

**Untersuchungen zur Aktivität eines
Trockenstress- und Abscisinsäure-induzierbaren
Promotors aus der Wiederauferstehungspflanze
Craterostigma plantagineum und
Isolierung von DNA-Bindeproteinen**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Andrea Ditzer

aus

Wipperfürth

Bonn 2003

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. Dorothea Bartels
2. Referent: Prof. Dr. Heide Schnabl

Tag der Promotion: 30.07.2003



Hauptweg und Nebenwege

Paul Klee, 1929

Inhalt

Inhalt	I
Abkürzungsverzeichnis	IX
Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	XIII
1. Einleitung	1
1.1. Wasser ist nicht unbegrenzt verfügbar	1
1.2. Pflanzen haben verschiedene Strategien entwickelt, um sich an trockene Umweltbedingungen anzupassen	2
1.3. Die Wiederauferstehungspflanze <i>Craterostigma plantagineum</i>	3
1.4. Bei Trockenstress leiten Pflanzen vielfältige Überlebensmaßnahmen ein	6
1.4.1. Trockenstress-bedingte Gefahren für die Zellen	6
1.4.2. Primärstoffwechsel und Antioxidantien	7
1.4.3. Zucker und kompatible Solute	8
1.4.4. Schutzproteine: LEA-Proteine und kleine Hitze-Schock-Proteine (sHSP)	8
1.4.5. Die „Water-Replacement“-Hypothese als Modell für die Wirkungsweise von Zuckern, kompatiblen Soluten und Schutzproteinen bei der Austrocknung	10
1.4.6. Schutz der DNA bei der Austrocknung	11
1.5. Die koordinierte Expression von Zielgenen: Signaltransduktion	12
1.5.1. Die Regulationskaskade	12
1.5.2. Die Verpackung der DNA	14
1.5.3. Transkriptionsfaktoren und Promotor-Bindestellen	16
1.6. Zielsetzung der Arbeit	17
2. Material und Methoden	21
2.1. Pflanzenmaterial	21
2.2. Bakterienstämme und Hefen	21
2.3. Phagen und Vektoren	22

2.4.	Primer (von 5' → 3')	23
2.5.	Chemikalien, Radioisotope und Hilfsmittel	26
2.6.	Enzyme und Marker	27
2.7.	Membranen und Filme	27
2.8.	Kits	27
2.9.	Geräte	28
2.10.	Datenbanken und Software	28
2.11.	Medien	28
2.12.	Zusätze für Medien	29
2.13.	Puffer und Lösungen	29
2.14.	Anzuchtbedingungen	30
2.14.1.	Anzucht von <i>Craterostigma plantagineum</i>	30
2.14.2.	Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i>	30
2.14.3.	Anzucht von Bakterien	30
2.14.4.	Anzucht von Hefen	31
2.15.	Isolierungsmethoden	31
2.15.1.	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>Craterostigma</i> und <i>Arabidopsis</i>	31
2.15.2.	Isolierung von Poly(A) ⁺ -RNA aus <i>Craterostigma plantagineum</i>	31
2.15.3.	Isolierung von genomischer DNA aus <i>Craterostigma</i> <i>plantagineum</i> und <i>Arabidopsis thaliana</i>	33
2.15.4.	Isolierung von genomischer DNA für PCR aus <i>Arabidopsis</i>	33
2.15.5.	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	34
2.15.5.1.	Plasmid-Präparation im kleinen Maßstab	34
2.15.5.2.	Plasmid-Präparation im großen Maßstab	35
2.15.6.	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	36
2.15.7.	Isolierung einer DNA-Bande aus einem Agarosegel	36
2.15.8.	(PCI-) Fällung von DNA	37
2.15.9.	Isolierung von Kernproteinen aus <i>Craterostigma plantagineum</i>	37
2.15.10.	Isolierung von Proteinen aus <i>E. coli</i>	38
2.15.11.	Isolierung von Gesamt-Protein aus Hefe	39
2.16.	Quantifizierungsmethoden	39
2.16.1.	Photometrische Konzentrationsbestimmung	39

2.16.2.	Bio-Rad-Protein-Assay zur Bestimmung der Protein- konzentration nach der Bradford-Methode	40
2.17.	Klonierungsmethoden	40
2.17.1.	Primer-Design und (Mutagenese-) PCR	40
2.17.2.	Restriktion	43
2.17.3.	Dephosphorylierung	44
2.17.4.	Ligation	44
2.17.5.	Transformation	44
2.17.5.1.	Herstellung Calcium-kompetenter <i>E. coli</i>	44
2.17.5.2.	Transformation Calcium-kompetenter <i>E. coli</i>	45
2.17.5.3.	Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i>	45
2.17.5.4.	Herstellung elektrokompetenter <i>A. tumefaciens</i>	45
2.17.5.5.	Elektroporation	46
2.17.6.	Screening-Methoden	47
2.17.6.1.	Kolonie-Hybridisierung	47
2.17.6.2.	Kolonie-PCR	47
2.17.6.3.	Blau-Weiß-Selektion	47
2.17.7.	QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis	48
2.17.8.	Anlage von Dauerkulturen (Glycerin-Stocks)	48
2.18.	Sequenzierung	48
2.19.	RT-PCR	48
2.20.	Elektrophorese, Blotting- und Hybridisierungsmethoden	49
2.20.1.	Agarose-Gel-Elektrophorese von DNA und Gesamt-RNA	49
2.20.2.	RNA-Agarose-Gel-Elektrophorese für RNA-Blots	50
2.20.3.	Transfer von DNA auf Nitrozellulosemembran und anschließende Fixierung	51
2.20.4.	Transfer von RNA auf Nylonmembran und anschließende Fixierung	51
2.20.5.	Herstellung einer $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP-markierten Sonde mittels Random-Primer-Labeling und Gelausschlusschromatographie	52
2.20.6.	Hybridisierung und Autoradiographie	52
2.20.7.	Denaturierende Protein-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie-Färbung	53

2.21.	Screening einer genomischen Bank von <i>Craterostigma plantagineum</i> im Bakteriophagen-Vektor EMBL 4 λ	54
2.21.1.	Phageninfektion	54
2.21.2.	Plaquelift und Hybridisierung	55
2.21.3.	Picken von (Einzel-) Plaques	55
2.21.4.	λ -DNA-Präparation aus Plattenlysat und Klonierung in pUC19	56
2.22.	Protein-DNA-Bindungsstudien (EMSA)	56
2.22.1.	Sonden-Herstellung und Aufreinigung	57
2.22.2.	Bindereaktion	57
2.22.3.	Elektrophorese und Autoradiographie	57
2.23.	Hefe-One Hybrid-Screening	58
2.23.1.	Konstruktion einer cDNA-Bibliothek im Vektor pPC 86	58
2.23.2.	Transformation von Hefezellen	59
2.23.2.1.	Herstellung kompetenter Hefezellen	59
2.23.2.2.	Hefe-Transformation im kleinen Maßstab	59
2.23.2.3.	Hefe-Transformation im großen Maßstab	60
2.23.3.	Plasmid-Präparation aus Hefe	62
2.24.	Pflanzentransformation	62
2.24.1.	Stabile Transformation von Arabidopsis mit Hilfe von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	62
2.24.1.1.	Transformation und Suche nach erfolgreich transformierten Samen	63
2.24.1.2.	Qualitative und quantitative GUS-Assays von Arabidopsis	64
2.24.2.	Transiente Transformation von <i>Craterostigma</i> -Blättern mittels Particle Gun Bombardment	66
2.25.	Subzelluläre Lokalisierung von GFP-Fusionsproteinen in <i>Craterostigma plantagineum</i>	68
3.	Ergebnisse	69
3.1.	Isolierung des C2-Gens aus einer genomischen Bibliothek von <i>Craterostigma plantagineum</i>	69
3.1.1.	Die Sequenz des C2-Leserasters dient als Sonde für das Screening der genomischen Bank	69

3.1.2.	Screening der genomischen Bank und Klonierung des C2-Promotors	69
3.1.3.	Der C2-Promotor enthält mehrere potentielle cis-regulatorische Elemente	73
3.1.4.	Der Promotor des homologen LEA-Gens aus Arabidopsis ist anders aufgebaut als der C2-Promotor	73
3.1.5.	Der C2-Promotor ist durch Trockenstress und ABA induzierbar	76
3.1.5.1.	Bombardment-Experimente mit Craterostigma-Blättern	76
3.1.5.2.	In transgenen Arabidopsis-Pflanzen wird der C2-Promotor nach Trockenstress und ABA-Behandlung induziert	77
3.2.	Ein 76 bp langes Fragment des C2-Promotors spielt eine Rolle bei der Trockenstress- und ABA-abhängigen Expression des C2-Gens	80
3.2.1.	Zur Identifizierung von Promotorelementen, die die Trockenstress- und ABA-abhängige Expression regulieren, wurden verschiedene C2-Promotorregionen mit dem Reporter gen β -Glucuronidase (GUS) fusioniert	80
3.2.2.	Bombardments von Craterostigma-Blättern zeigen, dass eine 76 bp lange Promotorregion mit zwei ABRE und einem HDZip-Bindemotiv essentiell ist für die Expression des C2-Gens bei Trockenstress und ABA-Induktion	85
3.2.2.1.	Bombardments mit Konstrukten der 5'-Deletionsreihe	85
3.2.2.2.	Bombardments mit Konstrukten aus isolierten C2-Promotorfragmenten	87
3.2.2.3.	Bombardments mit Konstrukten der Mutagenesereihe	87
3.2.2.4.	Co-Bombardments mit HDZip	89
3.2.3.	In transgenen Arabidopsis-Pflanzen wird der C2-Promotor nur dann exprimiert, wenn zwei ABRE und ein HDZip-Bindemotiv intakt vorliegen	89
3.2.3.1.	Herstellung transgener Arabidopsis-Linien	89

3.2.3.2.	X-Gluc-Färbungen zeigen die C2-Expression in transgenen Arabidopsis-Pflanzen	91
3.2.3.3.	Quantitative GUS-Expression	94
3.2.4.	DNA-Protein-Bindungsstudien untersuchen die Bedeutung einer 85 bp langen C2-Promotorregion mit zwei ABRE und einem HDZip-Bindemotiv	98
3.3.	Ein Hefe-One Hybrid-Screening führt zur Isolierung von zwei C2-Promotor Bindeproteinen aus einer cDNA-Bibliothek	101
3.3.1.	Für die Reporter-Hefe werden drei Kopien eines C2-Promotor-Fragments in den Vektor pSK 1 kloniert	102
3.3.2.	Für den One Hybrid-Versuch wird eine cDNA-Bibliothek aus getrockneten Craterostigma-Pflanzen hergestellt	104
3.3.3.	Austesten der optimalen Konzentration des kompetitiven Inhibitors 3-AT	104
3.3.4.	Das One Hybrid-Screening führt zur Isolierung von zehn unabhängigen positiven Klonen aus $1 \cdot 10^7$ transformierten Hefeklonen	105
3.3.4.1.	Acht der zehn Klone sind homolog zu Histon H3- Proteinen, die evolutionär stark konserviert sind	111
3.3.4.2.	Zwei der zehn Klone weisen Homologien zu bZip- Transkriptionsfaktoren der Gruppe S auf	111
3.4.	bZip- und Histon H3 sind Mitglieder von Genfamilien	115
3.5.	Untersuchungen zur Expression	116
3.5.1.	Northern-Analysen	116
3.5.2.	RT-PCR	119
3.6.	Histon H3 und bZip werden im Nukleus exprimiert	123
3.7.	Das bZip-Protein lässt sich in <i>E. coli</i> nicht exprimieren	128
3.8.	Bindungsstudien mit Proteinextrakten aus der Hefe	129
3.9.	Die Co-Transformation von Craterostigma-Blättern mit CaMV35S::bZip und C2-Promotor::GUS zeigt keinen Einfluss des bZip-Proteins auf die C2-Expression	132
4.	Diskussion	135
4.1.	Identifizierung regulatorischer Motive im C2-Promotor	135

4.1.1.	Vergleich der C2-Promotorsequenz mit bekannten regulatorischen Motiven	135
4.1.2.	Untersuchungen zur Expression: Identifizierung und mögliche Funktion regulatorischer Motive im C2-Promotor	137
4.1.2.1.	Transiente Transformation von <i>Craterostigma</i> -Blättern	138
4.1.2.2.	Stabile Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	141
4.1.2.3.	EMSA-Experimente: Bindung von HDZip-Fusionsprotein und Kernproteinen aus <i>Craterostigma</i> an die C2-Promotor-Region, in der zwei ABRE und ein HDZip-Bindemotiv enthalten sind	143
4.2.	Die Suche nach übergeordneten Regulationsmechanismen in Promotoren von <i>Craterostigma plantagineum</i>	144
4.3.	Isolierung von C2-Promotor-Bindeproteinen mit Hilfe eines Hefe-One Hybrid-Screens	148
4.4.	Charakterisierung der isolierten Proteine	149
4.4.1.	Die Charakterisierung der zwei bZip-Klone	149
4.4.1.1.	One Hybrid-Screen	149
4.4.1.2.	Genomische Organisation	150
4.4.1.3.	Expressionsanalysen	151
4.4.1.4.	Subzelluläre Lokalisationssignale bei bZip	153
4.4.2.	Die Charakterisierung der acht Histon H3-Klone	153
4.4.2.1.	One Hybrid-Screen und genomische Organisation ..	153
4.4.2.2.	Expressionsanalysen	154
4.4.2.3.	Subzelluläre Lokalisationssignale bei Histon H3	156
4.4.3.	Die Funktion von Histon H3 und bZip	157
4.4.3.1.	Histon H3- und bZip-Überexpression	158
4.4.3.2.	Bindungsstudien	159
4.4.3.3.	Co-Bombardments	160
4.5.	Ausblick	161
5.	Zusammenfassung	165

6.	Anhang	167
6.1.	Vektorkarten	167
6.1.1.	pUC	167
6.1.2.	pBluescript	167
6.1.3.	pBT10gus	168
6.1.4.	pK373	168
6.1.5.	pBIN 19: Vektor zur Agrobakterien-vermittelten Pflanzen- transformation	169
6.1.6.	pCK-GFP-S65C	169
6.1.7.	pPC 86: GAL4-Aktivierungsdomäne-Fusionsvektor	170
6.1.8.	pSK 1: Reporter-One Hybrid-Vektor	171
6.1.9.	pRT 105	172
6.1.10.	pGEX 5X-1	172
6.2.	Sequenzen	173
6.2.1.	Sequenz der cDNA-C2-Sonde, die zur Isolierung der genomischen C2-Sequenz benutzt wurde	173
6.3.	Accession-Nummern	173
6.3.1.	Accession-Nummern der Histon H3-homologen Proteine	173
6.3.2.	Accession-Nummern und Arabidopsis-Protein-Identifikations- nummern der bZip-homologen Proteine	174
7.	Literatur	175

Danksagung

Abkürzungen

% [v/v]	Volumenprozent
% [w/v]	Gewichtsprozent
A	Adenin
<i>A. th.</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ABA	Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
ABRE	ABA-responsives Element
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
3-AT	3-Amino-1,2,4-triazol
bp	Basenpaar
β-ME	β-Mercaptoethanol
Bq	Becquerel
BSA	Rinderserum Albumin
bZip	Basischer Leucin-Zipper
C	Cytosin
<i>C. pl.</i>	<i>Craterostigma plantagineum</i>
CaMV	Blumenkohl Mosaik Virus
cDNA	komplementäre DNA
CDPK	Calcium-abhängige Protein-Kinase (= <u>C</u> alcium- <u>D</u> ependent <u>P</u> rotein <u>K</u> inase) und Protein-Kinase mit Calmodulin-artiger Domäne (= <u>C</u> almodulin-like <u>D</u> omain <u>P</u> rotein <u>K</u> inase)
CTAB	Cethyltrimethylammoniumbromid
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
d	Tag
Da	Dalton
DAG	1,2-Diacylglycerol
dATP	Desoxy-Adenosin-Triphosphat (= Nukleotid mit der Base Adenin)

dCTP	Desoxy-Cytidin-Triphosphat (= Nukleotid mit der Base Cytosin)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGPP	Diacylglycerol-Pyrophosphat
dGTP	Desoxy-Guanosin-Triphosphat (= Nukleotid mit der Base Guanin)
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxy-Nukleotid-Triphosphat
DTT	1,4 Dithiothreitol
dTTP	Desoxy-Thymidin-Triphosphat (= Nukleotid mit der Base Thymin)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
EtOH	Ethanol
g	a) Gramm b) im Zusammenhang mit Zentrifugationen: Erdbeschleunigung ($9,81 \text{ m/s}^2$)
G	Guanin
GFP	Grün-Fluoreszierendes Protein
GST	Gluthathion-S-Transferase
GUS	β -Glucuronidase
h	Stunde
HDZip	Homeodomän-Leucin-Zipper
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside
Kan	Kanamycin
kb	Kilo-Basenpaare
λ	Wellenlänge
LEA	Late Embryogenesis Abundant
M	molar, Mol pro Liter
MAPK(KK)	Mitogen Activated Protein Kinase (Kinase Kinase)

