehrere Proteine im gleichen Funktionszusammenhang zu finden sind und sich dort auch gegenseitig ersetzen können. Bei fast allen ERF-Proteinen findet man in

den Datenbanken auch zugehörige ESTs (Expressed Sequences Tags). Das bedeutet, dass diese Gene tatsächlich unter bestimmten Bedingungen exprimiert werden. Die genomweite Untersuchung von ERF-Proteinen im REGIA-Projekt war bei der Klärung der spezifischen Funktion eines jeden ERF-Proteins eine grosse Hilfe. Mit Hilfe der bei diesem Projekt entstandenen Micro-Array-Filtern konnte das Transkriptprofil in der Pflanze nach Infektion mit virulenten, bzw. avirulenten Pseudomonaden drei und sechs Stunden nach Infektion ermittelt werden. Als Kontrolle für die Induktion der Pathogenabwehr durch die Infektion mit Pseudomonaden und Applikation von Salizylsäure wurde 24 Stunden nach der Behandlung der Pflanzen die Induktion von *PRI* überprüft. Aus den Daten des Micro-Array wurde beispielhaft die Transkriptveränderung von vier, bzw. drei zu NtERF5, bzw. NtERF6 nahe verwandten ERF-Proteinen untersucht. Die Verwandtschaft wurde aus der abgeleiteten, vollständigen Aminosäuresequenz mit Hilfe des Alignment-Moduls des Programms Vector NTI hergeleitet. Die sieben Gene waren jedoch unterschiedlich induziert, was ein starker Hinweis auf die nicht-redundante Funktion der Proteine ist. Auffällig war, dass Gene, die nach der Infektion mit virulenten Pseudomonaden leicht induziert wurden, durch die Infektion mit avirulenten Pseudomonaden in der gleichen Zeit stärker induziert wurden. Dies ist ein Hinweis, dass diese ERF-Proteine sowohl in die durch Avirulenzgenprodukte induzierte Abwehr, als auch in die davon unabhängige Abwehr involviert sind.

Als Kontrolle für die Daten des Micro-Array wurde die Induktion von zwei Genen nocheinmal im Northern Blot getestet. AP2-21 und AP2-31 wurden als die Proteine mit der höchsten Homologie zu NtERF6 und NtERF5 identifiziert und deshalb ausgewählt. Im Unterschied zu NtERF6 ist AP2-21 durch Infektion mit avirulenten Pseudomonaden und durch Applikation von Salizylsäure nach drei bis sechs Stunden leicht induzierbar. AP2-31, mit der höchsten Homologie zu NtERF5, war im Gegensatz zu NtERF5 wiederum durch die Applikation von Salizylsäure nach sechs Stunden induziert. AP2-31 wurde nicht durch die Infektion mit Pseudomonaden induziert, möglicherweise ist er nicht an der kompatiblen oder inkompatiblen Abwehr innerhalb der ersten sechs Stunden nach der Infektion beteiligt. Aus der Aminosäuresequenzhomologie muss also nicht zwangsweise auch die Homologie in der Funktion resultieren.

6.7 Der Einfluss der verringerten Expression von AP2-21 und AP2-31 auf die Pathogenabwehr

Die untersuchte T-DNA-Insertionslinie GARLIC_1215_H10.b.1a.Lb3Fa im Gen *At1g53910* (*ap2-21*) war phänotypisch hinsichtlich ihrer Grösse, Blühzeit, Blüten- und Samenbildung nicht verändert. Es wurden zwei homozygote Linien isoliert und der genaue Insertionsort der T-DNA bestimmt. Ob und wieviele weitere T-DNA-Insertionen pro Linie vorhanden sind, konnte noch nicht festgestellt werden. Auf Infektion mit Pseudomonaden und *Botrytis cinerea* reagierten die homozygoten Pflanzen phänotypisch innerhalb der ersten Woche wie der Wildtyp. Offensichtlich beeinflusst der Funktionsverlust dieses Proteins nicht die Pathogenabwehr oder die Induktion der HR. Molekulare Veränderungen, wie die konstitutive Induktion von Abwehrgenen, konnten noch nicht getestet werden.

Um die Expression des Gen *AP2-31* zu unterdrücken, wurden RNAi-Linien konstruiert. Bis auf eine Ausnahme waren vier unabhängige Linien phänotypisch unverändert. Die Linie AP2-31#16 hat wiederholt circa eine Woche früher als die anderen RNAi-Linien mit der Blütenbildung begonnen. Dieses Phänomen konnte jedoch nicht auf die unterdrückte Expression von AP2-31 zurückgeführt werden, da unabhängige Linien, die keine verfrühte Blütenbildung zeigten, ebenfalls einen wirksamen RNAi-Effekt aufwiesen, der mit RT-PCR überprüft wurde. Um zu klären, ob die T-DNA bei der Transformation in einen (kodierenden) Bereich inseriert wurde, der an der zeitlichen Regulation der Blütenbildung beteiligt ist, können die flankierenden Bereiche der T-DNA mit der Methode der TAIL-PCR amplifiziert und anschliessend sequenziert werden.

Die RNAi-Linie AP2-31#13 verhielt sich bei Infektion mit Pseudomonaden und *Botrytis cinerea* wie der Wildtyp. Die minimale Expression von AP2-31 in diesen Pflanzen war entweder ausreichend für die Abwehr der Pathogene und Induktion der HR oder AP2-31 ist nicht an diesem Funktionszusammenhang beteiligt.

Die veränderte Expression von PR-Genen konnte in den RNAi-Linien noch nicht untersucht werden.

6.8 Ausblick

Zur weiteren Klärung der Funktion von NtERF5 im Rahmen der Pathogenabwehr sollte untersucht werden, ob andere Abwehrgene als die bereits getesteten in den transgenen Pflanzen, die NtERF5 überexprimieren, konstitutiv induziert werden. Dies kann schnell und

umfassend mit den bald zur Verfügung stehenden Array-Filtern mit circa 400 Abwehrgenen geschehen. Von den in den NtERF5-überexprimierenden Pflanzen abweichend regulierten Genen sollten dann die Promotorbereiche isoliert werden, um die Bindestelle von NtERF5, die immer noch nicht ganz geklärt ist, weiter einzugrenzen. Diese Bindestelle kann mit Footprintanalysen oder Deletionsderivaten des Promotors im EMSA oder in transienten Assays näher charakterisiert werden.

Die eingeschränkte Ausbreitung, bzw. Replikation von TMV in transgenen Pflanzen, die NtERF5 überexprimieren, sollte hinsichtlich einer veränderten Expression der β -1,3-Glukanase untersucht werden. Dieses Enzym scheint u.a. indirekt an der Ausbreitung des TMV in der Pflanze beteiligt zu sein.