MCS	Multiple Klonierungsstelle
min	Minute
Mops	3-(N-Morpholino) propansulfonsäure
mRNA	Messenger-RNA
MU	4-Methylumbelliferon
MUG	4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronsäure
NLS	Nukleus-Lokalisierungssignal
NPT	Neomycin-Phosphotransferase = Kanamycin-Kinase
OD	Optische Dichte
ORF	Open Reading Frame = offenes Leseraster
PA	Phosphatidsäure
PCI	Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PIP ₂	Phosphatidylinositol-Biphosphat
Pipes	Piperazin-N-N'-bis (2-ethansulfonsäure)
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Poly [dA-dT]•Poly [dA-dT]	Polydeoxyadenylic-Thymidylic Acid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
Rif	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Polymerase-Kettenreaktion mit vorheriger Reverser Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SPS	Saccharose-Phosphat-Synthase
SS	Saccharose-Synthase
SSC	Sodium Sodium Citrat
T	Thymin

T _a	Primer-Anlagerungstemperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
T _m	Primer-Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl) aminomethan
Triton X-100	Octylphenolpoly(ethylenglycolether) _n
U	Unit (Enzymeinheit)
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactopyranosid
X-Gluc	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-glucuronid
YNB	Yeast Nitrogen Base

Abbildungen und Tabellen

Abb. 1:	Prognostizierter Wassermangel im Jahr 2025	1
Abb. 2:	Mechanismus, wie Membranen während der Austrocknung geschädigt werden können	6
Abb. 3:	Strukturformel von (S)-cis-ABA	12
Abb. 4:	Schematische Übersicht über die Signaltransduktionswege bei Trockenstress	13
Abb. 5:	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der vorliegenden Arbeit	19
Abb. 6:	Kartierung der 36 C2-Promotor-Primer	24
Abb. 7:	Reaktionsmechanismen von GUS-Enzym-Assays	64
Abb. 8:	Prinzip der Gen-Kanone	66
Abb. 9:	Klonierung des C2-Promotors	70
Abb. 10:	Genomische C2-Sequenz im Vektor pC2X5	72
Abb. 11:	Genomische Sequenz des Le25-homologen LEA-Gens aus <i>Arabidopsis thaliana</i> und die daraus abgeleitete Proteinsequenz	75
Abb. 12:	Particle Gun Bombardment zum Nachweis der C2-Promotor- Aktivität bei Trockenstress- und ABA-Induktion	77
Abb. 13:	Aktivität des C2-Promotors in vier unabhängigen transgenen Arabidopsis-Linien (C2-Promotor::GUS aus pA17)	79
Abb. 14:	Übersicht über die C2-Promotor::GUS-Konstrukte in den Vektoren pBT10gus und pK373	84
Abb. 15:	Bombardments von Craterostigma-Blättern mit den C2-Promotor::GUS-Konstrukten der 5'-Deletionsreihe	86
Abb. 16:	Bombardments von Craterostigma-Blättern mit den C2-Promotor::GUS-Konstrukten der Mutagenesereihe	88
Abb. 17:	PCR-Schema zum Nachweis unterschiedlich langer C2- Promotor::GUS-Konstrukte in transgenen Arabidopsis-Pflanzen	90
Abb. 18:	GUS-Färbung transgener C2-Promotor::GUS Arabidopsis-Linien	92
Abb. 19:	Quantifizierung der GUS-Aktivität in <i>Arabidopsis thaliana</i>	96
Abb. 20:	Bindungsstudien mit den 86-1- und 86-4-C2-Promotorfragmenten und Kernproteinextrakten bzw. aufgereinigtem HDZip-Fusionsprotein	100

Abb. 21: Schema des Hefe-One Hybrid-Versuchs	102
Abb. 22: Konstruktion des One Hybrid-Vektors pSK 1-ABC	103
Abb. 23: Wachstum von vier verschiedenen positiven One Hybrid-Klonen auf selektivem SC-Medium	105
Abb. 24: Erfolgreiche Rücktransformation positiver One Hybrid-Klone	106
Abb. 25: Sequenzen der Histon H3 cDNA-Inserts und der daraus abgeleiteten Fusionsproteine	108
Abb. 26: Sequenz des cDNA-Inserts der Klone 11 und 33 und des daraus abgeleiteten Fusionsproteins	110
Abb. 27: Alignment der homologen Histon-Proteine	112
Abb. 28: Alignment der homologen bZip-Proteine	113
Abb. 29: 2-Dimensionale Darstellung der Leucin-Zipper-Region des Craterostigma-bZip-Proteins	114
Abb. 30: Autoradiogramm eines genomischen Southern-Blots	115
Abb. 31: Northernblots zur Charakterisierung der Expression von bZip und Histon H3	118
Abb. 32: Transkriptgrößen	118
Abb. 33: RT-PCR von bZip und Histon H3	121
Abb. 34: Klonierung des bZip- und des Histon H3-Leserasters in den pflanzlichen Expressionsvektor pCK-GFP-S65C	124
Abb. 35: Subzelluläre Lokalisation von bZip und Histon H3 im Nukleus	125
Abb. 36: IPTG-Induktion von <i>E. coli</i> BL-21 zur Überexpression von GST-bZip- und GST-Histon H3-Fusionsproteinen	129
Abb. 37: Autoradiographien von Bindungsstudien mit Gesamtproteinextrakten aus One Hybrid-Hefe-Klonen	131
Abb. 38: Konstruktion der Plasmide pA17-bZip, pD-bZip und pF-bZip	132
Abb. 39: Co-Bombardments von Craterostigma-Blättern mit C2-Promotor:: GUS-Konstrukten der Mutagenese-Reihe und CaMV 35S::bZip	134
Abb. 40: Vergleich von C2-ABRE mit einer G-ABRE-Consensus-Sequenz und zwei Consensus-Bindestellen von bZip-Transkriptionsfaktoren aus Löwenmäulchen (<i>Antirrhinum majus</i>)	137
Abb. 41: Schema zur Regulation des C2-Promotors	139
Abb. 42: Übersicht über den Aufbau des bZip-Transkripts aus <i>Craterostigma</i> <i>plantagineum</i> und Vergleich mit den Transkripten der homologen	

Gene bZIP910 und bZIP911 aus <i>Antirrhinum majus</i>	151
Abb. 43: Schema zur Regulation des C2-Gens im Zusammenhang mit der Antwort auf Trockenstress	164
Tab. 1: Untersuchte Gene von <i>Craterostigma plantagineum</i>	4
Tab. 2: Auffällige und potentiell regulatorisch wirksame Motive im C2-Promotor und Vergleich mit Promotor-Motiven des homologen Arabidopsis-Gens	74
Tab. 3: Konstruktionsbeschreibungen und Mutagenesen der C2-Promotor::GUS-Konstrukte	81
Tab. 4: Charakterisierung der isolierten One Hybrid-Klone	107
Tab. 5: Untersuchte Promotoren aus <i>Craterostigma plantagineum</i>	146
Tab. 6: Potentielle regulatorische Motive in Promotoren aus <i>Craterostigma plantagineum</i>	147
 Anhang	
pUC-Vektorkarte	167
pBluescript-Vektorkarte	167
pBT10gus-Vektorkarte	168
pK373-Vektorkarte	168
pBIN 19-Vektorkarte	169
pCK-GFP-S65C-Vektorkarte	169
pPC 86-Vektorkarte	170
pSK 1-Vektorkarte	171
pRT 105-Vektorkarte	172
pGEX-Vektorkarte	172
Sequenz der cDNA-C2-Sonde, die zur Isolierung der genomischen C2- Sequenz benutzt wurde	173

1. Einleitung

1.1. Wasser ist nicht unbegrenzt verfügbar

Biotische Umweltfaktoren wie Pflanzenkrankheiten, Insektenbefall oder Konkurrenz mit Unkräutern führen im Vergleich mit einem Rekordjahr zu durchschnittlich 5-20 % weniger Ernteertrag bei acht wichtigen Kulturpflanzen (Mais, Weizen, Sojabohne, Hirse, Hafer, Gerste, Kartoffel und Zuckerrübe). Dagegen verursachen abiotische Umweltfaktoren, wie Trockenperioden, Salinität, Überflutungen oder extreme Temperaturen, Ernteeinbußen von durchschnittlich 50-80 % (Buchanan et al., 2000). Einen wichtigen abiotischen Faktor stellt Wassermangel dar. Zwischen 1991 und 2000 gab es weltweit 253 Dürren mit deutlich zunehmender Tendenz (UNESCO, 2003). Die UNESCO (2003) schätzt, dass Mitte des 21. Jahrhunderts im günstigsten Fall 2 Milliarden Menschen in 48 Ländern von Wasserknappheit betroffen sein werden, im schlimmsten Fall sogar 7 Milliarden Menschen in 60 Ländern. Dies betrifft insbesondere bevölkerungsreiche Länder wie China und Indien, sowie Australien, den afrikanischen und fast den gesamten südamerikanischen Kontinent (Abb. 1).

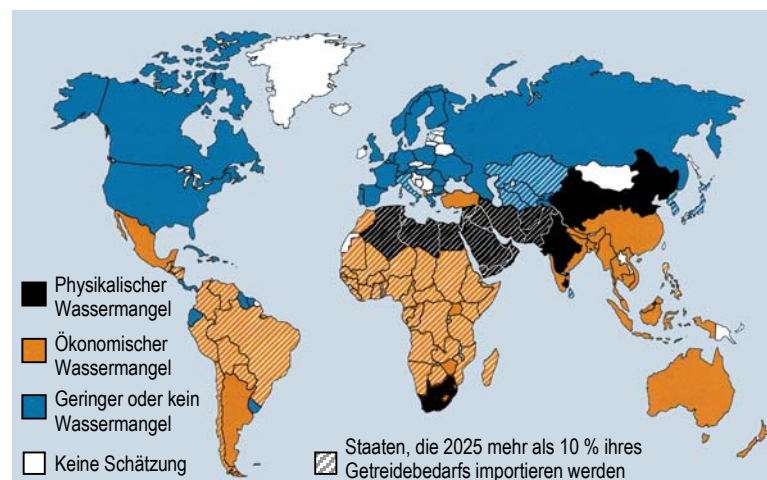


Abb. 1: Prognostizierter Wassermangel im Jahr 2025 (nach IWMI)

Laut einer Prognose des International Water Management Institute (IWMI) werden 2025 alle Staaten Afrikas mehr als 10 % ihres Getreidebedarfs aus Importen decken müssen, da sie selbst nicht genug produzieren können. Insgesamt muss bis 2025, so schätzt das IWMI, die Getreideproduktion weltweit um 38 % gesteigert werden, um den Bedarf der Menschheit zu decken. Dabei werden für die Erzeugung von 1 kg Getreide 1,5 m³ Wasser benötigt (UNESCO, 2003).

1.2. Pflanzen haben verschiedene Strategien entwickelt, um sich an trockene Umweltbedingungen anzupassen.

Eine Möglichkeit, um trockenheitsbedingte Ernteverluste zu vermeiden, besteht darin, Pflanzen zu verwenden, die besser mit extremen Wasserverhältnissen zurecht kommen. Im Verlauf der Evolution haben Pflanzen viele verschiedene Mechanismen entwickelt, um Dürreperioden zu überstehen.

Einige Pflanzen überdauern längere Trockenperioden im Samenstadium und vermeiden auf diese Weise Verluste (Leprince et al., 1993). Andere Pflanzenarten haben sich an widrige Standortbedingungen angepasst (Strasburger, 2002). Hirse zum Beispiel bildet extrem lange Wurzeln aus, um auch in sehr tiefen Bodenschichten an Wasser zu gelangen. Bei succulenten Pflanzenarten, wie zum Beispiel den lebenden Steinen oder den Kakteen, sind Wurzeln, Spross oder Blätter morphologisch zu Wasserspeichern umgebildet, auf die während längerer Trockenperioden zurückgegriffen werden kann. Eine weitere Möglichkeit der Anpassung besteht darin, die Verdunstung über die Blätter so gering wie möglich zu halten. Dies kann durch Verdickung der Cuticula und Verminderung der Anzahl der Spaltöffnungen pro Fläche geschehen. Olivenbäume beispielsweise besitzen solche xeromorphen Blätter. Bei einigen Pflanzen reflektieren Haare die Sonnenstrahlen und reduzieren auf diese Weise die Oberflächentemperatur. Andere Pflanzen werfen ihre Blätter in Trockenzeiten einfach ab. Bei Kakteen sind die Blätter zu Dornen umgebildet, und die Photosynthese findet vollständig im Spross statt.

Sogenannte CAM-Pflanzen (CAM = Crassulacean Acid Metabolism) betreiben den Crassulaceen-Säurestoffwechsel, eine physiologische Form der Anpassung. Dabei sind CO_2 -Fixierung und Kohlenhydratsynthese zeitlich voneinander getrennt, um die Verdunstung durch die Spaltöffnungen zu minimieren. Nur in der kühleren Nacht werden die Stomata zur Fixierung von CO_2 in Form von Malat geöffnet. Während des heißen Tages bleiben sie geschlossen, und das aus dem Malat freigesetzte Kohlendioxid wird in den Calvin-Zyklus eingespeist (Strasburger, 2002).

Eine gesteigerte Form der Anpassung an trockene Standorte stellen trockenolerante Pflanzen dar. Poikilohydre Pflanzen sind in der Lage, eine Reduktion ihres Wassergehalts durch Austrocknung um mehr als 90 % ohne Schaden in einem metabolischen Ruhezustand zu überdauern. Nach Wasseraufnahme können diese Pflanzen schnell wieder zu normaler Stoffwechselaktivität zurückkehren. Für eine

durchschnittliche mesophytische Pflanze ist dagegen schon ein Wasserverlust von mehr als 30 % tödlich (Schopfer und Brennicke, 1999).

Neben einigen trockenoleranten Pilzen (Mazur, 1968) treten diese sogenannten Wiederauferstehungspflanzen überall im Pflanzenreich auf (Proctor and Pence, 2002, Alpert and Oliver, 2002). Zu ihnen gehören einige Farnarten (Gaff, 1977), Cyanobakterien (Potts, 1999), Algen (Bertsch, 1970), Flechten (Kappen and Valladares, 1999) und Moose (Richardson, 1981), sowie eine kleine Gruppe von Angiospermen (Oliver and Bewley, 1997), Insgesamt wird geschätzt, dass es 275-325 trockenolerante Gefäßpflanzen-Arten gibt (Porembski and Barthlott, 2000), darunter *Craterostigma plantagineum* (Gaff, 1971), die im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht.

1.3. Die Wiederauferstehungspflanze *Craterostigma plantagineum*

Craterostigma plantagineum gehört zur Familie der Scrophulariaceae und stammt ursprünglich aus dem Süden Afrikas. In dieser Region der Erde, insbesondere in Südafrika und in den angrenzenden Staaten Namibia, Botswana und Zimbabwe gibt es Regionen, in denen immer wieder Dürren auftreten (The World Factbook 2002, Central Intelligence Agency, Washington, USA). Um in diesem ariden Lebensraum zu bestehen, hat *Craterostigma plantagineum* das Phänomen der Trockenoleranz entwickelt. In Dürreperioden sinkt der relative Wassergehalt auf bis zu 1 % ab (Bartels et al., 1990). Im ausgetrockneten Zustand kann die Pflanze solange überdauern, bis wieder Wasser zur Verfügung steht.

Craterostigma plantagineum eignet sich besonders gut als Modellorganismus zur Untersuchung der Trockenoleranz, weil von diesem Organismus zusätzlich zu den vegetativen Pflanzen auch sterile Kallus-Kulturen zur Verfügung stehen, die nach Behandlung mit dem Pflanzenhormon Abscisinsäure (ABA) ebenfalls trockenolerant werden (Chandler et al., 1997a).