Die Induktion von NtERF6 muss weiter in ihrem Funktionszusammenhang geklärt werden. Bereits begonnen wurde die Untersuchung einer Funktion von NtERF6 bei Salzstress. Dafür wurden Blattscheiben auf Puffer mit 200 mM und 400 mM NaCl gelegt und für 72 Stunden bei Dauerlicht kultiviert. Dabei kam es zu einem Abbau von Chlorophyll, der mit den Kontrollen vergleichbar war. Unerwartet war das Einrollen der Blattscheiben von Tabakpflanzen, die NtERF6 überexprimieren in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen.

Bei der Arbeit mit Arabidopsismutanten sollte für die T-DNA-Insertionslinie die Anzahl der T-DNAs im Genom mit einem Southern Blot geklärt werden. Die Insertion einer weiteren T-DNA in einen anderen kodierenden Bereich könnte die Reaktion der Pflanze nach Pathogeninfektion verfälschen. Desweiteren sollten jetzt molekulare Veränderungen nach Pathogeninfektion in den RNAi-Pflanzen und der T-DNA-Insertionslinie im Northern Blot untersucht werden

7 Literaturverzeichnis

- AHL GOY, P., FELIX, G., METREAUX, J.P., MEINS, F.J. (1992): Resistance to the disease in the hybrid *Nicotiana glutinosa* x *Nicotiana debeneyi* is associated with high constitutive levels of β -1,3-glucanase, chitinase, peroxidase and polyphenoloxidas. *Physiol. Mol. Plant Path.* **41**, 11-21
- ALEXANDRE, C., GRUENEBERG, D.A., GILMAN, M.Z. (1993): Studying heterologous transcription factors in yeast. *Methods: A companion to Methods in Enzymology* **101**, 192-201
- ALLEN, M.D., YAMASAKI, K., OHME-TAKAGI, M., TATENO, M., SUZUKI, M. (1998): A novel mode of DNA recognition by a β -sheet revealed by the solution structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA. *The EMBO Journal* **17**, 5484-5496
- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W., LIPMAN, D.J. (1990): Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410
- ANTONIW, J.F., RITTER, C.E., PIERPOINT, W.S., VAN LOON, L.C. (1980): Comparison of the three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. *J.Gen.Virol.* **47**, 79-87
- BARTEL, P.L., CHIEN, C.-T., STERNGLANZ, R., FIELDS, S. (1993): Using the two-hybrid system to detect protein-protein interactions. *Cellular Interactions in Development: A Practical Approach*, ed. Hartley, D.A. (Oxford University Press, Oxford) pp. 153-175
- BAUMANN, K., DE PAOLIS, A., COSTANTINO, P., GUALBERTI, G. (1999): The DNA binding site of the Dof protein NtBBF1 is essential for tissue-specific and auxin-regulated expression of the rolB oncogene in plants. *Plant Cell* **11**(3), 323-334
- BERNSTEIN, E., CAUDY, A. A., HAMMOND, S. M., HANNON, G. J. (2001): Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**, 363-366
- BERROCAL-LOBO, M., MOLINA, A., SOLANO, R., (2002): Constitutive expression of ethylene-responsive-factor1 in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. *The Plant Journal* **29**, 23-32
- BOLIVAR, F., BACKMAN, K. (1979): Plasmids of *E. coli* as cloning vectors. *Methods Enzymol.* **68**, 245-267
- BOLTON, MCCARTHY (1962): A general method for isolation of RNA complementary to DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. (PNAS) USA* **48**, 1390-1397

- BOLWELL, G.P. (1999):** Role of active oxygen species and NO in plant defense responses. *Curr.Opin. Plant Biol.* **2**, 287-294
- BRADFORD, M.M. (1979):** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
- BRADLEY, D.J., KJELBOOM, P., LAMB, C.J., (1992):** Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline rich plant cell wall protein: A novel, rapid defense response. *Cell* **70**, 21-30
- BUCHER, G.L., TARINA, C., HEINLEIN, M., DI SERIO, F., MEINS, JR., F., IGLESIAS, V.A. (2001):** Local expression of enzymatically active class I β -1,3-glucanase enhances symptoms of TMV infection in tobacco. *The Plant Journal* **28 (3)**, 361-369
- BÜTTNER, M., SINGH, K.B., (1997):** *Arabidopsis thaliana* ethylene-responsive element binding protein (AtEBP), an ethylene-inducible, GCC box DNA-binding protein interacts with an ocs element binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 5961-5966
- CALKHOVEN, C.F., GEERT, A.B. (1996):** Multiple steps in the regulation of transcription-factor level and activity. *Biochem.J.* **317**, 329-342
- CHANG, J.H., RATHJEN, J.P., BERNAL, A.J., STASKAWICZ, B.J., MICHELMORE, R.W. (2000):** AvrPto enhances growth and necrosis caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in tomato lines lacking either Pto or Prf. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**, 568-571
- CHANG, C., SHOCKEY, J. (1999):** The ethylene-response pathway: signal perception to gene regulation. *Current Opinion in Plant Biology* **2**, 352-358
- CHURCH G.M. AND GILBERT W.:** Genomic sequencing. *PNAS* **81(7)**, 1991-1995 (1984)
- CLOUGH, S.J., BENT A.F. (1998):** Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**, 735-43
- CLOUGH, S.J., BENT A.F. (2002):** Simplified *Arabidopsis* transformation protocol. www.arabidopsis.org/info/transformation.html
- CORPET, F. (1988):** Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.* **16**, 10881-10890
- COTE, F., CUTT, J.R., ASSELIN, A., KLESSIG, D.F. (1991):** Pathogenesis-related acidic beta-1,3-glucanase genes of tobacco are regulated by both stress and developmental signals. *Mol. Plant Microbe Interact.* **4**, 173-181
- CUTT, J.R., DIXON, D.C., CARR, J.P., KLESSIG, D.F. (1988):** Isolation and nucleotide sequence of cDNA clones for the pathogenesis-related proteins PR1a, PR1b and PR1c of

- Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi* nc induced by TMV infection. *Nucleic Acids Res.* **25**;16(20), 9861
- DA COSTA E SILVA, O., KLEIN, L., SCHMELZER, E., TRIZZINI, G.F., HAHLBROCK, K. (1993):** BPF-1, a pathogen-induced DNA-binding protein involved in the plant defense response. *Plant J.* **4**, 125-135
- DANGL, J.L., JONES, J.D.G. (2001):** Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**, 826-833
- DAVIS, I., ISH-HOROWICZ, D. (1991):** Apical localization of pair-rule transcripts requires 3' sequences and limits protein diffusion in the *Drosophila* blastoderm embryo. *Cell* **67**(5), 927-940
- DE PATER, S., GRECO, V., PHAM, K., MEMELINK, J., KIJNE, J. (1996):** Characterization of a zinc-dependent transcriptional activator from *Arabidopsis*. *Nucl. Acids Res.* **24**, 4624-4631
- DINGWALL, C., LASKEY, R.A. (1991):** Nuclear targeting sequences-a consensus? *Trends Biochem. Sci.* **16**, 478-481
- DIXON, R.A., HARRISON, M.J., LAMB, C.J. (1994):** Early events in the activation of plant defense responses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **32**, 479-501
- DIXON, R.A., PAIVA, N.L. (1995):** Stress-induced Phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* **7**, 1085-1097
- DONG, X. (1998):** SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Current Opinion Plant Biol.* **1**, 316-323
- DOWER, W.J., MILLER, J.F., RAGSDALE, W.W. (1988):** High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**, 6127-6145
- DRÖGE-LASER, W., KAISER, A., LINDSAY, W.P., HALKIER, B.A., LOAKE, G.J., DOERNER, P., DIXON, R.A., LAMB, C. (1997):** Rapid stimulation of a soybean protein-serine kinase that phosphorylates a novel bZIP DNA-binding protein, G/HBF-1, during the induction of early transcription-dependent defenses. *EMBO J.* **16**, 726-738
- DRÖGE-LASER W, SIEMELING U, PÜHLER A, BROER I. (1994):** The Metabolites of the Herbicide L-Phosphinothricin (Glufosinate) (Identification, Stability, and Mobility in Transgenic, Herbicide-Resistant, and Untransformed Plants). *Plant Physiol.* **105**(1), 159-166
- ELLIS, J.G., TOKUHISA, J.G., LEWELLYN, D.J., BOUCHEZ, D., SINGH, K., DENNIS, E.S., PEACOCK, W.S. (1993):** Does the ocs-element occur as a functional component of the promoters of plant genes? *Plant J.* **4**, 433-443

- ERICKSON, F. L., HOLZBERG, S., CALDERON-URREA, A., HANDLEY, V., AXTELL, M., CORR, C., BAKER, B. (1999): The helicase domain of the TMV replicase proteins induces the N-mediated defense response in tobacco. *The Plant Journal* **18** (1), 67-75
- FEINBERG, A.P. and VOGELSTEIN, B. (1983): A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**, 6-13
- FELDBRÜGGE, M., SPRENGER, M., HAHLBROCK, K., WEISSHAAR, B.: PcMyb1, a novel plant protein containing a DNA-binding domain with one MYB-repeat, interacts in vivo with a light-regulatory promotor unit. *Plant Journal* **11**, 1079-1093
- FEYS, B.J., PARKER, J.E. (2000): Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends in Genetics*, **16** (10), 449-455
- FOO, S., NOLAN, G. (1999): NF- κ B to the rescue: RELs, apoptosis and cellular transformation. *Trends in genetics* **15**(6)
- FUKUDA, Y. (1997): Interaction of tobacco nuclear proteins with an elicitor-responsive element in the promotor of a basic classI chitinase gene. *Plant Mol.Biol.* **34**, 81-87
- FUJIMOTO, S.Y., OHTA, M., USUI, A., SHINSHI, H., OHME-TAKAGI, M. (2000): Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCCbox-mediated gene expression. *The Plant Cell* **12**, 393-404
- GISH, W., STATES, D.J. (1993): Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nature Genet.* **3**, 266-272
- GOLDSBROUGH, A.P., ALBRECHT, H., STRATFORD, R. (1993): Salicylic acid-inducible binding of a tobacco nuclear protein to a 10 bp sequence which is highly conserved amongst stress-inducible genes. *Plant J.* **3**, 563-571
- GRISHOK, A., PASQUINELLI, A. E., CONTE, D., LI, N., PARRISH, S., HA, I., BAILLIE, D., FIRE, A., RUVKUN, B., MELLO, C. C. (2001): Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* **106**, 23-34
- GU, Y., WILDERMUTH, M.C., CHAKRAVARTHY, S., LOH, Y., YANG, C., HE, X., HAN, Y., MARTIN, G.B. (2002): Tomato transcription factors Pti4, Pti5, and Pti6 activate defense responses when expressed in Arabidopsis. *The Plant Cell* **14**, 817-831
- GU, Y., YANG, C., THARA, V.K., ZHOU, J., MARTIN, G.B. (2000): *Pti4* is induced by ethylene and salicylic acid, and its product is phosphorylated by the Pto kinase. *The Plant Cell* **12**, 771-785
- HANAHAH, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Bio.* **166**, 557-580

- HAMMOND, S. M., BERNSTEIN, E., BEACH, D., HANNON, G. J. (2000):** An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**, 293-296
- HAMMOND, S. M., CAUDY, A. A., HANNON, G. J. (2001):** Post-transcriptional gene silencing by double stranded RNA. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 110-119
- HAO, D., OHME-TAKAGI, M., SARAI, A. (1998):** Unique mode of GCC box recognition by the DNA-binding domain of Ethylene-responsive Element-binding Factor (ERF domain) in plant. *J. of biol. Chem.* **273**, 26857-26861
- HAO, D., YAMASAKI, K., SARAI, A., OHME-TAKAGI, M. (2002):** Determinants in the sequence specific binding of two plant transcription factors, CBF1 and NtERF2, to the DRE and GCC motifs. *Biochemistry* **41**, 4202-4208
- HART, C.M., NAGY, F., MEINS, F, JR. (1993):** A 61 bp enhancer element of the tobacco β -1,3-glucanase B gene interacts with one or more regulated nuclear proteins. *Plant Mol. Biol.* **21**, 121-131
- HE, P., WARREN, R.F., ZHAO, T., SHAN, L., ZHU, L., TANG, X., ZHOU, L. (2001) :** Overexpression of *Pti5* in tomato potentiates pathogen-induced defense gene expression and enhances disease resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *MPMI* **14**, 1453-1457
- HE, S.Y., HUANG, H.-C., COLLMER, A. (1993):** *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Harpin: a protein that is secreted via Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell* **73**, 1255-1266
- HEINEKAMP, T., KUHLMANN, M., LENK, A., STRATHMANN, A., DRÖGE-LASER, W. (2002):** The tobacco bZIP transcription factor BZI-1 binds to G-Box elements in the promoters of phenylpropanoid pathway genes in vitro, but is not involved in their regulation in vivo. *MGG* **267**, 16-26
- HERBERS, K., MONKE, G., BADUR, R., SONNEWALD, U. (1995):** A simplified procedure for the subtractive cDNA cloning of photoassimilate-responding genes: isolation of cDNAs encoding a new class of pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol.* **29(5)**, 1027-38
- HILL, J., DONALD, K.A., GRIFFITHS, D.E. (1991):** DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. *Nuc. Acids Res.* **19**, 5791
- HOKEMA, A., HIRSCHP.R., HOOYKAAS P.J.J. and SCHILPEROORT R.A. (1983):** A binary plant vector strategy based on separation of *vir* and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* **303**, 179-180
- HUNT, M.D. (1996):** Systemic acquired resistance. *Plant Cell* **8**, 1809-1819