Der Austrocknungsprozess von *Craterostigma* wird begleitet von der differentiellen Expression zahlreicher Gene. Ein Teil der bisher im Zusammenhang mit Trockenoleranz untersuchten *Craterostigma*-Gene und der abgeleiteten Produkte ist in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Untersuchte Gene von *Craterostigma plantagineum*

Gen	Genprodukte und Funktion	Induktion durch		Literatur	Access.-Nr.
		TS	ABA		
Komponenten der Signaltransduktion und Transkriptionskontrolle					
CpPLD-1 CpPLD-2	Phospholipasen D	nein ja	nein ja	Frank et al., 2000 Frank et al., 2000	AJ133001 AJ133000
Cppk1	Serin/Threonin-Protein-Kinase	nein ¹	nein/ja ⁸	Heino et al., 1998	AJ005373
CpHB-1 CpHB-2 CpHB-3 CpHB-4 CpHB-5 CpHB-6 CpHB-7	HDZip- Transkriptionsfaktoren	ja ja nein ¹ nein ¹ nein ¹ ja ja	nein ja nein ¹ nein nein ja ja	Frank et al., 1998 Frank et al., 1998 Deng et al., 2002 Deng et al., 2002 Deng et al., 2002 Deng et al., 2002 Deng et al., 2002	AJ005820 AJ005833 AF443619 AF443620 AF443621 AF443622 AF443623
CpR18	Transkriptionsfaktor	ja	ja	Hilbricht et al., 2002	AJ491254
CpVP1	Transkriptionsfaktor	ja ³	ja ²	Chandler & Bartels, 1997	AJ000552
Cpm-5 Cpm-7 Cpm-10	Myb- verwandte Transkriptionsfaktoren	k. A. ja ⁵ nein ⁸	k. A. k. A. ja ⁸	Iturriaga et al., 1996 Iturriaga et al., 1996 Iturriaga et al., 1996	U33916 U33917 U33915
CpMYB10	Myb-Transkriptionsf.	k. A.	k. A.	nicht publiziert	AF510112
CpCDT-1	Kurzes Peptid oder regulatorische RNA	ja	ja	Furini et al., 1997	-
Importierte Plastiden-Proteine					
CpPTP-1 CpPTP-2 CpPTP-3 CpPTP-4	Mutmaßliche Plastiden-Schutzproteine mit DNA-Bindereigenschaften	ja ja ja ja	ja ja ja ja	Phillips et al., 2002a Phillips et al., 2002a Phillips et al., 2002a Phillips et al., 2002a	AF356001 AY028426 AY028427 AY028428
pcC 37-31 pcC 13-62	dsp22, dsp34 Schutzproteine der Thylakoidmembran	ja ⁷ ja	ja ⁷ ja	Bartels et al., 1992 Piatkowski et al., 1990	X66598 M62991
CpALDH	Aldehyd-Dehydrogenase	ja	ja	Kirch et al., 2001	AJ306960

pcC 3-06	dsp21, im Stroma, Gruppe 3 LEA-Gen	ja	ja	Piatkowski et al., 1990	M62989
Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels					
CpTkt-3 CpTkt-7 CpTkt-10	Transketolasen	nein WB: ja WB: ja	nein k. A. k. A.	Bernacchia et al., 1995 Bernacchia et al., 1995 Bernacchia et al., 1995	Z46646 Z46648 Z46647
CpSS1 CpSS2	Saccharose- Synthasen	ja ja/nein ⁶	ja ⁶ nein ⁶	Kleines et al., 1999 Kleines et al., 1999	AJ131999 AJ132000
CpSPS1 CpSPS2	Saccharose-Phosphat- Synthasen	nein ja	nein ⁴	Ingram et al., 1997 Ingram et al., 1997	Y11821 Y11795
GapC-Crat	Cytosolische Glycerin- aldehyd-3-Phosphat- Dehydrogenase	ja	ja	Velasco et al., 1994	X78307
Weitere potentielle Schutzproteine					
CpPIPa2 CpPIPb CpPIPc	Potentielle Aquaporine in der Plasmamembran	ja nein ja ⁵	ja nein nein	Mariaux et al., 1998 Mariaux et al., 1998 Mariaux et al., 1998	AJ001292 AJ001293 AJ001294
pcC 11-24	dsp 68	ja	ja	Velasco et al., 1998	AJ002974
pcC 6-19 pcC 27-04 pcC AD28 pcC C2 pcC 27-45	dsp16, Dehydrin dsp14, Dehydrin Gruppe 3 LEA-Gen Gruppe 4 LEA-Gen dsp15, Gr. 5 LEA-Gen	ja ja ja ja ja	ja ja ja ja ja	Piatkowski et al., 1990 Piatkowski et al., 1990 Ditzer et al., 2001 Ditzer et al., 2001 Piatkowski et al., 1990	M62988 M62987 - - M62990
- -	Klasse I sHSP ⁴ Klasse II sHSP ⁴	ja ⁵ /nein ⁸ ja/nein ⁸	ja ⁸ ja ⁸	Alamillo et al., 1995 Alamillo et al., 1995	- -

Bisher wurden aus der Wiederauferstehungspflanze *Craterostigma plantagineum* zahlreiche Gene und Genfamilien isoliert, deren Expression zum Teil trockenstressabhängig ist. Eine Auswahl ist hier aufgelistet.

1 Repression

3 in getrockneten Samen

5 in Wurzeln

7 bei gleichzeitiger Lichteinwirkung

2 nur sehr schwach in Keimlingen nachweisbar

4 auf Proteinebene untersucht

6 in transgenen Tabak-Pflanzen untersucht

8 in Kallus

TS: Trockenstress; WB = Wiederbewässerung; k. A. = keine Angaben

1.4. Bei Trockenstress leiten Pflanzen vielfältige Überlebensmaßnahmen ein

1.4.1. Trockenstress-bedingte Gefahren für die Zellen

Ein große Herausforderung bei Trockenstress besteht darin, zelluläre Strukturen wie Membranen und Proteine wirksam zu schützen. Während der Austrocknung besteht die Gefahr, dass es zu einer lateralen Entmischung von Membrankomponenten kommt (Abb. 2).

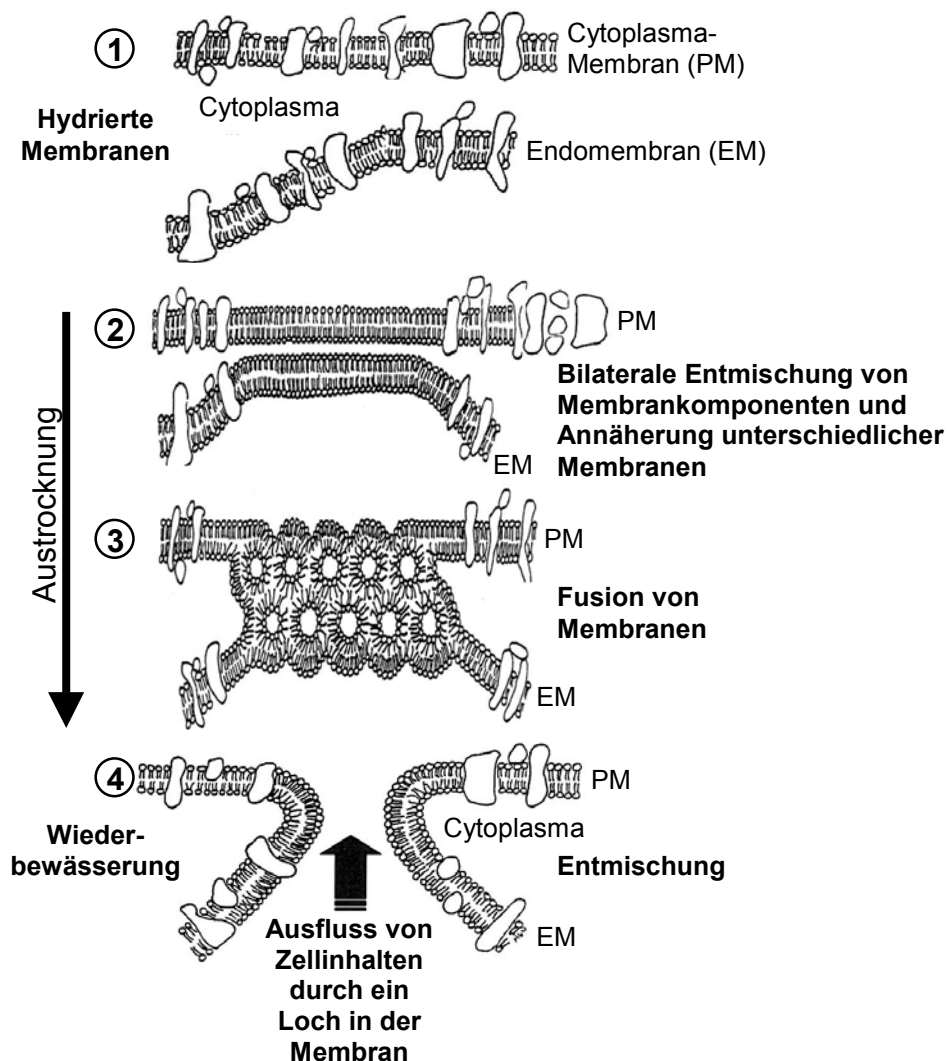


Abb. 2: Mechanismus, wie Membranen während der Austrocknung geschädigt werden können

Im Verlauf der Austrocknung kann es zu einer lateralen Entmischung von Membrankomponenten kommen, wodurch sich die Phospholipide aneinander annähern können (2). Dies kann zur Fusion unterschiedlicher Membranen führen (3), die nach der Wiederbewässerung nicht mehr korrekt aufgelöst werden kann (4), so dass Komponenten aus dem Zellinneren ausfließen.

(verändert nach Walters et al., 2002; im Original von Steponkus et al., 1993)

Als Folge davon können sich Membranen unterschiedlicher Zellkomponenten annähern und miteinander fusionieren. Bei der Wiederbewässerung ordnen sich die Phospholipide dann zwar wieder zu doppelschichtigen Membranen an. Aber diese Entmischung erfolgt willkürlich, so dass dabei vorher voneinander unabhängige Membranen miteinander verschmelzen können und die Zelle dadurch neu kompartimentiert oder sogar undicht wird.

Proteine können bei der Austrocknung durch den Verlust ihrer Hydrathülle eine irreversible Konformationsänderung erfahren und dadurch funktionsunfähig werden. Außerdem kommt es während der Austrocknung zur Anhäufung giftiger Stoffe, die wichtige Komponenten der Zelle schädigen können. Unabhängig davon, ob Pflanzen trocken tolerant sind oder nicht, reagieren fast alle Pflanzen ähnlich auf Wassermangel. Es findet eine Schutzreaktion statt, an der zahlreiche Gene beteiligt sind.

1.4.2. Primärstoffwechsel und Antioxidantien

Bei der Austrocknung treten Schäden an den Elektronentransportketten in den Mitochondrien und Chloroplasten auf. Als Folge davon werden vermehrt reaktive Sauerstoff-Radikale (ROS = reactive oxygen species) als Nebenprodukte gebildet, die ihrerseits die Zellen schädigen (Smirnov, 1993). Normalerweise werden diese cytotoxischen (O_2^-)-Moleküle durch Superoxid-Dismutase in Wasserstoffperoxid und Sauerstoff umgewandelt. Das H_2O_2 wird anschließend mit Hilfe von Katalasen, Peroxidasen, Gluthathion-Reduktasen und anderen entgiftenden Enzymen unschädlich gemacht. Bei Trockenstress reichen jedoch die normalen Reaktionen nicht aus. Um Schäden zu minimieren, reagieren die Pflanzen, indem sie einerseits Teile des Primärstoffwechsels reduzieren und andererseits verstärkt entgiftende Enzyme synthetisieren. In *Craterostigma plantagineum* lässt sich das Transkript der kleinen Rubisco-Untereinheit bei Trockenstress nicht mehr nachweisen (Bernacchia et al., 1996). Dies zeigt, dass der Photosyntheseapparat bei Wassermangel herunterreguliert wird. Parallel dazu werden verstärkt Enzyme zur Detoxifikation gebildet (Ingram and Bartels, 1996). Allein in den Chloroplasten von *Craterostigma plantagineum* lassen sich mehrere Trockenstress- und ABA-induzierbare Proteine mit vermuteter Schutzfunktion nachweisen (Tab. 1). Darunter befinden sich Proteine, die mit den Thylakoidmembranen assoziiert sind und deren Aufgabe es sein könnte, die Proteinkomplexe des Photosyntheseapparates zu stabilisieren (Bartels et al., 1992;

Piatkowski et al., 1990; Alamillo et al., 1994). Außerdem wurde eine Aldehyd-Dehydrogenase identifiziert, die ebenfalls zur Detoxifikation beitragen könnte (Kirch et al., 2002).

1.4.3. Zucker und kompatible Solute

Es gibt zahlreiche Veröffentlichungen darüber, dass im austrocknenden Gewebe Zucker und kompatible Solute, wie Prolin, Serin, Glutamat, Glycin-Betain, Carnitin, Mannitol, Sorbitol, Fructans, Polyole, Trehalose, Saccharose und Oligosaccharide, angereichert werden. Beispielsweise wird in *Arabidopsis thaliana* bei Trockenstress zusätzlich zur Aktivierung der Prolin-Biosynthese das ERD5-Transkript herunterreguliert, dessen Genprodukt am Abbau von Prolin beteiligt ist, so dass es zur Prolinanreicherung kommt (Kiyosue et al., 1996). Bei *Craterostigma plantagineum* beobachtet man während des Trocknungsprozesses eine reversible Umwandlung von 2-Octulose in Saccharose, die im getrockneten Blatt einen Anteil von bis zu 40 % der Trockenmasse erreichen kann (Bianchi et al., 1991). Die protektive Wirkung von Zuckern und kompatiblen Soluten ist ebenfalls in vielen Studien belegt worden. Zum Beispiel konnte bei der Phosphofruktokinase, einem sehr empfindlichen Enzym des Kohlenhydratstoffwechsels, gezeigt werden, dass Zucker, Saccharose, Maltose und Trehalose sehr effektiv stabilisierend wirksam sind, insbesondere bei der Anwesenheit von zweiwertigen Kationen (Carpenter et al., 1987a und 1987b). Bei transgenen menschlichen Fibroblasten-Zellen führt die Überexpression und Anreicherung von Trehalose dazu, dass diese Zellen fünf Tage lang völlig ausgetrocknet überleben können (Guo et al., 2000).

Golovina et al. (1998) haben gezeigt, dass sich während der Austrocknung trockentoleranter Zellen amphiphile Moleküle aus dem Cytoplasma in der Lipidphase von Membranen verteilen. Dieser Vorgang hat eine erhöhte Membran-Permeabilität zur Folge und kann bei der Wiederbewässerung, wenn sich die amphiphilen Substanzen zurück ins Plasma bewegen, sogar zu kurzzeitigen Löchern in der Membran führen. Dennoch scheint er für die Ausbildung von Trockentoleranz wichtig zu sein (Golovina et al., 1998).

1.4.4. Schutzproteine: LEA-Proteine und kleine Hitze-Schock-Proteine (sHSP)

LEA-Gene wurden zum ersten Mal im Zusammenhang mit der Reifung des Baumwollsamens beschrieben (Galau and Hughes, 1987). Daher stammt auch die

Namensgebung LEA (= Late Embryogenesis Abundant), denn sie werden während der späten Phase der Embryonalentwicklung verstärkt exprimiert. Die Expression von LEA-Genen in Trockenstress-Situationen ist bei Lebewesen weit verbreitet. Sogar im Tierreich wurde dieser Mechanismus bei dem Nematoden *Aphelenchus avenae* nachgewiesen (Browne et al., 2002). Allgemein werden die LEA-Proteine in fünf Gruppen eingeteilt, die sich ursprünglich von den zuerst charakterisierten LEA-Proteinen aus der Baumwolle ableiten lassen (Baker et al., 1988; Dure et al., 1989; Ingram and Bartels, 1996; Phillips et al., 2002b).

In der Gruppe 1 sind LEA-Proteine zusammengefasst, die ein konserviertes 20 AS-Motiv aufweisen. Dazu enthalten sie besonders viele geladene und ungeladene polare Reste. LEA-Proteine der Gruppe 2, die auch als Dehydrine bezeichnet werden, besitzen ein oder mehrere konservierte Lysin-reiche K-Segmente (EKKGIMDKIKEKLPG), von denen vermutet wird, dass sie sich zu α -Helices formen können. Außerdem treten Regionen mit mehreren aneinandergereihten Serin-Resten und weitere konservierte Motive mit der Konsensus-Sequenz DEYGNP auf (Close, 1997). Beim Mais-Dehydrin Rab17 wurde gezeigt, dass die Serin-Reste phosphoryliert werden können. Je nach Zellkompartiment liegt dieses Dehydrin in unterschiedlichen Phosphorylierungszuständen vor: weniger phosphoryliert im Cytoplasma, stärker phosphoryliert im Nukleus (Goday et al., 1994). Weiterhin wurde nachgewiesen, dass Rab17 NLS-Peptide (NLS = Kernlokalisierungssignal) binden kann. Daher wird vermutet, dass es als nukleäres Transportmolekül fungiert, das nukleäre Proteine an ihrer NLS erkennt, bindet und in den Zellkern transportiert. Die subzelluläre Lokalisation von Rab17 selber könnte über den Phosphorylierungszustand des Proteins reguliert werden (Goday et al., 1994).