- HUNTER, T., KARIN, M. (1992): The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell* **70**(3), 375-387
- HURST, H.C. (1995): Transcription factors. 1. bZIP Proteins. *Protein Profile* **2**, 105-168
- ITO, H., FUKADA, Y., MURATA, K., KIMURA, A. (1983): Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**, 163-168
- IGLESIAS, V.A., MEINS, JR., F. (2000): Movement of plant viruses is delayed in a β -1,3-glucanase-deficient mutant showing a reduced plasmodesmatal size exclusion limit and enhanced callose deposition. *The Plant Journal* **21**(2), 157-166
- INOUE, H., NOJIMA H. and OKAYAMA H. (1990): High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23
- JOFUKU, K.D., DEN BOER, B.G.W., VAN MONTAGU, M., OKAMURO, J.K. (1994): Control of Arabidopsis flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2*. *Plant Cell* **6**, 1211-1225
- JUPIN, I., CHUA, N.H. (1996): Activation of the as-1 cis-element by salicylic acid: differential DNA binding of a factor related to TGA1a. *The EMBO Journal* **15**(20), 5679-568
- KAGAYA, Y., OHMIYA, K., HATTORI, T. (1999): RAV1 a novel DNA-binding protein, binds to a bipartite recognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants. *Nuc. Acids Res.* **27**, 470-478
- KARIN, M., HUNTER, T. (1995): Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Current Biol.* **5**, 747-757
- KASSANIS, B. (1952): Some effects of high temperature on the susceptibility of plants to infection with viruses. *Ann. Appl. Biol.* **39**, 358-369
- KIEBER, J.J., ROTHENBERG, M., ROMAN, G., FELDMAN, K.A., ECKER, J.R. (1993): *CTR1* a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell* **72**, 427-441
- KIM, Y.-J., LIN, N.-C., AND MARTIN, G.B. (2002): Two distinct Pseudomonas effector proteins interact with the Pto Kinase and activate plant immunity. *Cell* **109**, 589-598
- KITAJIMA, S., KOYAMA, T., OHME-TAKAGI, M., SHINSHI, H., SATO, F. (2000): Characterization of gene expression of NsERFs, transcription factors of basic PR genes from *Nicotiana glauca*. *Plant Cell Physiol.* **41**, 817-824
- KITAJIMA, S., SATO, F. (1999): Plant pathogenesis-related Proteins: molecular mechanisms of gene expression and protein function. *J. Biochem.* **125**, 1-8
- KISLAUSKIS, E. H., SINGER, R. H. (1992): Determinants of mRNA localization. *Current Opinion in Plant Biology* **4**(6), 975-978

- KNAPP, E AND LEWANDOWSKI, D.J. (2001):** Tobacco mosaic virus, not just a single component virus anymore. *Molecular Plant Pathology* **2(3)**, 117-123
- KNOCH H. AND DUVICK J.P. (1987):** The role of fungal toxins in plant disease. *Brit Mycol. Soc. Symp. Ser.* **13**, 158-192
- KORFHAGE, U., TREZZINI, G.F., MEIER, I., HAHLBROCK, K., SOMSSICH, I.E. (1994):** Plant homeodomain protein involved in transcriptional regulation of a pathogen defense-related gene. *Plant Cell* **6**, 695-708
- LAMB, C.J., LAWTON, M.A., DRON, M., DIXON, R.A. (1989):** Signals and transduction mechanisms for activation of plant defense against microbial attack. *Cell* **56**, 215-224
- LAWTON, K., WARD, E., PAYNE, G., MOYER, M., RYALS, J. (1992):** Acidic and basic class III chitinase mRNA accumulation in response to TMV infection of tobacco. *Plant Mol. Biol.* **19(5)**, 735-743
- LEBEL, E., HEIFETZ, P., THORNE, L., WARD, E. (1998):** Functional analysis of regulatory sequences controlling PR-1 gene expression in Arabidopsis. *The Plant Journal* **16(2)**, 223-233
- LEGOUILL, C., PARENT, J.L., ROLA-PLESZCZYNSKI, M., STANKOWA, J. (1994):** Analysis of recombinant plasmids by a modified alkaline lysis method. *Analytical Biochemistry* **219**, 164
- LEUBNER-METZGER, G., PETRUZZELLI, L., WALDVOGEL, R., VÖGELI-LANGE, R., MEINS JR., F. (1998):** Ethylene-responsive element binding protein (EREBP) expression and the transcriptional regulation of class I β -1, 3-glucanase during tobacco seed germination. *Plant Molecular Biology* **38**, 785-795
- LEVINE, A., TENHAKEN, R., DIXON, R., LAMB, C.J. (1994):** H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**, 583-593
- LI, J.J., HERSKOWITZ, I. (1993):** Isolation of ORC6, a component of the yeast origin recognition complex by a one-hybrid system. *Science* **262(5141)**, 1870-1874
- LI, J., SHAN, L., ZHUO, J., TANG, X. (2002):** Overexpression of Pto induces a salicylate-independent cell death but inhibits necrotic lesions caused by salicylate-deficiency in tomato plants. *MPMI* **15**, 654-661
- LIANG, P., PARDEE, A.B. (1992):** Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**, 967-971
- LIN, A., FROST, J., DENG, T., SMEAL, T., AL-ALAWI, N., KIKKAWA, U., HUNTER, T., BRENNER, D., KARIN, M. (1992):** Casein kinase II is a negative regulator of c-Jun DNA binding and AP-1 activity. *Cell* **71**, 886 ff