LEA-Proteine der Gruppe 3 sind durch ein sich mehrfach wiederholendes 11 AS-Motiv charakterisiert, von dem man vermutet, dass es eine amphipathische α -Helix ausbildet (Dure et al., 1989). LEA-Proteine der Gruppe 4 besitzen einen konservierten N-Terminus, dem ebenfalls eine α -helikale Struktur vorhergesagt wird. Insgesamt zeichnen sich LEA-Proteine der ersten 4 Gruppen dadurch aus, dass sie sehr hydrophil und stabil sind. Es gelingt nicht, diese LEA-Proteine durch Kochen zu denaturieren. Gruppe 5-LEA-Proteine sind etwas hydrophober und weniger stabil als die der anderen LEA-Gruppen. Man nimmt an, dass sie eine globuläre Struktur einnehmen (Ramanjulu and Bartels, 2002; Cuming, 1999).

Bei *Craterostigma plantagineum* sind verschiedene LEA-Proteine untersucht worden (Tab. 1), die überwiegend im Cytoplasma lokalisiert sind. Aber es gibt auch Ausnahmen, wie zum Beispiel dsp21, das im Chloroplasten-Stroma gefunden wurde (Alamillo et al., 1994; Piatkowski et al., 1990). Dass LEA-Proteine eine Schutzfunktion ausüben, zeigt die Überexpression von HVA1, einem Gruppe 3-LEA-Protein aus Gerste, in Reis. Sie führte im transgenen Organismus zu erhöhter Wasser- und Salzstresstoleranz (Xu et al., 1996).

Neben den LEA-Proteinen haben auch kleine Hitze-Schock-Proteine (sHSP) sehr wahrscheinlich eine schützende Wirkung bei der Austrocknung. Bei Hefen wurde gezeigt, dass sie dazu beitragen, Membranen bei Trockenstress zu schützen (Sales, 2000). Bei Arabidopsis führt die Überexpression des kleinen Hitze-Schock-Proteins At-HSP17.6A zu erhöhter Toleranz bei osmotischem Stress (Sun et al., 2001). Im Kallusgewebe von *Craterostigma plantagineum*, das per se nicht trockentolerant ist, werden sHSPs nicht durch Trockenstress induziert. Aber im trockentoleranten Kallus, der mit ABA vorbehandelt wurde, lassen sie sich nachweisen (Alamillo et al., 1995).

1.4.5. Die „Water-Replacement“-Hypothese als Modell für die Wirkungsweise von Zuckern, kompatiblen Soluten und Schutzproteinen bei der Austrocknung

Wie austrocknende Zellen vor Schädigungen geschützt werden, wird mit der „Water-Replacement“-Hypothese erklärt. Man vermutet, dass die Hydroxylgruppen der Zucker sich an zelluläre Proteine und an die polaren Kopfgruppen der Membranlipide anlagern und Wasserstoffbrücken ausbilden. Auf diese Weise könnten die Wassermoleküle ersetzt und Konformationsänderungen und Kristallisation verhindert werden (Crowe et al., 1992). Ebenso könnten die Abstände zwischen Membranmolekülen erhalten bleiben. Die Eigenschaft, Wasser zu ersetzen, wird auch den kompatiblen Soluten und den LEA-Proteinen zugeschrieben, insbesondere denen der Gruppe 1. Gruppe 3-LEA-Proteine könnten wirken, indem sie Ionen abfangen und somit für einen Ausgleich der bei der Austrocknung ansteigenden Ionenkonzentration sorgen. Weiterhin wird vermutet, dass Zucker im Zusammenwirken mit anderen kompatiblen Soluten einen Glaszustand bilden (Crowe et al., 1992). Darunter versteht man einen metastabilen Zustand, der dem eines Feststoffes ähnelt, aber dennoch die physikalischen Eigenschaften einer Flüssigkeit besitzt (Buitink et al., 2002). Glaszustände verhindern Konformations-

änderungen von Makromolekülen und Proteinen, sowie die Fusion von Membranen (Prestreliki et al., 1993). Außerdem erhöhen sie die Stabilität von Enzymen (Chang et al., 1996). Die Ausbildung von Glaszuständen ist schon bei *Craterostigma plantagineum* nachgewiesen worden und ist ein typisches Merkmal aller trockentoleranter Gewebe (Buitink et al., 2002). Wolkers et al. (2000) haben festgestellt, dass Zucker alleine nicht ausreichen, um die Art von Glaszustand zu bilden, die in trockentoleranten Geweben gefunden worden ist. Aber Zucker in Kombination mit eingelagerten Proteinen, wie zum Beispiel LEA-Proteinen, könnte dies sehr wohl bewirken. Ebenso haben Wehmeyer and Vierling (2000) festgestellt, dass kleine Hitze-Schock-Proteine (sHSP) bei Trockenstress an der Ausbildung einer Glas-Formation beteiligt sein könnten.

Somit besteht die allgemeine Vorstellung, dass während der Austrocknung trockentoleranter Pflanzen die Hydrathülle von Zellstrukturen langsam durch Zucker und Proteine ersetzt wird. Dadurch entsteht eine Glas-Matrix, in die zelluläre Strukturen eingebettet und vor irreversiblen Schädigungen geschützt sind.

1.4.6. Schutz der DNA bei der Austrocknung

Bisher ist nicht viel über den Schutz des Chromatins bei der Austrocknung bekannt. Normalerweise liegt die DNA in voll hydrierten Zellen in der B-Konformation vor. Bei dem Sporen-bildenden Prokaryont *Bacillus subtilis* wurde gezeigt, dass sich die DNA während der Austrocknung von der B- in die A-Form umwandelt (Setlow, 1992a). Parallel dazu werden kleine säurelösliche Proteine (SASPs = Small Acid Soluble Proteins) synthetisiert, die an die A-Form-DNA binden und diese stabilisieren. In diesem Zustand ist die DNA sehr widerstandsfähig gegen extreme Temperaturen und chemischen Stress. Weiterhin konnte gezeigt werden (Setlow, 1992b), dass bei der Rehydrierung der Bakteriensporen die DNA durch die Wirkung einer SASP-spezifischen Protease aus der A- zurück in die B-Konformation gewandelt wird. Mit diesem Vorgang verlieren die Sporen ihre Trockentoleranz (Osborne et al., 2002).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen mit trockentolerantem Pflanzengewebe haben gezeigt, dass das Chromatin während der Austrocknung reversibel kondensiert wird, vermutlich mit Hilfe bisher unbekannter stabilisierender Substanzen. Bei Trockenstress-sensitivem Gewebe dagegen erfolgt die Kondensation des Chromatins ohne Schutzsubstanzen, was bei der Wiederbewässerung nicht mehr rückgängig gemacht werden kann (Leprince et al.,

1995; Buitink et al., 2002). In Plastiden von *Craterostigma* wurde eine kleine Trockenstress- und ABA-induzierbare Genfamilie charakterisiert (CpPTPs = *Craterostigma plantagineum* Plastid Targeted Proteins), deren Mitglieder bei Trockenstress an der Umstrukturierung der Plastiden-DNA beteiligt sein könnten (Phillips et al., 2002a).

1.5. Die koordinierte Expression von Zielgenen: Signaltransduktion

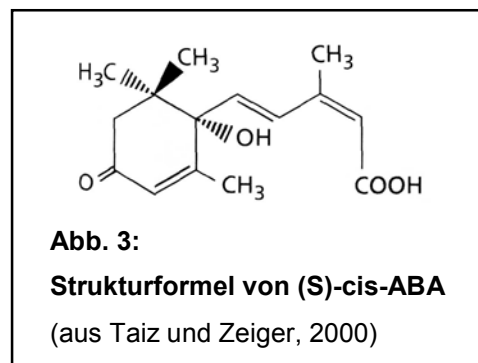
1.5.1. Die Regulationskaskade

Unter Signaltransduktion versteht man die gezielte Verarbeitung von Reizen durch Kooperation von Signalüberträgern. Dadurch kann die Zelle optimal auf aktuelle Situationen reagieren. Dies geschieht in den meisten Fällen durch die koordinierte Expression geeigneter Antwortgene. Insgesamt ist dieser Vorgang zwar zielgerichtet, aber keineswegs linear. Da ständig eine Flut voneinander unabhängiger Reize, wie zum Beispiel Wasserverfügbarkeit, Lichtverhältnisse, Temperatur, Schädlingsbefall usw., verarbeitet wird, besteht eine starke Quervernetzung zwischen verschiedenen Signalwegen.

In Abb. 4 ist dargestellt, wie man sich aus heutiger Sicht den Ablauf Trockenstress-induzierter Signaltransduktion vorstellt.

Als erstes muss die Zelle den Reiz „Wassermangel“ wahrnehmen. Anschließend wird die Bildung von Abscisinsäure (= ABA, Abb. 3) induziert, die danach vermutlich von bisher noch unbekanntem Rezeptormolekülen erkannt und gebunden wird. Zur Verstärkung des Signals werden in der Folge sekundäre Botenstoffe gebildet, die ihrerseits Verstärker-Moleküle wie die Phospholipasen C und D aktivieren. Parallel dazu findet aber auch eine ABA-unabhängige Signaltransduktion statt. Dafür spricht, dass die Expression einiger Gene, wie zum Beispiel RD19, RD21 und ERD1 aus *Arabidopsis*, zwar durch Trockenstress, nicht aber durch ABA induzierbar ist (Koizumi et al., 1993; Kiyosue et al., 1993; Kirch et al., 2002).

Die Phospholipase D (PLD) kann durch heterotrimere G-Proteine und Ca^{2+} aktiviert werden (Liscovitch et al., 2000; Frank et al., 2000). Sie spaltet Phospholipide, wobei der sekundäre Botenstoff Phosphatidsäure (PA) entsteht. Phospholipase C (PLC), die durch PA und heterotrimere G-Proteine aktiviert werden kann, spaltet den



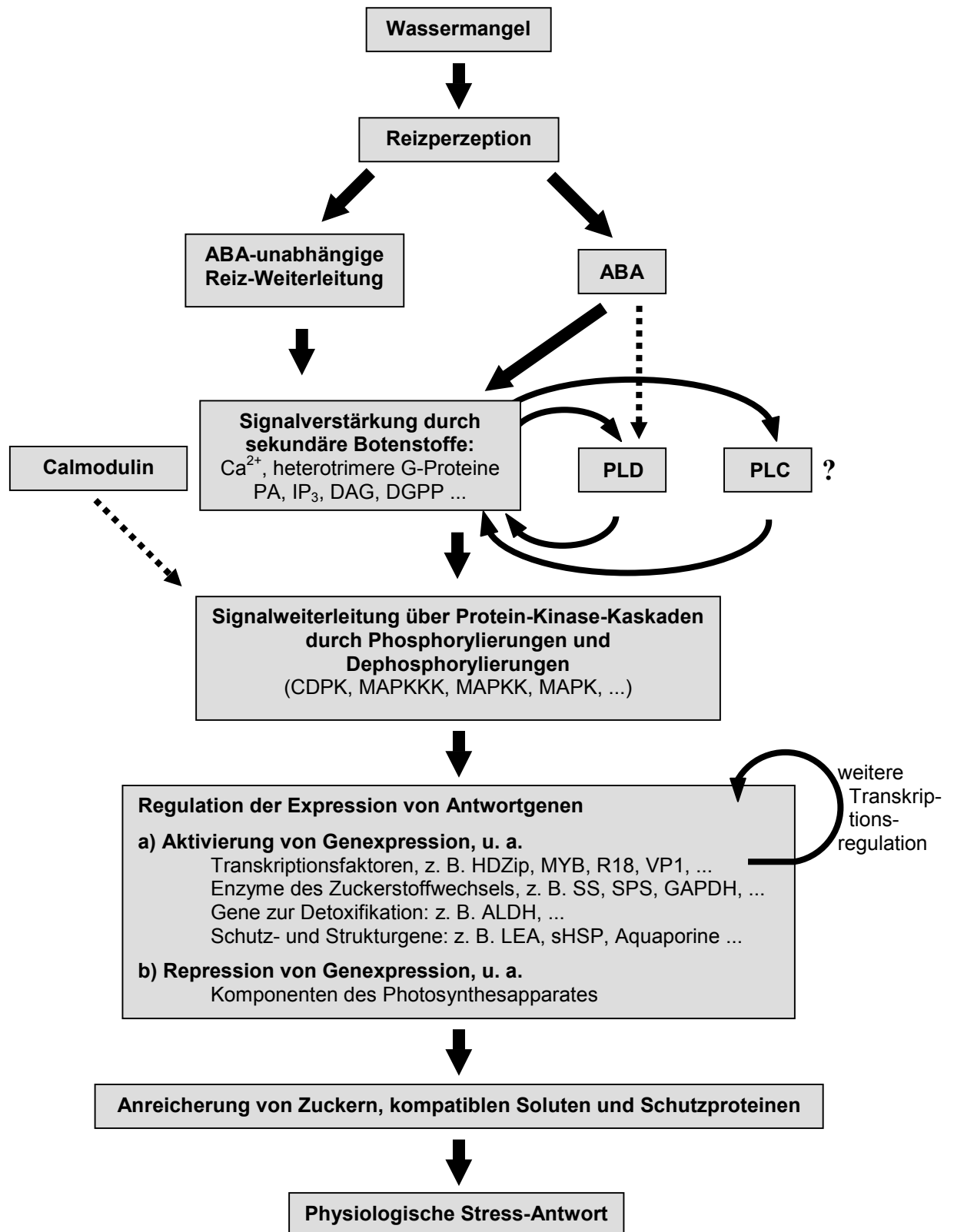


Abb. 4: Schematische Übersicht über die Signaltransduktionswege bei Trockenstress

Membran-Baustein Phosphatidylinositol-Bisphosphat (PIP₂) in Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) (Munnik et al., 1996; Taiz und Zeiger, 2000). IP₃ bewirkt die Freisetzung von Ca²⁺ aus dem Endoplasmatischen Reticulum und der Vakuole. Durch die cytosolische Erhöhung der Calcium-Konzentration werden Protein-Kinasen aktiviert, entweder durch freies Calcium selbst oder durch einen Komplex aus Calmodulin und daran gebundenes Calcium (Taiz und Zeiger, 2000; Hardie, 1999; Snedden and Fromm, 2001). DAG und PA können in Diacylglycerol-Pyrophosphat (DGPP), einen weiteren Botenstoff, umgewandelt werden und sind ebenfalls an der Aktivierung von nachgeordneten Signalüberträgern wie Protein-Kinasen beteiligt (Munnik et al., 1996 und 2000).

Protein-Kinasen haben die Fähigkeit, Proteine zu phosphorylieren. Als Zielprotein kommen entweder untergeordnete Protein-Kinasen in Frage, wie zum Beispiel bei der MAP-Kinase-Kaskade, oder andere Proteine wie Transkriptionsfaktoren (Hardie, 1999). Es wurde gezeigt, dass eine Protein-Kinase je nach Reiz mehrere Zielproteine haben kann, wodurch komplexe netzartige Verflechtungen verschiedener Signaltransduktionswege entstehen. In *Arabidopsis thaliana* wurden bisher 123 MAPK(KKK)-verwandte Gene und 24 MAP-Signalwege identifiziert (Jonak et al., 2002; Wrzaczek and Hirt, 2001). Am Ende dieser Phosphorylierungskaskade stehen häufig Transkriptionsfaktoren, die im Zellkern an die Promotoren ihrer Zielgene binden und somit deren Expression regulieren. Bei den Zielgenen handelt es sich entweder selber um Transkriptionsfaktoren oder um Gene, deren Produkte physiologisch die Trockenstressantwort einleiten, wie zum Beispiel Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels und LEA-Proteine.

1.5.2. Die Verpackung der DNA

Bei Eukaryonten liegt die DNA mit Proteinen assoziiert als Chromatin im Zellkern vor. Histone sind die wesentlichen Protein-Komponenten des Chromatins. Es gibt davon fünf verschiedene Klassen, nämlich Histon H1, H2A, H2B, H3 und H4. Je zwei Moleküle der vier letztgenannten Histon-Klassen bilden Histon-Octamere, um die sich der DNA-Doppelstrang zweimal windet. Diese Einheiten werden als Nucleosomen bezeichnet und sind durch 10-80 bp lange Linker-DNA-Abschnitte verbunden. Diese sogenannte 11 nm-Faser kann weiter zur 30 nm-Faser kondensiert werden, indem sich Histon H1-Moleküle an die Linker-DNAs anlagern und die Nucleosomen näher zusammenhalten. Noch stärkere DNA-Verpackung erfolgt durch

Schleifenbildungen und spiralförmiges Aufwickeln. Je nachdem in welcher Phase des Zellzyklus sich die Zelle gerade befindet, ist das Chromatin mehr oder weniger stark kondensiert. Ebenso ist aktives Chromatin, worunter man DNA-Abschnitte versteht, die gerade abgelesen werden, weniger stark konserviert als inaktives Chromatin.

Damit bei der Transkription die gewünschten Gene auch tatsächlich abgelesen werden können, muss die DNA für die RNA-Polymerase zugänglich gemacht werden. Prinzipiell gibt es drei Möglichkeiten, wie die Chromatinstruktur verändert werden kann (Felsenfeld and Groudine, 2003).

Die erste Möglichkeit besteht darin, dass Transkriptionsfaktoren spezifisch an Erkennungsstellen auf der DNA binden und mit Chromatin-Remodellierungskomplexen interagieren. Unter Verbrauch von ATP können diese Remodellierungskomplexe die Histon-Octamere auf der DNA um kurze Distanzen verschieben, so dass die abzulesenden Genabschnitte zugänglich werden.

Als zweite Möglichkeit gibt es die Histon-Code-Hypothese (Strahl and Allis, 2000), die besagt, dass Histone komplexere Aufgaben haben als nur reine Verpackungsproteine zu sein. Dafür spricht, dass alle Nucleosomen-Histone mehrere Aminosäuren besitzen, die kovalent modifiziert werden können. Allein bei Histon H3 sind 13 Aminosäuren bekannt, die posttranslational entweder acetyliert, methyliert oder phosphoryliert werden können (Felsenfeld and Groudine, 2003). Unter dem Histon-Code versteht man, dass über die verschiedenen Kombinationen, wie Histone modifiziert werden, Informationen an andere Proteine weitergeleitet werden, die daraufhin Transkription initiieren (Strahl and Allis, 2000).

Die dritte Möglichkeit, Chromatinstrukturen zu verändern, ist das Austauschen von Histonen gegen Histon-Varianten (Felsenfeld and Groudine, 2003). Bei der Tomate zum Beispiel haben Scippa et al. (2000) eine Variante des Histon H1 beschrieben, die bei Trockenstress exprimiert wird und sich dann im Chromatin anreichert. Bei *Drosophila* ist eine Variante von Histon H3, Histon H3.3, gefunden worden, die nur im aktiven Chromatin auftritt (Ahmad and Henikoff, 2002).

Insgesamt besteht die Vorstellung, dass sich die Struktur des Chromatins kontinuierlich im Fluss befindet, indem die mit dem Chromatin assoziierten Proteine ständig zwischen Chromatin-Assoziation und freier Diffusion im Nucleoplasma wechseln. Während jedoch Histon H1-Proteine zum Teil nur für einige Sekunden binden, ist die Bindung der anderen Histone stabiler. Die Histone H2A und H2B

bleiben für mehrere Minuten assoziiert und Histon H3 und H4 für mehrere Stunden (Felsenfeld and Groudine, 2003).

1.5.3. Transkriptionsfaktoren und Promotor-Bindestellen

Transkriptionsfaktoren sind weitere DNA-Bindeproteine. Sie stehen am Ende von Signaltransduktionsketten und haben die Funktion, die Expression von Zielgenen zu regulieren. Dies geschieht, indem sie spezifisch an Erkennungsstellen in den Promotoren der zu regulierenden Gene binden. Es sind bisher mehrere Typen von Transkriptionsfaktoren bekannt, die an der Trockenstress-Antwort beteiligt sind (Kirch et al., 2002; Ramanjulu and Bartels, 2002) und nachfolgend erläutert werden.

Proteine mit einer AP2/EREBP-Domäne binden an das DNA-Motiv TACCGACAT, das auch als C-Repeat oder DRE (Dehydration Responsive Element) bezeichnet wird. Beispiele sind DREB1A und DREB2A aus Arabidopsis, die an das DRE-Motiv im Promotor des rd29A-Gens binden und über unterschiedliche ABA-unabhängige Signaltransduktionswege reguliert werden. DREB1A wird durch Kältestress und DREB2A durch Salz- und Trockenstress induziert (Liu et al., 1998).

MYC-verwandte basische Helix-Loop-Helix-Proteine (bHLH) besitzen eine basische Domäne, mit der sie an die DNA binden und eine weitere Domäne zur Dimerisierung. Diese besteht aus zwei α -Helices, die über eine Schleife miteinander verbunden sind. Basische HLH-Proteine binden an DNA-Elemente mit der Kern-Sequenz CANNTG. In Arabidopsis ist der Promotor des durch Trockenstress und ABA induzierbaren rd22-Gens untersucht worden. Dabei wurde das MYC-Protein AtMYC2 (= rd22BP1) isoliert, das ebenfalls bei Trockenstress und nach ABA-Behandlung exprimiert wird. Dieses Protein bindet an die MYC-Bindestelle CACATG im rd22-Promotor und aktiviert die Trockenstress- und ABA-induzierbare Expression von rd22 (Abe et al., 1997 und 2003).

Die konservierte Domäne MYB-verwandter-Proteine besteht aus drei Wiederholungen einer Region aus 50 Aminosäuren, in der jeweils drei konservierte Tryptophan-Reste im Abstand von 18-19 Aminosäuren enthalten sind. Diese Wiederholungen formen ein Helix-Turn-Helix-ähnliches DNA-Bindemotiv. In Arabidopsis bindet das MYB-Protein AtMYB2 an die Erkennungssequenz TAACTG im rd22-Promotor und induziert dadurch die Trockenstress- und ABA-abhängige Expression des rd22-Gens (Abe et al., 1997 und 2003).

In basischen Leucin-Zipper-Proteinen (bZip) ist eine basische Domäne enthalten, mit der die bZip-Proteine an die DNA binden und die der basischen Domäne der bHLH-Proteine ähnelt. An die DNA-Bindedomäne schließt sich eine Leucin-Zipper-Domäne an, die vermutlich eine α -helikale Struktur einnimmt und für die Interaktion mit anderen Proteinen verantwortlich ist. In Verbindung mit der Trockenstress-Antwort sind in den Promotoren ABA-induzierbarer Gene aus verschiedenen Pflanzen, darunter Arabidopsis, Weizen, Gerste, Hafer und Löwenmäulchen, ABA-Antwort-Elemente (= ABA-responsive elements, ABRE) mit der Consensus-Sequenz TGACGTGGC beschrieben worden. An diese Elemente binden vorwiegend bZip-Proteine, wodurch die Expression der betroffenen Gene beeinflusst wird (Martinez-Garcia et al., 1998; Hobo et al., 1999; Uno et al., 2000). Bisher ist noch kein bZip-Protein aus *Craterostigma* charakterisiert worden.

Homeodomänen Leucin-Zipper-Proteine (HDZip) besitzen eine bZip-Protein-ähnliche Leucin-Zipper-Domäne, die zur Dimerisierung dient, und eine Homeodomäne, mit der die Proteine an die DNA binden. Bei *Craterostigma* sind bisher 7 HDZip-Proteine untersucht worden (Frank et al., 1998; Deng et al., 2002), die zum Teil Trockenstress- und ABA-induzierbar sind. Sie binden an die palindromische DNA-Erkennungssequenz CAATNATTG.

1.6. Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen eines Differential Display-RT-PCR-Screens, bei dem nach *Craterostigma*-Genen gesucht wurde, deren Produkte für die Trockenstress-Antwort unerlässlich sind (Kirch, unveröffentlicht), wurde die cDNA des C2-Gens isoliert. Spätere Untersuchungen haben ergeben, dass es sich bei C2 um ein LEA-Gen der Gruppe 4 handelt, das bei Trockenstress, Salzstress und nach ABA-Behandlung exprimiert wird (Ditzer et al., 1999 und 2001).

Das Ziel dieser Arbeit war, für die Trockenstress-Antwort wichtige regulatorische DNA-Motive in der Promotorregion des C2-Gens zu identifizieren und Bindeproteine zu isolieren, die als Transkriptionsfaktoren die C2-Expression beeinflussen. Wenn möglich sollten übergeordnete Regulationsmechanismen identifiziert werden, die auch die Expression anderer LEA-Gene regulieren.

Dafür wurde zuerst das vollständige C2-Gen aus einer genomischen Bank isoliert. Dann wurden verschiedene Versionen der Promotor-Region, d. h. der intakte vollständige Promotor, sowie mutagenisierte und 5'-deletierte Versionen, mit dem

GUS-Reportergen fusioniert. Mit diesen Konstrukten wurden die Expression des C2-Promotors bei Trockenstress und ABA-Behandlung charakterisiert, indem das homologe System *Craterostigma plantagineum* mittels Bombardments transient und das heterologe System *Arabidopsis thaliana* mit Hilfe von Agrobakterien stabil transformiert wurde. Parallel dazu fanden Bindungsstudien mit kurzen C2-Promotor-Fragmenten statt. Dies führte zur Identifizierung regulatorisch wichtiger Promotorelemente, die dann in einem Hefe-One Hybrid-Screen als Ziel-DNA für die Isolierung von C2-Promotor-Bindeproteinen eingesetzt wurden. Schließlich wurden positive One Hybrid-Klone hinsichtlich ihrer genomischen Organisation, ihres Expressionsmusters, ihrer subzellulären Lokalisation und ihrer Binde- und Transaktivierungseigenschaften charakterisiert. Eine Übersicht über den Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit gibt die Abb. 5.

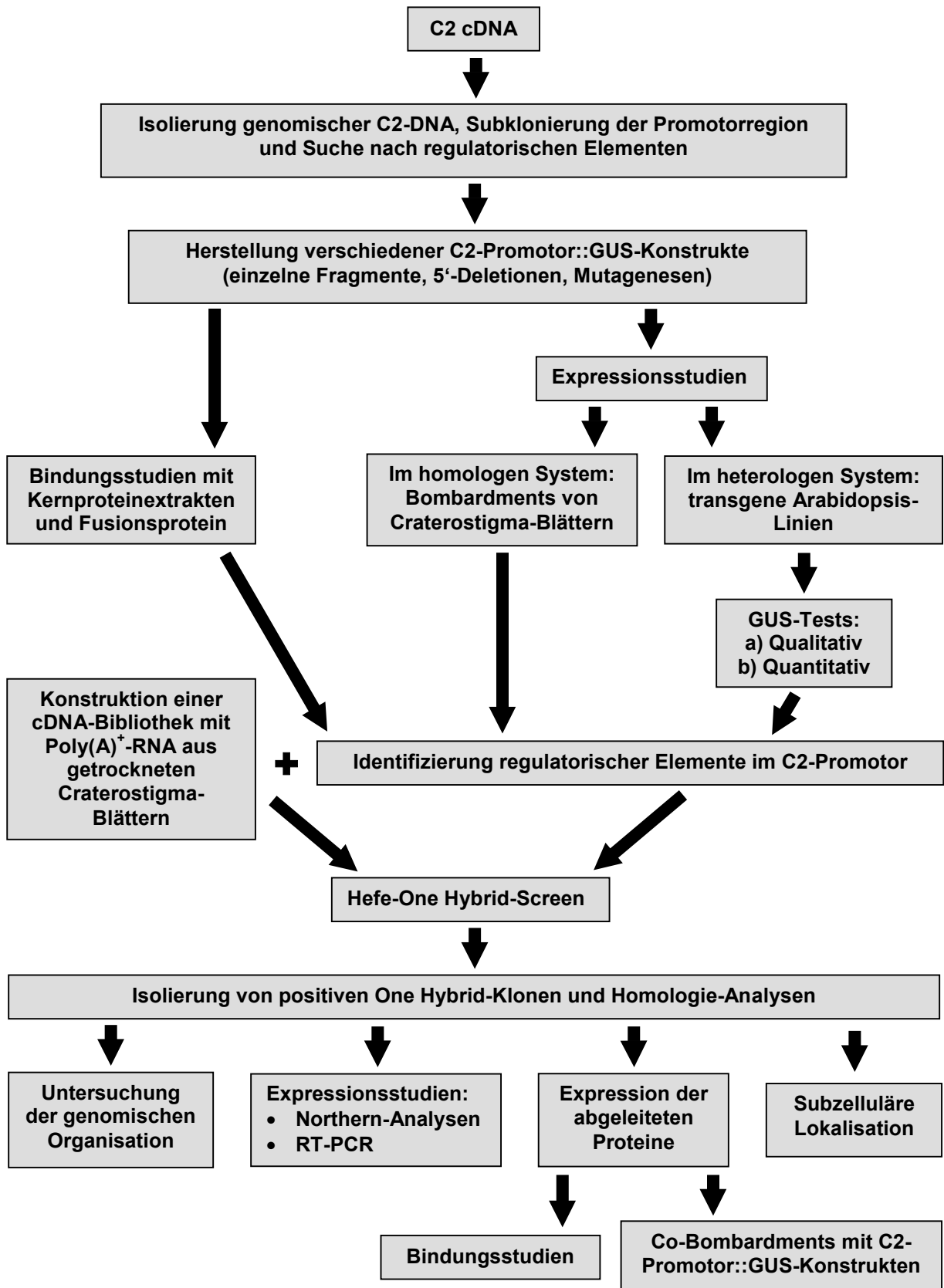


Abb. 5: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der vorliegenden Arbeit

2. Material und Methoden

2.1. Pflanzenmaterial

Craterostigma plantagineum

Die ursprünglich in Südafrika gesammelten Pflanzen wurden von Herrn Prof. Volk aus Würzburg zur Verfügung gestellt und anschließend im Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln und im Botanischen Institut der Universität Bonn weiter kultiviert.

***Arabidopsis thaliana* (Ökotyp Col 0)**

2.2. Bakterienstämme und Hefen

***E. coli* TG-2 (Gibson, 1984)**

Genotyp: EcoK⁻ Derivat von JM101, supE, hsd Δ 5, thi, Δ (lac, proAB), Δ (srlecA) 306::Tn10 (tet^r), F'(traD36 proAB⁺ lacI^qZ Δ M15)

***E. coli* DH10B (Lorrow and Jessee, 1990)**

Genotyp: F⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80d lacZ Δ M15 Δ lacX74 endA1 recA1 deoR Δ (ara, leu)7697 araD139 galU galK nupG rpsL λ ⁻

***E. coli* XL1-Blue (Stratagene, Amsterdam, NL)**

Genotyp: endA1 gyrA96 hsdR17 lac recA1 relA1 supE44 thi-1 [F' proAB lacI^qZ Δ M15 Tn10 (Tet^r)]

Diese drei *E. coli*-Stämme wurden bei Klonierungen eingesetzt. In *DH10B* wurde die cDNA-Bank erstellt. *XL1-Blue* war Bestandteil des Site-Directed Mutagenesis Kits von Stratagene.

***E. coli* K803 (Clontech, Heidelberg)**

Genotyp: galK2 galT22 hsdS3(r_k⁻ m_k⁻) lacY1 mcrA⁻ mcrB⁻ metB1 mrr⁺ supE44
Dieser *E. coli*-Stamm wurde als Wirtsstamm für die λ -Phagenbank verwendet.

***E. coli* BL-21 (Pharmacia, Freiburg)**

Genotyp: F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3)

Dieser *E. coli*-Stamm wurde zur Überexpression von GST-Fusionsproteinen benutzt.

***Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 (pAL 4404) (Ooms et al., 1982; Hoekema et al., 1983)**

Genotyp: Sm^r, (Rif^r) vir-region

Dieser Agrobakterien-Stamm diente zur stabilen Transformation von *A. th.*

***Saccharomyces cerevisiae* YM954 (Wilson et al., 1991)**

Genotyp: ura3-52 his3-200 ade2-101 lys2-801 leu2- trp1-901 canR gal4Δ512 gal80Δ338

Diese Hefe wurde zur Durchführung des Hefe-One Hybrid-Versuchs benutzt.