- LIU, J., WILSON, T.E., MILBRANDT, J., JOHNSTON, M. (1993):** Identifying DNA- binding sites and analysing DNA-binding domains using a yeast selection system. *Methods: A companion to Methods in Enzymology* **5**, 125-137
- LIU, Q., KASUGA, M., SAKUMA, Y., ABE, H., SHINOZAKI, K. (1998):** Two Transcription Factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA Binding Domain separate two cellular signal transduction pathways in Drought- and Low- Temperature-Responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. *The Plant Cell* **10**, 1391-1406
- LOAKE, G.J., FAKTOR, O., LAMB, C.J., DIXON, R.A. (1992):** Combination of H-box (CCTACC(N)7CT) and G-box (CACGTG) cis elements is necessary for feed-forward stimulation of a chalcone synthase promoter by the phenylpropanoid-pathway intermediate p-coumaric acid. *PNAS* **89(19)**, 9230-9234
- LOIS, R., DIETRICH, A., HAHLBROCK, K., SCHULZ, W. (1989):** A phenylalanine ammonia-lyase gene from parsley: structure, regulation and identification of elicitor and light responsive *cis*-acting elements. *The EMBO J.* **8**, 1641-1648
- LORENZO, O, PIQUERAS R., SANCHEZ-SERRANO J.J., SOLANO, R.:** ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 Integrates Signals from Ethylene and Jasmonate Pathways in Plant Defense. *Plant Cell* **16**, 5-78.
- LOTAN,T., ORI, N., FLUHR, R. (1989):** Pathogenesis-related proteins are developmentally regulated in tobacco flowers. *The Plant Cell* **1**, 881-887
- LUND, S., T., STALL, R., E., KLEE, H., J. (1998):** Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato. *The Plant Cell* **10**, 371-382
- LUO, Y., VIJAYCHANDER, S., STILE, J., ZHU, L. (1996):** Cloning and analysis of DNA-binding proteins by yeast one-hybrid and two-hybrid systems. *Biotechniques* **20**, 564-56
- MADDEN, T.L., TATUSOV, R.L., ZHANG, J. (1996):** Applications of network BLAST server. *Meth. Enzymol.* **266**, 131-141
- MALAMY, J., CARR, J.P., KLESSIG, D.F., RASKIN, I. (1990):** Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* **250**, 1002-1004
- MALAMY, J., HENNING, J., KLESSIG, D.F. (1992):** Temperature dependent induction of salicylic acid and its conjugates during the resistance response to Tobacco Mosaic Virus infection. *Plant Cell* **4**, 1359-1366
- MARTIN, C., PAZ-ARES, J. (1997):** Myb transcription Factors in plants. *TIG* **13(2)**, 67-73

- MAUCH-MANI, B., SLUSARENKO, A.J. (1994):** Systemic acquired resistance in *Arabidopsis thaliana* induced by predeposing infection with a pathogenic isolate of *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **7**, 378-383
- MAUCH-MANI, B., SLUSARENKO, A.J. (1996):** Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. *Plant Cell* **8**, 203-212
- MCDOWELL, J.M., DANGL, J.L. (2000):** Signaltransduction in the plant immune response. *Trends in plant science* **25**, 79-82
- MENKE, F., CHAMPION, A., KIJNE, J., MEMELINK, J. (1999).** A novel jasmonate- and elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene *Str* interacts with a jasmonate- and elicitor- inducible AP2-domain transcription factor, ORCA2. *The EMBO Journal* **18(16)**, 4455-4463
- MENKENS, A.E., SCHINDLER, U., 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**, 506-510
- METRAUX, J.-P., SIGNER, H., RYALS, J. (1990):** Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* **250**, 1004-1006
- MOYANO, E., MARTINEZ-GARCIA, J.F., MARTIN, C. (1996):** Apparent redundancy in *myb* gene function provides gearing for the control of flavonoid biosynthesis in *Antirrhinum* flowers. *Plant Cell* **8**, 1519-1532
- MULLIS, K.B., FALOONA, F.A. (1987):** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335-350
- MUR, L.A.J., NAYLOR, G., WARNER, S.A.J., SUGARS, J.M., WHITE, R.F., DRAPER, J. (1996):** Salicylic acid potentiates defense gene expression in tissue exhibiting acquired resistance to pathogen attack. *Plant J.* **9**, 559-571
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. (1962):** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* **15**, 473-497
- NISHIUCHI, T., SUZUKI, K., KITAJIMA, S., SATO, F., SHINSHI, H. (2002):** Wounding activates immediate early transcription of genes for ERFs in tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* **49**, 473-482
- OHME-TAKAGI, M., SHINSHI, H., (1995).** Ethylene-inducible DNA Binding Proteins that interact with an Ethylene- Responsive Element. *Plant Cell* **7**, 173-182
- OHME-TAKAGI, M., SUZUKI, K., SHINSHI, H., (2000):** Regulation of ethylene-induced transcription of defense genes. *Plant Cell Physiol.* **41**, 1187-1192

- OHTA, M., MATSUI, K., HIRATSU, K., SHINSHI, H., OHME-TAKAGI, M (2001): Repression domains of classII ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression. *The Plant Cell* **13**, 1959-1968
- OHTA, M., OHME-TAKAGI, M., SHINSHI, H. (2000): Three ethylene-responsive transcription factors in tobacco with distinct transactivation functions. *The Plant Journal* **22**, 29-38
- OKAMURO, J.K., CASTER, B., VILLARROEL, R., VAN MONTAGU, M., JOFUKU, K.D. (1997): The AP2 domain of APETALA2 defines a large new family of DNA binding proteins in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. (PNAS) Plant Biology* **94**, 7076-7081
- ONATE-SANCHEZ, L., SINGH, K.B. (2002): Identification of Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors with distinct induction kinetics after pathogen infection. *Plant Physiology* **128**, 1313-1322
- PAN, P., KAWAI, M., YU, L., KIM, K., HIRATA, A., UMEDA, M., UCHIMIYA, H. (2002): The *Arabidopsis thaliana* ethylene-responsive element binding protein (AtEBP) can function as a dominant suppressor of Bax-induced cell death of yeast. *FEBS Letters* **508**, 375-378
- PARK, J.M., PARK, C.J., LEE, S.B., HAM, B.K., SHIN, R., PAK, K.H. (2001): Overexpression of the tobacco Tsi1 gene encoding an EREBP/AP2-type transcription factor enhances resistance against pathogen attack and osmotic stress in tobacco. *The Plant Cell* **13**, 1035-1046
- PERLMANN, D.C. AND HALVORSON, H.O. (1987): Improved resolution of DNA fragments in polysaccharid-supplemented agarose gels. *Analytical Biochem.* **163**, 247-256
- POLYCARPOU-SCHWARZ, M., PAPAVALASSIOLIOU, A. (1995): Protein-DNA interactions revealed by the Southwestern Blotting Procedure. *Methods In Molecular And Cellular Biology* **5**, 152-161
- PORATH, J., CARLSSON, J., OLSON, I. AND BELFRAGE, G. (1975): Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**, 598-599
- PRAT, S., WILLMITZER, L., SANCHEZ SERRANO, J.J. (1989): Nuclear proteins binding to a 35S annotated promoter. *Mol. Gen. Genet.* **217**, 209-214
- PRELL, H.H. (1996): Interaktionen von Pflanzen und phytopathogene Pilzen: Parasitierung und Resistenz, genetik und molekulare Phytopathologie. *G. Fischer Verlag*
- RATHJEN, J.P., CHANG, J.H., STASKAWICZ, B.J., MICHELMORE, R.W. (1999): Constitutively active *Pto* induces a *Prf*-dependent hypersensitive response in the absence of *avrPto*. *The EMBO Journal* **18**, 3232-3240
- RIECHMANN, J.L., MEYEROWITZ, E.M. (1999): The AP2/EREBP family of transcription factors. *Biol. Chem.* **379**, 633-646

- RIELY, B.K., MARTIN, G.B. (2001):** Ancient origin of pathogen recognition specificity conferred by the tomato disease resistance gene *Pto*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (PNAS)* **98**, 2059-2064
- ROMERO, I., FUERTES, A., BENITO, M.J., MALPICA, J.M., LEYVA, A., PAZ-ARES, J. (1998):** More than 80 *R2R3-Myb* regulatory genes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **14**, 273-284
- RUSHTON, P.J., SOMSSICH, I.E. (1998):** Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. *Current Opinion in Plant Biology* **1**, 311-315
- RUSHTON, P.J., TORRES, J.T., PARNISKE, M., WERNERT, P., HAHLBROCK, K., SOMSSICH, I.E. (1996):** Interactions of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1-genes. *EMBO J.* **15**, 5690-5700
- RYALS, J.A., NEUENSCHWANDER, U.H., WILLITS, M.G., MOLINA, A., STEINER, H.Y., SALLES, F.J., LIEBERFARB, M.E., WREDEN, C., GERGEN, J.P., STRICKLAND, S. (1994):** Coordinate initiation of *Drosophila* development by regulated polyadenylation of maternal messenger RNAs. *Science* **266**, 1996-1999
- SAKUMA, Y., LIU, Q., DOBOUZET, J.G., ABE, H., SHINOZAKI, K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. (2002):** DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochemical and Biophysical Communications* **290**, 998-1009
- SALMERON, J.M., OLDROYD, G.E.D., ROMMENS, C.M.T.SCOFIELD, S.R., KIM, H.-S., LAVELLE, D.T., DAHLBECK, D., AND STASKAWICZ, B.J. (1996):** Tomato Prf is a member of the leucine-rich-repeat class of plant disease resistance genes and lies embedded within the *Pto* kinase gene cluster. *Cell* **86**, 123-133
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. (1989):** Molecular cloning: A Laboratory Manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R. (1977):** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. (PNAS) USA* **74**, 5463-5467
- SANTAMARIA, M., THOMSON, C.J., READ, N.D., LOAKE, G.J. (2001):** The promoter of a basicPR1-like gene, AtPRB1, from *Arabidopsis* establishes an organ-specific expression pattern and responsiveness to ethylene and methyl jasmonate. *Plant Mol. Biol.* **47(5)**, 641-652
- SATO, F., KITAJIMA, S., KOYAMA, T., YAMADA, Y. (1996):** Ethylene-induced gene expression of osmotin-like protein, a neutral isoform of tobacco PR-5, is mediated by the AGCCGCC *cis*-sequence. *Plant Cell Phys.* **37**, 249-255

- SCHEEL, D. (1998):** Resistance response physiology and signal transduction. *Current Opinion in Plant Biology* **1**, 305-310.
- SCHMIDT, R.J., BURR, F.A., AUKERMANN, M.J., BURR, B. (1990):** Maize regulatory gene opaque-2 encodes a protein with a "leucine-zipper" motif that binds to zein DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. (PNAS) USA* **87**, 46-50
- SESSA, G., D'ASCENZO, M., LOH, Y., MARTIN, G.B. (1998):** Biochemical properties of two protein kinases involved in disease resistance signaling in tomato. *Biochemistry and mol. biology* **25**, 15860-15865
- SESSA, G., D'ASCENZO, M., LOH, Y., MARTIN, G.B. (2000):** Thr38 and Ser198 are Pto autophosphorylation sites required for the avrPto-Pto-mediated hypersensitive response. *The EMBO Journal* **19**, 2257-2269
- SHAH, J., KLESSIG, D.F. (1996):** Identification of a salicylic acid-responsive element in the promotor of the tobacco pathogenesis-related rn-1,3-glucanase gene, *PR2-d*. *Plant J.* **10**, 1089-1101
- SHIN, R., PARK, J.M., AN, J.M., PAEK, K.H. (2002):** Ectopic expression of Tsi1 in transgenic hot pepper plants enhances host resistance to viral, bacterial, and oomycete pathogens. *Mol Plant Microbe Interact.* **15(10)**, 983-989
- SHINOZAKI, K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. (2000):** Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signalling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* **3**, 217-223
- SMITH, N.A., SINGH, S.P., WANG, M.B., STOUTJESDIJK, P.A., GREEN, A.G., WATERHOUSE, P.M. (2000):** Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* **407(6802)**, 319-320
- SOLANO, R., STEPANOVA, A., CHAO, Q., ECKER, J.R. (1998):** Nuclear events in ethylene signalling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes and Development* **12**, 3703-3714
- STASKAWICZ, B.J., AUSUBEL, F.M., BAKER, B.J., ELLIS, J.G., JONES, J.D.G. (1995):** Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* **268**, 661-667
- STERMER, B.A., SCHMIDT, J., LAMB, C.J., DIXON, R.A. (1990):** Infection and stress activation of bean chalcon synthase promoters in transgenic tobacco. *Mol. Plant Microb. Interact.* **3**, 381-388
- STOCKINGER, E., GILMOUR, S., THOMASHOW, M. (1997):** *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/ DRE, a

- cis-acting DNA Regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc. Natl. Acad. Sci. (PNAS) Plant Biology* **94**, 1035-1040
- STROBEL, N.E., JI, C., KUC, J.A., HE, S.Y. (1996):** Induction of systemic acquired resistance in cucumber by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 HrpZpss protein. *Plant J.* **9**, 431-439
- SULKOWSKY, E. (1985):** Purification of proteins by IMAC. *Trends Biotechnol.* **3**, 1-7
- SUZUKI, M., KAO, C.Y., COCCIOLONE, S., MCCARTHY, D.R. (2001):** Maize VP1 complements Arabidopsis *abi3* and confers a novel ABA/auxin interaction in roots. *Plant J.* **28(4)**, 409-18.
- SUZUKI, K., SUZUKI, N., OHME- TAKAGI, M., SHINSHI, H. (1998):** Immediate early induction of mRNAs for ethylene-responsive transcription factors in tobacco leaf strips after cutting. *The Plant Journal* **15**, 657-665
- TAIZ, L. ZEIGER, E. (1998):** Plant physiology. Sinauer Associates, Inc., Publishers
- TANG , X., XIE, M., KIM, Y.J, ZHOU, J., KLESSIG, D.F., MARTIN, G.B. (1999):** Over-expression of *Pto* activates defense responses and confers broad resistance. *The Plant Cell* **11**, 15-29
- THARA, V.K., TANG, X., GU, Y.Q., MARTIN, G.B., ZHOU, J-M (1999):** *Pseudomonas syringae* pv *tomato* induces the expression of tomato EREBP-like genes *Pti4* and *Pti5* independent of ethylene, salicylate and jasmonate. *The Plant Journal* **20**, 475-483
- THILMONY, R.L., CHEN, Z., BESSAN, R.A., MARTIN, G.B. (1995):** Expression of the tomato *Pto* gene in tobacco enhances resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* expressing *avrPto*. *Plant Cell* **7**, 1529-1536.
- THORDAL-CHRISTENSEN, H. (2003):** Fresh insight into processes of nonhost resistance. *Curr. Op.in Plant Biology*, **6**, 351-357
- UKNES, S., MAUCH-MANI, B., MOYER, M., ROTTER, S., WILLIAMS, S., DINCHER, S., CHANDLER, S., SLUSARENKO,A., WARD, E., RYALS, J. (1992):** Acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **4**, 645-656
- UKNES, S., DINCHER, S., FRIEDRICH, L., NEGROTTO, D., WILLIAMS, S., THOMPSON-TAYLOR, H., POTTER, S., WARD, E., RYALS, J. (1992):** Regulation of pathogenesis-related protein-1a gene expression in tobacco. *Plant Cell* **5**, 156-169
- VAN LOON, L.C., VAN STRIEN, E.A. (1999):** The families of pathogenesis-related proteins, their activities and comparative analysis of PR1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **55**, 85-97