2.3. Phagen und Vektoren

- p6-19::GUS:** Pflanzlicher Expressionsvektor mit dem GUS-Reporter gen unter der Kontrolle des Trockenstress- und ABA-induzierten LEA-Gen-Promotors 6-19 (Michel et al., 1994)
- pcC C2:** C2 cDNA (Ditzer, 1999) im Vektor pAD Gal4 (Stratagene Amsterdam, NL)
- pCPHB-1:** Pflanzlicher Expressionsvektor mit dem Transkriptionsfaktor HDZip1 aus *Craterostigma plantagineum* unter der Kontrolle des konstitutiven CaMV 35S-Promotors (Frank et al., 1998)
- EMBL 4λ:** Phagen Replacement Vektor, in dem die genomische Bank von *Craterostigma plantagineum* erstellt wurde (Stratagene)
- pUC19:** Klonierungsvektor (New England Biolabs, Frankfurt/Main)
- pBT10gus:** Vektor mit GUS als Reporter gen, zur Untersuchung der Induzierbarkeit des C2-Promotors (Kleines, 1997)
- pBIN19:** Vektor für die durch Agrobakterien vermittelte Transformation von *Arabidopsis thaliana* (Bevan, 1984; Frisch et al., 1995)
- pRT105:** Pflanzlicher Expressionsvektor von bZip und Histon H3 (Töpfer et al., 1987)
- pBluescript:** Klonierungsvektor (Stratagene)
- pK373:** Vektor mit CaMV 35S-Minimal-Promotor::GUS-Reporter gen zur Untersuchung des Aktivierungspotentials einzelner Promotorfragmente (Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln)
- pPC 86:** One Hybrid-Vektor, in dem die cDNA-Bank konstruiert wurde (Chevray and Nathans, 1992)
- pSK 1:** One Hybrid-Vektor (Kim et al., 1997)

- pGEX 5X-1:** Vektor zur Expression von GST-Fusionsproteinen (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
- pCK-GFP-S65C:** pUC-Derivat mit CaMV 35S-Promotor, GFP-Leseraster und CaMV 35S-Poly(A)-Signal, in den über eine Nco I-Schnittstelle ein Leseraster hineinkloniert werden kann; zur subzellulären Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen (Reichel et al., 1996)

2.4. Primer (von 5' → 3')

Primer im C2-Promotor (zur Position der C2-Primer siehe Abb. 6):

<u>Nr.</u>	<u>Bezeichnung</u>	<u>Sequenz von 5' nach 3'</u>	<u>Schnittstellen</u>
1.	ABRE1for(strata)	CCC TTC TAT TCT TGC ATC CCT CGC GTC TCA ATA ATT GTA AAG AAA GC	keine
2.	ABRE1+HDZIP(strata)for	CTT GCA TCC CTC GCG TCT CGA TAT CTG TAA AGA AAG CAA ATG C	Eco RV
3.	ABRE1+HDZIP(strata)rev	GCA TTT GCT TTC TTT ACA GAT ATC GAG ACG CGA GGG ATG CAA G	Eco RV
4.	ABRE1rev(strata)	GCT TTC TTT ACA ATT ATT GAG ACG CGA GGG ATG CAA GAA TAG AAG GG	keine
5.	ABRE2for(strata)	CAC ATA AGA GGC CCG AGCTC TTC TCC TCC CTT CTT AAC CGC	Sac I
6.	ABRE2rev(strata)	GCG GTT AAG AAG GGA GGA GAA GAGCT CGG GCC TCT TAT GTG	Sac I
7.	C2-ACGT-Hind III	CAA TGC ATC TTAAGCTTTC AAC AC	Hind III
8.	C2-ACGT-Sph I	CCA TTG TTG ATA CGG CAT GCA A	Sph I
9.	C2-F2-SALinHIND	GAT GAT CAA GCTTCA TTG ATG G	Hind III
10.	C2-Fragment 1-Hind	CGA GAG CAA GCAAGCTTTA ATT G	Hind III
11.	C2-Fragment 2-Hind	GTA CAT AAAGCTTGC AGT TGC	Hind III
12.	C2-Fragment 2-Sal	CGT GTT GAT GGT CGA CAT GC	Sal I
13.	C2-Hybrid 1	TTC CCT TCT GAGCTC GCA TGC G	Sac I, Sph I
14.	C2-Hybrid 2	GTT AAG AAG GGTTCTA GAA GCC ACG	Xba I
15.	C2-Hybrid 3-nur Xba I	TTC CCT TCT AGA CTT GCA TGC G	Xba I
16.	C2-Hybrid 4	GTT AAG AAG GCA TGC GAA GCC AC	Sph I
17.	C2-Hybrid 6	GAA GGG AGG ATCCGC CAC GC	Bam HI
18.	C2 in pBIN	GCA ATT CGA TGG GCG TAA ATG GC	keine
19.	C2-loop-for	TTT ATT GTCGAC CAT ATC TAC AAT GG	Sal I
20.	C2-loop-rev	GAT ACG GTCGAC ATT GAA ATA CGT G	Sal I

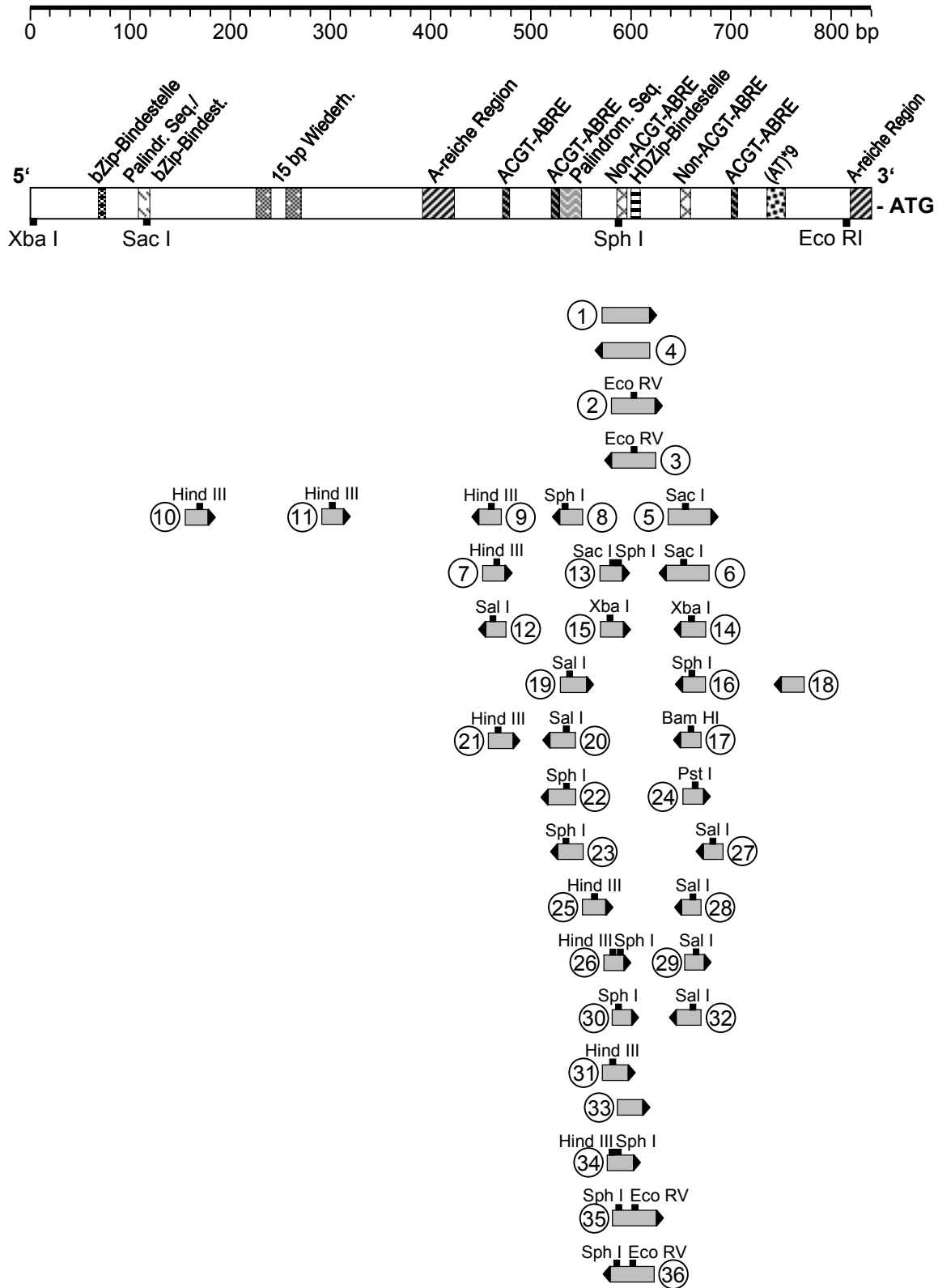


Abb. 6: Kartierung der 36 C2-Promotor-Primer

Die Zahlen entsprechen den Primer-Nummerierungen im Text, und die Pfeilspitzen geben die Orientierung der Primer an. Kleine schwarze Kästchen markieren die Position der Restriktionsschnittstellen.

21. C2-Muta-ACGT-Hind	CAT CTT AAG CTT CAA CAT AGA TGC	Hind III
22. C2-Muta1-ACGT-Sph	GAT ACG GCA TGC AAT AAA AT CTAT GAC	Sph I
23. C2-Muta2-ACGT-Sph	CCA TTG TTG ATA CGG CAT GCA ATA A	Sph I
24. C2-prom150	GCG TGG CTT CTG CAG CCT TC	Pst I
25. C2-prom-Hind III	GGT AAA GAA AAG CTT TTT TTC CC	Hind III
26. C2-prom-Hind-Help	CCC TTC TAA GCT TGC ATG CG	Hind III, Sph I
27. C2-prom-Sal I	CTG GTT CGT CGA CGC GGT T	Sal I
28. C2-prom-Sal-Help	GAA GGG TCG ACA AGC CAC G	Sal I
29. C2-SALhelp-andersrum	CGT GGC TT GTCGACC CTT C	Sal I
30. C2X5-prom	CTT GCA TGC GTG GCG TCT C	Sph I
31. C2-ZIP-ABRE-Hind	CCC TTC TAA GCT TGC AT A CAT TGC G	Hind III
32. C2-ZIP-ABRE-Sal	GAA GGG TCG ACA AGC AAT GTG GGC	Sal I
33. C2-ZIP-Muta1	GCG TGG CGT CTC AAT CAT GAT AAA G	keine
34. C2-ZIP-Muta2-Hind	CTA AGC TTG CAT GCG TGG CGT CTC AA	Hind III, Sph I
35. HDZIPfor(strata)	CTT GCA TGC GTG GCG TCT CGA TATCTG TAA AGA AAG CAA ATG C	Sph I, Eco RV
36. HDZIPPrev(strata)	GCA TTT GCT TTC TTT ACA GAT ATC Eco RV, Sph I GAG ACG CCA CGC ATG CAA G	

Sonstige Primer:

37. ALDH-for	CCA TGA TCG GAG CCA TAG C	keine
38. ALDH-rev	AAG TGT AGG GCA ATG TCG	keine
39. A.th. bZIP-for	GGG GTC GTT GCA AAT GCA AAC	keine
40. A.th. bZIP-rev	GCA GAA GCT CTG ATT GGT TGC	keine
41. bZIP-GFP-for	ATC CGT CCCATG GCT ACA AAT C	Nco I
42. bZIP-GFP-rev	CAA TAC TGA ACCATG GCA GCA G	Nco I
43. C2-Extension	CTT CTG ATG TCC TCG CAT CG	keine
44. C2-for	GAC GGC GAA GCA GAA AGT GAG	keine
45. C2-rev	CAC ATC ACA TGA CTC CCA GCA C	keine
46. GST-bZIP (#11)-for	CAA AGC CCC A GAAT TCC GTC C	Eco RI
47. GST-bZIP (#11)-rev	CCA TGA AAA CTCGAG CAA ACA C	Xho I
48. GST-Histon H3 (#1)-for	GAA GAC TCA G CAAT TCA CTT CTA	Eco RI
49. GST-Histon H3 (#1)-rev	CTA AAC CTCGAG AGT GAC GGA G	Xho I
50. GUS-rev	GAT AGT CTG CCA GTT CAG TTC G	keine
51. GUS-sense	CGT CCT GTA GAA ACC CCA ACC	keine

52. GUS-Start	GGT TGG GGT TTC TAC AGG ACG	keine
53. Histon-GFP-for	CTA ATA AGA <u>CCA</u> TGG CTC GTA CG	Nco I
54. Histon-GFP-rev	CAA GCA CGT <u>TCC ATG G</u> GA ATA CG	Nco I
55. Not I-Adapter	GAC TAG TTC TAG ATC GCG <u>AGC</u> <u>GGC CGC</u> CC (T) ₁₅	Not I
56. NptII-sense	CCG CTT GGG TGG AGA GGC TAT T	keine
57. NptII-antisense	ATG TCC TGA TAG CGG TCC GCC A	keine
58. OH 9-for	GTC GCT ATC AGA AGT CGA CC	keine
59. OH 9-rev	GAG AGG CAG GTG ACT GGC C	keine
60. OH 11-for	CCG TCC TAT GGC TAC AAA TCC	keine
61. OH 11-rev	CTC CGA CTC TTT TCA ATA CTG	keine
62. OH 1-for	GAA GAC TCA GCA ATT TCA CTT C	keine
63. OH 1-rev	CTT CGA AAG TGA CGG AGA AAT C	keine
64. Orient-166C2-Hind	CCA TCA ATG <u>AAG CTT</u> GCA TGC	Hind III
65. pBIN Richtung Hind	AGC TAT GAC CAT GAT TAC GCC AAG	keine
66. pPC86-16bp	GGA TGT TTA ATA CCA C	keine
67. pPC86-18bp	TTG ATT GGA GAC TTG ACC	keine
68. pUC Forward	CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CG	keine
69. pUC Reverse	AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG	keine
70. pUC-rev-Hind	GCT TGC <u>AAG CTT</u> GCA <u>GGA</u> CGA C	Hind III
71. Sal I-Adapter	<u>TCG ACC</u> CAC GCG TCC G	Sal I (aufgeschnitten)
72. SP6	CAT ACG ATT TAG GTG ACA CTA TAG	keine
73. Tkt 3-for	GCA GAA CCT TAA GAG GCC ATC	keine
74. Tkt 3-rev	GGC ACT CTC ACC ACC AAG AAC	keine

Eingeführte Mutagenesen sind invers dargestellt. Vorhandene Restriktionschnittstellen sind unterstrichen. Primer wurden bei MWG Biotech und bei SigmaARK (München) bestellt.

2.5. Chemikalien, Radioisotope und Hilfsmittel

Verwendete Chemikalien wurden von Biomol (Hamburg), Difco (Heidelberg), Merck VWR International (Darmstadt), PEQLAB (Erlangen), Perbio Science (Bonn), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma/Fluka/Riedel de Haën (München) bezogen, nach Möglichkeit mit dem Reinheitsgrad zur Analyse. Radioaktiv markiertes

[$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP wurde mit einer Anfangsaktivität von 370 MBq/ml von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) angeliefert. Weitere Hilfsmittel, wie zum Beispiel Röntgenfilm-Entwicklerlösungen, Elektroporationsküvetten oder Filterpapier, stammten von Allmedt (Essen), Bio-Rad (München) und Schleicher & Schüll (Dassel). Das Zubehör für die Bombardment-Experimente kam von Bio-Rad.

2.6. Enzyme und Marker

Enzyme und zugehörige Puffer wurden von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) Bioscience (Freiburg), Roche/Boehringer (Mannheim), Sigma (München) und Invitrogen/GibcoBRL (Karlsruhe) bezogen. Für die PCR wurde selbst isolierte Taq-Polymerase (Pluthero, 1993) von Birgit Walldorf zur Verfügung gestellt. Als DNA-Marker wurde die 1 kb-Leiter von Invitrogen/GibcoBRL verwendet. Protein-Größenstandards stammten von Sigma.

2.7. Membranen und Filme

Für RNA-Transfer wurde Hybond-N von Amersham und zum Transfer von DNA wurde Protran BA 85 (0,45 μm) von Schleicher & Schüll eingesetzt. Die erhaltenen Signale wurden auf X-OMAT-Röntgenfilm von Kodak (Rochester, USA) dokumentiert.

2.8. Kits

Nukleinsäuren wurden mit Qiaex II Gel Extraction Kit, Midi- und Maxi-Plasmid Purification Kit, Nucleotide Removal Kit und Lambda-DNA-Kit von Qiagen (Hilden) aufgereinigt. Mutagenesen im 840 bp langen C2-Promotor wurden mit Hilfe des QuikChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene Europe (Amsterdam, NL) eingeführt. Zur Herstellung der cDNA-Bank und bei der Durchführung der Reversen Transkription für die RT-PCR wurde „SuperscriptTM Plasmid Systems with GatewayTM Technology for cDNA Synthesis and Cloning“ von GibcoBRL/Invitrogen verwendet. Für die Herstellung ^{32}P -markierter Sonden wurde das HexaLabelTM DNA Labeling Kit der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) benutzt.

2.9. Geräte

Elektroporationsgerät:	Gene Pulser II mit Pulse Controller II und Capacitance Extender II von Bio-Rad (Hercules, USA)
Konfokal-Mikroskop:	TCS 4D von Leica Microsystems (Wetzlar)
Particle Gun:	PDS 1000/He System von Bio-Rad
PCR-Maschine:	Trio-Thermoblock™ 48 mit Heizdeckeln von Biometra (Göttingen)
Photometer:	Ultrospec 2000 von Amersham Pharmacia Biotech
Szintillationszähler:	Tri Carb® 1600 CA Liquid Scintillation Analyser von Packard (Canberra, Australien)

2.10. Datenbanken und Software

Für Sequenzvergleiche und Translationen wurde das Programm Vektor NTI™ Suite 5.5 herangezogen. Homologie-Analysen auf Nukleinsäure- und Protein-Ebene wurden im Internet durch Vergleiche mit Datenbanken ausgeführt, auf die über die Adresse des National Center for Biotechnological Information (www.ncbi.nlm.nih.gov/) zugegriffen wurde. Homologe Arabidopsis-Sequenzen wurden mit Hilfe der TAIR-Datenbank (The Arabidopsis Information Resource, www.arabidopsis.org/) und der TIGR-Datenbank (ftp://ftp.tigr/pub/data/a_thaliana/ath1/SEQUENCES/) ermittelt. Die Auswertung der GFP-Fluoreszenz-Bilder erfolgte mit Hilfe von Adobe Photoshop 5.0. Für die Auswertung der RT-PCR-Gele wurde das Programm ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) verwendet.

2.11. Medien

Kallus-Medium:	wie MS-H, aber mit zusätzlich 0,2 ml/l 2,4-D-Stocklösung (1 mg/ml in 100 % Ethanol)
LB-Medium:	10 g/l Bakto-Pepton, 10 g/l NaCl, 5 g/l Bakto-Hefe-Extrakt, pH 7,5, 15 g/l Selekt-Agar für Platten
MS-H (ohne Hormone):	4,6 g/l MS-Salze, 20 g/l Glukose, 1 ml/l Vitamin-Stock, pH 5,8, 8 g/l Selekt-Agar für Platten (Murashige and Skoog, 1962)

NZCYM:	10 g/l Bakto-Pepton, 5 g/l NaCl, 5 g/l Bakto-Hefe-Extrakt, 2 g/l MgSO ₄ * 7 H ₂ O, pH 7,5, 15 g/l Selekt-Agar für Platten
Top-Agar:	siehe NZCYM-Medium, jedoch an Stelle des Agars 7 g/l Agarose und zusätzlich 2,03 g/l MgCl ₂
YEB:	5 g/l Saccharose, 5 g/l Bakto-Pepton, 5 g/l Fleischextrakt, 1 g/l Bakto-Hefe-Extrakt, 2 mM MgSO ₄ , pH 7,0, 15 g/l Selekt-Agar für Platten

2.12. Zusätze für Medien

Ampicillin:	Stocklösung: 100 mg/ml in Aqua dest., Verdünnung 1:1000
2,4-D:	Stocklösung: 1 mg/ml in 100 % Ethanol, Verdünnung 1:5000
IPTG:	Stocklösung: 24 mg/ml in Aqua dest. (= 100 mM)
Kanamycin:	Stocklösung: 50 mg/l in Aqua dest., Verdünnung 1:1000
Rifampicin:	Stocklösung: 50 mg/ml in DMSO, Verdünnung 1:500
Vitamin-Stock:	Stocklösung: 2 mg/l Glycin, 0,5 mg/l Nicotinsäure (Niacin), 0,5 mg/l Pyridoxin-HCl, 0,1 mg/l Thiamin-HCl in Aqua dest., Verdünnung 1:1000
X-Gal:	Stocklösung: 20 mg/ml in DMF

Alle diese Zusätze wurden sterilfiltriert und dem abgekühlten Medium nach dem Autoklavieren zugegeben.

2.13. Puffer und Lösungen

Denaturierungslösung:	1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH
10 x Gelladepuffer:	25 mg Bromphenolblau, 25 mg Xylencyanol, 1 ml 10 x TAE, 3 ml Glycerin, 6 ml Aqua dest.
Neutralisationslösung:	1 M Tris, 1,5 M NaCl, pH 8,0
RNase A+T ₁ :	1 mg/ml RNase A (Sigma), 10.000 U/ml RNase T1 (Sigma), 10 min kochen, dann bei RT abkühlen lassen

20 x SSC:	3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat
50 x TAE-Puffer:	2 M Tris, 50 mM EDTA, pH 8,0 (mit Essigsäure einstellen)
1 x TE-Puffer:	10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0
X-Gluc-Färbelösung:	3 mM X-Gluc, 0,1 % [v/v] Triton X-100, 50 mM NaH ₂ PO ₄ , 8 mM β-ME

2.14. Anzuchtbedingungen

2.14.1. Anzucht von *Craterostigma plantagineum*

Sterile *Craterostigma*-Pflanzen wurden unter Langtag-Bedingungen (16 h Licht, ca. 7500 lux und 8 h Dunkelheit) bei 22 °C auf MS-H-Medium kultiviert. Alle 6-8 Wochen wurden sie in frisches Medium umgesetzt.

Nicht sterile Pflanzen wuchsen auf Erde (Floradur Gärtnererde von Floragard) zum Teil bei Tageslicht und Raumtemperatur und zum Teil unter standardisierten Bedingungen von 13 h Licht bei 22 °C und 11 h Dunkelheit bei 18 °C.

2.14.2. Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

Zur Identifizierung transgener *Arabidopsis*-Pflanzen wurden die Samen steril auf MS-H_{Kan}-Medium (siehe 2.11. und 2.12.) ausplattiert. Unsterile Pflanzen wurden auf 2 Teilen feuchter Einheitserde und 1 Teil Vermikulit ausgesät und nach 3 Tagen Vernalisation unter Langtag-Bedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkelheit) bei 22 °C angezogen.

2.14.3. Anzucht von Bakterien

E. coli-Bakterien wurden bei 37 °C entweder als LB-Flüssigkultur im Schüttler bei 300 rpm oder auf Agarplatten im Brutschrank kultiviert. Agrobakterien wurden mit YEB-Medium bei 28 °C vermehrt. Um Plasmid-Verlust und Kontamination mit Luftkeimen zu vermeiden, wurden alle Bakterien, soweit es möglich war, unter selektiven Bedingungen, d. h. mit Antibiotikum im Medium, angezogen.

2.14.4. Anzucht von Hefen

Saccharomyces cerevisiae wurde mit SC-Medium bei 30 °C angezogen. Zur Vermeidung von bakterieller Kontamination wurde dem Medium von Zeit zu Zeit Ampicillin (100 mg/ml in Aqua dest., Verdünnung 1:1000) zugesetzt.

2.15. Isolierungsmethoden

2.15.1. Isolierung von Gesamt-RNA aus *Craterostigma* und *Arabidopsis*

Etwa 250 mg Pflanzenmaterial wurden im Mörser unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff aufgeschlossen. Das gefrorene Pulver wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt, mit 500 µl 80 °C warmem RNA-Extraktionspuffer versetzt und für 30 sec gevortext. Nach Hinzufügen von 250 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) und erneutem Vortexen (30 sec) wurde die Mischung bei 13.000 rpm und RT für 5 min zentrifugiert. Danach wurde die obere wässrige Phase vorsichtig abgenommen und mit 1 Volumen 4 M LiCl versetzt. Nach anschließendem Vortexen (30 sec) wurde die RNA über Nacht auf Eis im Kühlraum gefällt. Am nächsten Tag wurde die RNA abzentrifugiert (13.000 rpm, 4 °C, 20 min) und das Pellet in 250 µl Aqua dest. resuspendiert. Nach Zugabe von 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5,2 und 2 Volumen 100 % Ethanol wurde die RNA erneut für 2 h bei -70 °C gefällt. Anschließend wurde die Probe für 10 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde nacheinander mit 70 %igem und 100 %igem Ethanol gewaschen und bei RT getrocknet. Zuletzt wurde es in 25 µl Aqua dest. aufgenommen und für 2 min gevortext. Die Qualität der isolierten RNA wurde durch Auftragen von 1 µl auf ein 1,2 %iges Agarose-Gel beurteilt. Die RNA-Konzentration der Probe wurde photometrisch bestimmt. RNA-Lagerung erfolgte bei -70 °C.

RNA-Extraktionspuffer: 100 mM LiCl, 100 mM Tris, 10 mM EDTA,
1 % [w/v] SDS, pH 8,0

Diese Lösung zu gleichen Teilen mit Phenol mischen.

2.15.2. Isolierung von Poly(A)⁺-RNA aus *Craterostigma plantagineum* (Bartels and Thompson, 1983)

Das Pflanzenmaterial (ca. 20 g Frischgewicht) wurde in flüssigem Stickstoff zusammen mit Quarzsand zu feinem Pulver gemörsert. Dann wurde es mit 100 ml Puffer 1 versetzt und unter kräftigem Schwenken 20 min bei 37 °C in einer 500 ml

Glasflasche inkubiert. Diese wässrige Lösung wurde anschließend nacheinander jeweils zweimal mit 1 Volumen Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) und zweimal mit je 2 Volumen Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) durch kräftiges Schütteln für 5-10 min extrahiert. Die Phasentrennungen zwischen den einzelnen Schritten erfolgte jeweils durch 10-minütige Zentrifugation bei 6.000 rpm und RT. Anschließend wurde die wässrige Phase mit 0,1 Vol 4 M NaCl versetzt und abzentrifugiert (10.000 rpm, 10 min, 4 °C). Zum Überstand wurde 0,2 g Oligo-(dT)-Cellulose (Boehringer/Roche, Mannheim) gegeben, an die die Poly(A)⁺-RNA in den folgenden 30 min bei RT und sanftem Schütteln binden sollte. Danach wurde die Oligo-(dT)-Cellulose abzentrifugiert (2000 x g, Bremsstufe 5, 1 min, 4 °C) und jeweils 3-4 mal erst mit Puffer 2, dann mit Puffer 3 gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Cellulose in eine 10 ml Säule gefüllt und die RNA mit fünf Aliquots à 500 µl 55 °C warmem Puffer 4 eluiert. Die Fraktionen wurden 5 min bei 10.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert, um restliche Cellulose abzutrennen, und die Überstände über Nacht bei -20 °C mit 0,1 Volumen 4 M NaCl und 2 Volumen 100 % Ethanol gefällt.

Am nächsten Tag wurde die RNA abzentrifugiert (20 min, 14.000 rpm, 4 °C), mit 70 % Ethanol gewaschen, die Pellets bei RT getrocknet und entweder für Northern-Analysen in 20 µl Puffer 4 vereinigt oder für spätere cDNA-Synthese ein weiteres Mal aufgereinigt. Dazu wurde die RNA-Lösung mit 5 ml Puffer 2 und 0,2 g regenerierter Oligo-(dT)-Cellulose versetzt und erneut wie oben beschrieben inkubiert, gewaschen, eluiert und gefällt. Zur Konzentrationsbestimmung wurde 1 µl im Photometer gemessen. Poly(A)⁺-RNA wurde bei -70 °C gelagert.

Puffer 1: 100 mM NaCl, 50 mM Tris, 10 mM EDTA, 2 % [w/v] SDS,
0,2 mg/ml frisch zugegebene Proteinase K (Merck), pH 9,0

Puffer 2: 400 mM NaCl, 10 mM Tris, 0,2 % [w/v] SDS, pH 7,5

Puffer 3: 10 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7,5

Puffer 4: 10 mM Tris, pH 7,5

Regeneration der Oligo-(dT)-Cellulose:

Nach Elution der RNA vom Säulenmaterial wurde dieses zweimal 5 min lang in 100 mM NaOH inkubiert und anschließend mit Puffer 4 gewaschen, bis der pH-Wert wieder bei 7 lag. Dann wurde die Cellulose mit 100 % Ethanol gespült, im Vakuum-Exsikkator getrocknet und bei -20 °C bis zur nächsten Verwendung gelagert.

2.15.3. Isolierung von genomischer DNA aus *Craterostigma plantagineum* und *Arabidopsis thaliana* (Doyle and Doyle, 1989)

0,5-1 g Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert und in 7,5 ml vorgewärmtem Extraktionspuffer 30 min bei 60 °C extrahiert. Anschließend wurde 1 Volumen Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) zugefügt, die Lösung mehrmals gekippt und für 10 min bei 1.600 x g und RT zentrifugiert. Zum wässrigen Überstand wurde 5 ml kaltes Isopropanol gegeben und die DNA bei RT präzipitiert. Nach anschließender Zentrifugation (10 min, 1.600 x g, RT) wurde das Pellet in 15 ml 76 % [v/v] Ethanol, 10 mM Ammoniumacetat gewaschen, erneut zentrifugiert (10 min, 1.600 x g, RT) und bei RT getrocknet. Anschließend wurde es in 1 ml 10 mM Tris, pH 8,0 resuspendiert und die DNA darin durch Zugabe von RNase A+T₁ (Endkonzentration 10 µg/µl) 30 min bei 37 °C verdaut. Danach wurde die DNA erneut durch Zugabe von 2 ml 10 mM Tris, pH 8,0, 1 ml 7,5 M Ammoniumacetat, pH 7,7 und 10 ml 100 % Ethanol bei -20 °C für 1-2 h gefällt. Die DNA wurde dann für 10 min bei 10.000 x g und 4 °C abzentrifugiert und mit 70 % Ethanol gewaschen. Das luftgetrocknete Pellet wurde in 10 mM Tris, pH 8,0 aufgenommen. Genomische DNA wurde bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Extraktionspuffer: 3,5 % [w/v] CTAB für *Arabidopsis* bzw.
 2,0 % [w/v] CTAB für *Craterostigma*,
 100 mM Tris, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl,
 0,2 % [v/v] β-ME, pH 8,0

2.15.4. Isolierung von genomischer DNA für PCR aus *Arabidopsis* (Rogers and Bendich, 1985)

Um viele transformierte *Arabidopsis*-Linien auf den Einbau von Fremd-DNA ins Genom zu überprüfen, wurde aus nur sehr wenig Blattmaterial genomische DNA präpariert, was für PCR-Tests ausreichte.

für etwa 16 h inkubiert. 2 ml Bakteriensuspension wurden 5 min bei 6.000 rpm und RT abzentrifugiert und das Pellet in 200 µl Puffer 1 resuspendiert. Dann wurden 200 µl Puffer 2 zur Lyse der Zellen zugegeben und die Lösung sofort mehrmals gekippt. Um die genomische DNA auszufällen, wurde die Lösung anschließend mit 400 µl vorgekühltem Puffer 3 versetzt, wieder mehrmals invertiert und 10 min lang auf Eis inkubiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4 °C wurde der Überstand mit 800 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert. Die Mischung wurde abzentrifugiert (14.000 rpm, 5 min, RT) und die obere Phase mit 0,7 Volumen Isopropanol für 10 min bei RT gefällt. Nach anschließender Zentrifugation (14.000 rpm, 20 min, 4 °C) wurde das Pellet zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen und bei RT getrocknet. Um die restliche RNA zu verdauen, wurde das Pellet in 20 µl 10 mM Tris, pH 8,5 und 2 µl RNase A+T₁ resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Zur Überprüfung der Qualität der isolierten DNA und zur Mengenabschätzung wurde ein Aliquot im 1 %igen Agarose-Gel aufgetrennt.

Diese DNA konnte nun für Restriktionsanalysen oder PCR-Tests eingesetzt werden. Falls sie jedoch für Sequenzierungen verwendet werden sollte, wurde sie zur weiteren Aufreinigung vorher mit PCI extrahiert und erneut gefällt (siehe 2.15.8.).

Puffer 1: 50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8,0,
 100 µg/ml RNase A¹

RNase A-Stocklösung: 100 mg/ml in Aqua dest. lösen, 10 min bei 100 °C kochen und langsam abkühlen lassen, bei -20 °C lagern

Puffer 2: 200 mM NaOH, 1 % [w/v] SDS

Puffer 3: 3 M Kaliumacetat, pH 5,5

2.15.5.2. Plasmid-Präparation im großen Maßstab

Falls mehr als nur einige Mikrogramm Plasmid-DNA benötigt wurden, erfolgte die Plasmid-Präparation mit Hilfe des Midi- oder Maxi-Plasmid-Präparations-Kits von Qiagen nach den Angaben des Herstellers.