- VERA-ESTRELLA, R., BARKLA, B.J., HIGGINS, V.J., BLUMWALD, E. (1994):** Plant defense response to fungal pathogens. II. G-Protein-mediated changes in host plasma membrane redox reactions. *Plant Physiol.* **106**, 97-102
- WANG, Z., YANG, P., FAN, B., CHEN, Z. (1998):** An oligo selection procedure for identification of sequence-specific DNA-binding activities associated with the plant defense response. *The Plant Journal* **16(4)**, 515-522
- WARD, E.R., UKNES, S.J., WILLIAMS, S.C., DINCHER, S.S., WIEDERHOLD, D-L., ALEXANDER, D.C., AHL-GOY, P., METRAUX, J.-P., RYALS, J.A. (1991):** Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* **3**, 1085-1094
- WILSON, I., VOGEL, J., SOMERVILLE, S. (1997):** Signalling pathways: A common theme in plants and animals? *Current Biology* **7**, 175-178
- WILSON, T.E., FAHRNER, T.J., JOHNSTON, M., MILBRANDT, J. (1991):** Identification of the DNA-binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. *Science* **252**, 1296-1300
- WOLF, S., DEOM, C.M., BEACHY, R., LUCAS, W.J. (1991):** Plasmodesmatal function is probed using transgenic tobacco plants that express a virus movement protein. *Plant Cell* **3**, 593-604
- WU, K., TIAN, L., HOLLINGWORTH, J., BROWN, D.C.W., MIKI, B. (2002):** Functional analysis of tomato *Pti4* in Arabidopsis. *Plant Physiology* **128**, 30-37
- XIAO, F., TANG, X., ZHOU, J. (2001):** Expression of 35S::*Pto* globally activates defense-related genes in tomato plants. *Plant Physiology* **126**, 1637-1645
- XU, P., NARASIMHAN, M.L., SAMSON, T., COCA, M.A., HUH, G., ZHOU, J., MARTIN, G.B., HASEGAWA, P.M., BRESSAN, R.A. (1998):** A nitrilase-like Protein interacts with GCC Box DNA-binding Proteins involved in ethylene and defense responses. *Plant Physiol.* **118**, 867-874
- XUE, G.-P. (2003):**The DNA-binding activity of an AP2 transcriptional activator HvCBF2 involved in regulation of low-temperature responsive genes in barley is modulated by temperature. *The Plant Journal* **33**, 373-383
- YALPANL, N., SILVERMANN, P., WILSON, T.M., KLEIER, D.A. AND RASKIN, I. (1991):** Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco. *Plant Cell* **3(8)** 809-818
- YAMAMOTO, S., SUZUKI, K., SHINSHI, H. (1999):** Elicitor- responsive, ethylene-dependent activation of GCC box- mediated transcription that is regulated by both protein

- phosphorylation and dephosphorylation in cultured tobacco cells. *The Plant Journal* **20**, 571-579
- YANG, S.F. (1969):** Ethylene evolution from 2-chloroethylphosphonic acid. *Plant Physiol.* **44**, 1203-1204
- YANG, Y., KLESSIG, D. (1996):** Isolation and characterization of a tobacco mosaic virus-inducible *myb* oncogene homolog from tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci.(PNAS) Plant Biology* **93**, 14972-14977
- YANG, Y., SHAH, J., KLESSIG, D. (1997):** Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Dev.* **11**, 1621-1639
- YU, L.M., LAMB, C.J., DIXON, R.A. (1993):** Purification and characterization of proteins which bind to H-box *cis*-element implicated in transcriptional activation of plant defense genes. *Plant J.* **3**, 805-816
- ZAMORE, P.D., TUSCHL, T., SHARP, P. A., BARTEL, D.P. (2000):** RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* **101**, 25-33
- ZHOU, J., LOH, Y.-T., LI, P.H. (1995):** The tomato gene *Pti1* encodes a serine / threonine kinase that is phosphorylated by *Pto* and is involved in the hypersensitive response. *Cell* **83**, 925-935
- ZHOU, J., TANG, X., MARTIN, G., M. (1997):** The *Pto* kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a *cis*-element of pathogenesis-related genes. *The EMBO Journal* **16**, 3207-3218
- ZHU, Q., DRÖGE-LASER, W., DIXON, R.A., LAMB, C. (1996):** Transcriptional activation of plant defense genes. *Current Opinion in Genetics and Development* **6**, 624-630

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

2,4-D	2,4-Dichlorophenoxyessigsäure
% (v / v)	Volumenprozent
% (w / v)	Gewichtsprozent
μ	micro (x 10 ⁻⁶)
°C	Grad Celsius
³² P	Phosphorisotop der relativen Masse 32
A	Adenosin
AP2	Apetala 2
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Abb.	Abbildung
abs.	Absolut
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxosulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BD	basische Domäne
bp	Basenpaar
bidest	bidestilliertes Wasser
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
X-GAL	x-Galactoidase
C	Cytosin
ca.	Zirka
CaMV	Blumenkohlmosaikvirus „Cauliflower Mosaic Virus“
cDNA	Kopie-DNA von RNA-Sequenzen
cfu	colony forming units
Ci	Curie
cpm	Radioaktive Zerfälle pro Minute
d	Tag
d.h.	das heisst
dATP	2'-Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxy-Cytidin-5'-Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	2'-Desoxy-Guanosin-5'-Triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA

dTTP	2'-Desoxy-Thymidin-5'-Triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	'electrophoretic mobility shift assay' = Gelshift
<i>et al.</i>	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
fmol	Femtomol
F	Farad
g	Gramm
G	Guanosin
h	Stunde(n)
HEC	Hydroxyethylcellulose
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HIS	Histidin-tag
HR	Hypersensitive Reaktion
HRP	Meerrettichperoxidase 'horseradishperoxidase'
HSP	Heringssperma-DNA
Hyg	Hygromycin
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galaktosid
k	kilo
km	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
LB	Luria / Bertani-Medium
Lsg.	Lösung
λ	Wellenlänge
m	milli ($\times 10^{-3}$)
m	Meter
M	Molar
MCS	multiple cloning site, Polylinker
MeJA	Methyljasmonsäure
min	Minute(n)
mind.	Mindestens
mm	Millimeter
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
MS	Murashige und Skoog Medium
MW	Molekulargewicht
μ m	micrometer
n	nano ($\times 10^{-9}$)
N	Domäne N
nm	nanometer
<i>N. t.</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>

NES	Nuclear export sequence			
NLS	Nuclear lokalisation sequence			
OD	optische Dichte			
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm			
Ω	Ohm			
p	pico (x 10 ⁻¹²)			
P	Phosphat			
³² P	Phosphorisotop mit der rel. Masse 32			
PAA	Polyacrylamid			
PAL	Phenylammoniumlyase			
PCR	polymerase chain reaction (= Polymerasekettenreaktion)			
PEG	Polyethylenglycol			
pH	negativer dekadischer Wasserstoffionenkonzentration	Logarithmus		der
PIPES	Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfonsäure)			
polydI/dC	Polydesoxyinosin-desoxycytidylsäure			
PR	pathogenesis related			
PVDF	Polyvinylidenfluorid			
rek.	rekombinant			
rel.	relativ			
Rif	Rifampicin			
RNA	Ribonukleinsäure			
RNase A	Ribonuklease A			
ROS	reactive oxygen species			
rpm	rounds per minute			
RT	Raumtemperatur			
s.o.	siehe oben			
s.u.	siehe unten			
SA	Salizylsäure			
SAR	systemic acquired resistence			
SDS	Natriumlaurylsulfat			
sek	Sekunde(n)			
SNN	Samsun NN, Tabakkultivar			
SSC	standard saline citrat buffer			
ssDNA	Einzelstrang-DNA			
T	Thymin			
Tab.	Tabelle			
TAPS	N-[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-3-aminopropansulfonsäure			
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin			
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan			
u	Unit (=Einheit) der Enzymaktivität			
u.a.	unter anderem			
u.U.	unter Umständen			
UTR	untranslated region			

ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
Vol	Volumen
X-Gal	5-Chlor-4-Brom-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid
z.B.	zum Beispiel

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

8.2 Mit Hilfe der RACE ermittelte Basensequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von *NtERF5*

```

F G A P S L L Q A S A V D G P G I R F * Y
1TTT TGG NGC NCC CAG CTT GTT GCA GGC CTC TGC AGT CGA CGG GCC CGG GAT CCG ATT CTA ATA
AAA ACC NCG NGG GTC GAA CAA CGT CCG GAG ACG TCA GCT GCC CGG GCC CTA GGC TAA GAT TAT
D S L * G K Q W * Q R S S T R G R L S * Q
64CGA CTC ACT ATA GGG CAA GCA GTG GTA ACA ACG CAG CAG TAC GCG GGG GAG ACT CTC TTG ACA
GCT GAG TGA TAT CCC GTT CGT CAC CAT TGT TGC GTC GTC ATG CGC CCC CTC TGA GAG AAC TGT
P K T Q K M S S N S S P L E I D T S F S H
127ACC AAA AAC ACA AAA AGA TGT CAA GTA ACT CAA GCC CAC TAG AAA TAG ACA CTT CAT TTT CAC
TGG TTT TTG TGT TTT TCT ACA GTT CAT TGA GTT CCG GTG ATC TTT ATC TGT GAA GTA AAA GTG

```

Abb. 8.1: Mit der RACE ermittelte Basensequenz für den 5'-Bereich von *NtERF5*, mit abgeleiteter Aminosäuresequenz

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zuerst bei PD Dr. Wolfgang Dröge-Laser bedanken. Es war eine schöne Zeit, in der ich viel gelernt habe, in einer Arbeitsatmosphäre, die immer gestimmt hat.

Bedanken möchte ich mich natürlich auch bei Prof. Dr. Chistiane Gatz für die Möglichkeit, diese Arbeit in ihrer Abteilung anzufertigen, und die Übernahme des Korreferats.

Ganz besonders dankbar bin ich allen meinen WDL-Laborkollegen: Thorsten Heinekamp, Markus Kuhlmann, Anne Strathmann, Stefan Böttner, Fridtjof Weltmeier, Xuan Wang und Katrin Wehler. Ihr habt meinen musikalischen Horizont, auch mit Gesang, um einiges erweitert.

Bei der Amplifizierung, Klonierung, Sequenzierung, Transformation und Charakterisierung der Arabidopsen für REGIA haben mir Andrea Lenk und Yu-Jin Bae sehr geholfen-ganz grosses DANKE dafür.

Mein Dank geht auch an "die von oben" für Hilfe, Erklärungen und Unterstützung in allen Laborlebenslagen. Ganz besonders danke ich T.B. für den Zentimeter.

Für die Pflege und Anzucht der Pflanzen möchte ich Felicitas Glasnapp und Uwe Wedemeier danken. Ein Dankeschön ebenfalls an Ronny Scholz, Heike Freundt und Christine Schütz, dass sie das Labor "am Laufen" gehalten haben.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mich immer bei der Verwirklichung meiner Ziele unterstützt haben.

Ein dickes **DANKE** geht schliesslich noch an Dennis.

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Ute Fischer
Geboren am: 19.03.1973 in Berlin
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: Ledig

STUDIUM

seit 03/00 Promotion am „Albrecht von Haller Institut für Pflanzenwissenschaften“
10/96-02/00 Hauptstudium der Biologie an der „Georg August Universität“ Göttingen
Diplomprüfung in den Fächern: Organische Chemie, Mikrobiologie und Pflanzenphysiologie
09/94-09/96 Grundstudium der Biologie an der „Georg August Universität“ Göttingen
Vordiplom in den Fächern: Chemie, Physik, Botanik und Mikrobiologie

AUSLANDSAUFENTHALT

08/93-08/94 Au-pair Aufenthalt in Birmingham, UK

SCHULE

12/87-07/93 "Finsterwalder Gymnasium", Rosenheim
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife
07/87-11/87 "Dominikus Zimmermann Gymnasium", Landsberg / Lech
09/79-06/87 12.POS "Georgi Dimitroff", Berlin