¹ vor Gebrauch zugeben

2.15.6. Isolierung von Plasmid-DNA aus *Agrobacterium tumefaciens*

Die Agrobakterien wurden in 2 ml selektivem YEB-Medium angeimpft und für ca. 21 h bei 28 °C im Schüttler angezogen. Dann wurden die Zellen pelletiert (5 min, 6.000 rpm, RT), wieder in 400 µl Lösung I resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Als nächstes folgte die alkalische Lyse durch Zugabe von 800 µl Lösung II. Die Probe wurde gemischt und wieder für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden zur besseren Abtrennung von Proteinen 120 µl Lösung IIa hinzugefügt, gemischt und mit 600 µl 3 M Natriumacetat, pH 5,2 wieder neutralisiert. Diese Ansatz wurde nun 15 min bei -20 °C inkubiert und anschließend für 5 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in 3 Aliquots à 650 µl aufgeteilt, die jeweils mit 2 Volumen eiskaltem 100 % Ethanol versetzt wurden. Es folgte eine weitere 15-minütige Fällung bei -80 °C. Danach wurde zentrifugiert (10 min, 14.000 rpm, 4 °C) und die getrockneten Pellets wieder in insgesamt 500 µl 0,3 M Natriumacetat, pH 7,0 vereinigt. Nach Zugabe von 1000 µl 100 % Ethanol folgte eine weitere Fällung (15 min bei -80 °C). Anschließend wurde die DNA wieder abzentrifugiert (10 min, 14.000 rpm, 4 °C), 2 mal mit 70 % Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet und in 50 µl 10 mM Tris, pH 8,0 und 3 µl RNase A+T₁ (Sigma) gelöst. Nach etwa 15 min RNase-Verdau wurden 9 µl dieser Mischung in einem 0,8 %igen Agarose-Gel aufgetrennt.

Lösung I: 50 mM Glukose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris, pH 8,0,
 4 mg/ml Lysozym¹

Lösung II²: 0,2 M NaOH, 1 % [w/v] SDS

Lösung IIa²: 2 Volumen Lösung II, 1 Volumen Phenol

2.15.7. Isolierung einer DNA-Bande aus einem Agarosegel

PCR-Ansätze, geschnittene PCR-Produkte und Restriktionsverdau von Plasmiden, in die DNA hineinkloniert werden sollte, wurden zur Abtrennung von Nukleotiden im Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wurde die gesuchte Bande aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des Kits QIAEX II von Qiagen nach den Angaben des Herstellers aus dem Gel isoliert.

¹ vor Gebrauch zugeben

² frisch ansetzen

2.15.8. (PCI-) Fällung von DNA

Zur Abtrennung von Enzymen nach Verdaureaktionen und/oder zur Konzentrierung von DNA-Proben wurden diese (PCI-) gefällt. Dazu wurde die Probe auf 50-200 µl aufgefüllt – je geringer die DNA-Konzentration, desto geringer sollte auch das Volumen sein – und mit 1 Volumen Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt. Der Ansatz wurde gemischt und 5 min bei 14.000 rpm und RT zentrifugiert. Falls nur eine Konzentrierung der Probe gewünscht war, wurde dieser Extraktionsschritt ausgelassen. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und die DNA darin mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5,2 und 2,5 Volumen 100 % Ethanol 1 h bei -20 °C gefällt. Nach anschließender Zentrifugation (20 min, 14.000 rpm, 4 °C) wurde das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und bei RT getrocknet. Zuletzt wurde die DNA in geeignetem Puffer-Volumen resuspendiert.

2.15.9. Isolierung von Kernproteinen aus *Craterostigma plantagineum*

Etwa 15 g Pflanzenmaterial wurden in flüssigem Stickstoff mit etwas Quarzsand gemörsert. Das Pulver wurde auf Eis mit 125 ml Extraktionspuffer vermischt und durch 200 µm und 50 µm Nylongaze filtriert. Das Filtrat wurde anschließend 5 min bei 1.200 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde zunächst in 3 ml Lysispuffer resuspendiert und anschließend das Endvolumen auf 4 ml eingestellt. Dieser Rohextrakt wurde mit 0,4 ml 4 M (NH₄)₂SO₄ versetzt und 30 min lang sanft bei 4 °C gemischt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 5.000 x g und 4 °C wurde der Überstand 1 h bei 200.000 x g und 4 °C im Ausschwing-Rotor (SW 55-Ti) zentrifugiert (Beckmann L8-70M Ultrazentrifuge). Pro ml Überstand wurden 0,3 g (NH₄)₂SO₄ pro zugefügt und die Proteine 30 min lang bei 4 °C auf einem Schüttler ausgefällt. Dann wurde die Lösung erneut zentrifugiert (15.000 x g, 10 min, 4 °C), das Pellet in möglichst wenig (200-400 µl) 2 x Bindepuffer aufgenommen und 4 h gegen den gleichen Puffer bei 4 °C dialysiert. Zum Schluss wurde die Proteinlösung aliquotiert und bei -70 °C tiefgefroren. Die Protein-Konzentration wurde mit Hilfe des Bio-Rad-Protein-Assays (siehe 2.16.2.) ermittelt.

Extraktionspuffer: 10 mM HEPES, 10 mM MgCl₂, 1 mM 2-Methyl-2,4-Pentandiol (Sigma), 10 mM β-ME¹, 0,5 mM PMSF¹, pH 7,5

¹ vor Gebrauch zugeben

Lysispuffer: 100 mM KCl, 15 mM Hepes, 5 mM MgCl₂, 3,5 mM β-ME¹,
0,1 mM PMSF¹, pH 7,5

2 x Bindepuffer: 14 % [v/v] Glycerin, 15 mM Hepes, 8 mM Tris-HCl,
120 mM KCl, 0,14 mM EDTA, 7 mM β-ME¹, 0,1 mM PMSF¹,
pH 7,5

Vorbereitung der Dialyse-Schläuche:

Die Schläuche wurden nacheinander je 15 min in 50 mM EDTA und 500 mM Na₂CO₃ gekocht. Anschließend wurden sie mehrmals gründlich mit Aqua dest. gespült und bei 4 °C darin aufbewahrt.

2.15.10. Isolierung von Proteinen aus *E. coli*

Induktion: 200 µl einer Vorkultur wurden 1:10 in frischem LB-Medium verdünnt und 1 h inkubiert (300 rpm, 27 bzw. 37 °C). Dann wurde zur Induktion der Genexpression der Induktor IPTG in einer Endkonzentration von 0,1 bzw. 1 mM zugefügt und die Suspension weitere 3 h im Schüttler inkubiert.

Isolierung von Gesamt-Protein: Die Bakterien wurde bei 6.000 rpm für 5 min bei RT abzentrifugiert, das Pellet in 1 x SDS-Probenpuffer aufgenommen und ein Aliquot auf ein 12 %iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen.

Isolierung von Protein in Einschlusskörpern und löslichem Protein: Das Bakterien-Pellet (siehe oben) wurde in 100 µl PBS-T mit 2 mg/ml Lysozym¹ resuspendiert und sonifiziert. Nach Zentrifugation (10 min, 14.000 rpm, 4 °C) wurden die unlöslichen Proteine im Pellet in 80 µl 1 x SDS-Proben-Puffer aufgenommen. Die löslichen Proteine im Überstand wurden in 1 Volumen 2 x SDS-Probenpuffer verdünnt. Beide Proben wurden auf ein 12 %iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen.

2 x SDS-Probenpuffer: 62,5 mM Tris, pH 6,8, 10 % [v/v] Glycerin, 2 % [w/v] SDS,
5 % [v/v] β-ME, 0,1 % [w/v] Bromphenolblau

PBS-T: 0,15 M NaCl, 16 mM Na₂HPO₄, 4 mM NaH₂PO₄,
1 % [v/v] Triton X-100

¹ vor Gebrauch zugeben

2.15.11. Isolierung von Gesamt-Protein aus Hefe

Hefezellen wurden in selektivem Medium bis zu einer $OD_{600} = 1$ angezogen. Dann wurden sie unter dem Mikroskop auf bakterielle Kontamination hin untersucht, 5 min bei 6.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert, gewogen und bei -20 °C tiefgefroren. Etwa 900 mg Hefe-Zellen wurden in einem entsprechenden Volumen Hefe-Extraktionspuffer aufgetaut und darin 25 min bei RT und leichter Bewegung inkubiert. Der Protein-haltige Überstand wurde abzentrifugiert (14.000 rpm, 5 min, 4 °C) und portionsweise durch Vivaspin 2-Konzentrator-Röhrchen (2 ml Volumen, Ausschlussgröße 10 kDa, Membran aus regenerierter Cellulose, Hersteller Vivascience) filtriert (Festwinkelrotor, 3.700 rpm, 2 °C). Die verbliebenen Proteine (> 10 kDa) wurden mit 2 x Bindepuffer gewaschen und dabei das Volumen zuletzt auf 200 µl konzentriert. Dieses Protein-Konzentrat wurde aliquotiert und bei -70 °C tiefgefroren. Seine Protein-Konzentration wurde mit Hilfe des Bio-Rad-Protein-Assays (siehe 2.16.2.) gemessen.

Hefe-Extraktionspuffer: Y-PER-S (= Yeast Protein Extraction Reagent Nr. 78999 von Perbio Science): 3,75 ml pro 1 g Zell-Pellet,
Protease-Inhibitor-Cocktail for Fungal and Yeast Cells (Sigma P8215)¹: 13,3 µl pro 1 ml Y-PER-S, 100 mM DTT

2 x Bindepuffer: 14 % [v/v] Glycerin, 15 mM HEPES, 8 mM Tris,
120 mM KCl, 0,14 mM EDTA, 7 mM β-ME¹, 13,3 µl/ml
Protease-Inhibitor Cocktail¹ (s. o.), pH 7,5

2.16. Quantifizierungsmethoden

2.16.1. Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von Nukleinsäurelösungen wurden mit Hilfe eines Spektralphotometers bestimmt. Dabei hat doppelsträngige DNA ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm, wohingegen Proteine ein Maximum bei $\lambda = 280$ nm aufweisen. Für die Berechnung der Konzentration von aufgereinigten Nukleinsäuren gelten die folgenden Regeln:

- Bei einer $OD_{260} = 1$ enthält die Lösung 50 µg doppelsträngige DNA pro ml.
- Bei einer $OD_{260} = 1$ enthält die Lösung 40 µg einzelsträngige RNA pro ml.

¹ vor Gebrauch zugeben

Bei reinen DNA-Proben sollte der Quotient OD_{260}/OD_{280} zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Ist er kleiner als 1,8, liegen Verunreinigungen mit Proteinen oder aromatischen Substanzen vor, wie zum Beispiel Phenol. Ist er größer als 2, so enthält die Probe noch RNA-Verunreinigungen.

Bei reiner RNA liegt der Quotient OD_{260}/OD_{280} über 2. Ist er kleiner als 2, bestehen noch Verunreinigungen mit Proteinen oder aromatischen Substanzen.

2.16.2. Bio-Rad-Protein-Assay zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Bradford-Methode

Die Proteinprobe wurde mit Aqua dest. auf 100 μ l aufgefüllt. Dann wurden 200 μ l Bradford-Lösung mit 700 μ l Aqua dest. vermischt und zu der Probe pipettiert. Nach 5 min Inkubation bei RT erfolgte die photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 595 nm. Zur Umrechnung der gemessenen ODs wurde parallel zur Messung von unbekanntem Proben immer eine BSA Fraktion V-Eichreihe mit BSA-Konzentrationen zwischen 0 und 10 μ g/ μ l Protein mitbehandelt.

2.17. Klonierungsmethoden

2.17.1. Primer-Design und (Mutagenese-) PCR

Allgemeine Richtlinien für PCR-Experimente:

Bei der Konstruktion von Mutagenese-, PCR- und Sequenzierungs-Primern wurden folgende Kriterien beachtet:

- Der GC-Gehalt sollte bei ungefähr 50 % liegen und die Schmelztemperatur T_M , die nach der Faust-Regel $T_M = 4*(G+C)+2*(A+T)$ ermittelt wurde, wobei A, T, C und G hier für die Anzahl der jeweiligen Nukleotide stehen, sollte ungefähr 60 - 65 °C betragen.
- Da zwischen G und C drei Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden, sollten die Enden der Primer mit mindestens einem dGTP oder dCTP abschließen.
- Der Primer sollte sich nicht mit sich selbst oder mit anderen Primern paaren. Dieses Kriterium wurde bei der Primerbestellung mit Hilfe der SigmaARK-Software im Internet überprüft.
- Die Schmelztemperaturen beider Primer einer PCR sollten ungefähr gleich sein. Falls Mutationen eingeführt wurden, sollte die Schmelztemperatur des Mutagenese-Primers etwas höher liegen als die des Gegenprimers.

- Eine (neue) Restriktionsschnittstelle im PCR-Fragment, die später zur Klonierung aufgeschnitten werden sollte, musste einen bestimmten Mindestabstand zum Ende des PCR-Fragmentes aufweisen, damit die Restriktionsenzyme schneiden konnten. Hierbei wurde nach den Angaben im New England Biolabs-Katalog 1998/99 (S. 258-259) verfahren. Danach sollten bei Bam HI 2 bp, bei Eco RI 1 bp, bei Hind III mindestens 3 bp, bei Sal I mindestens 4 bp, bei Sph I mindestens 4 bp, bei Pst I mindestens 4 bp und bei Xba I mindestens 2 bp Abstand von der Schnittstelle bis zum PCR-Fragment-Ende bzw. dem 5'-Primer-Ende eingehalten werden.
- Pro Primer wurden höchstens vier neue Punktmutationen eingeführt. Diese sollten möglichst im zentralen Bereich des Primers liegen.

Mehrstufige PCRs mit sich überlappenden Primern:

- Bei einigen Klonierungen wurde zusätzlich zur Mutagenese eines Promotor-Elements auch noch eine neue Schnittstelle zur späteren Klonierung eingeführt. Häufig lagen hierbei die zu verändernden Nukleotide zu weit voneinander weg, und/oder es waren zu viele für eine Mutagenese mit nur einem einzigen Primer. Daher wurden mehrstufige PCRs mit bis zu vier Stufen durchgeführt. Dabei diente das erste PCR-Produkt nach Isolierung aus dem Agarose-Gel als Matrize für die zweite PCR usw., wobei sich die Primer jeweils überlappten. Der Überlappungsbereich betrug 14-17 bp mit einer Schmelztemperatur von 46-48 °C. Überlappungsprimer besaßen Gesamt-Schmelztemperaturen von bis zu 80 °C.

Taq-Aufbewahrungspuffer: 50 mM Tris, 50 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 50 % [v/v] Glycerin, pH 7,9
sterilfiltrieren und bei -20 °C lagern

Ein 50 µl PCR-Ansatz bestand aus folgenden Komponenten:

- 31,7-36,7 µl Milli-Q-Wasser
- 5,0 µl 10 x PCR-Puffer (GibcoBRL/Invitrogen)
- 1,5 µl 50 mM MgCl₂ (GibcoBRL/Invitrogen)
- 2,0 µl Primer 1 (10 pmol/µl)
- 2,0 µl Primer 2 (10 pmol/µl)
- 1,2 µl Plasmid-DNA (5 ng/µl) (siehe 2.15.5.) oder
- 1,2 µl PCR-Produkt (5 ng/µl)
- oder 1 Bakterien-Kolonie (siehe 2.17.6.2.)
- oder 1-5 µl genomische DNA (siehe 2.15.4.)
- oder 1-2 µl Hefe-Plasmid-DNA (siehe 2.23.3.)
- 1,6 µl Taq-Polymerase (nach Pluthero et al. (1993) selbst isoliert und vor Gebrauch frisch 1:10 in Taq-Aufbewahrungspuffer verdünnt)

Programm einer Standard-PCR:

- 94 °C 3 min Denaturierung
 - 94 °C 30 sec Denaturierung
 - T_A 30 sec Primer-Bindung
 - 72 °C ≥ 30 sec DNA-Synthese
- } 36 Schleifen
- 72 °C 5 min Fertigstellung nicht vollständig synthetisierter PCR-Produkte
 - 4 °C Lagerung

Programm einer Mutagenese-PCR:

- 94 °C 3 min Denaturierung
 - 94 °C 30 sec Denaturierung
 - T_{A_M} 30 sec Primer-Bindung
 - 72 °C ≥ 30 sec DNA-Synthese
- } 10 Schleifen
- 94 C 30 sec Denaturierung
 - T_A 0 sec Primer-Bindung
 - 72 °C ≥ 30 sec DNA-Synthese
- } 26 Schleifen
- 72 °C 5 min Fertigstellung nicht vollständig synthetisierter PCR-Produkte
 - 4 °C Lagerung

Programm einer mehrstufigen PCR mit sich überlappenden Primern (P1) und einem Gegenprimer (P2) mit extrem unterschiedlicher T_M :

94 °C	3 min Denaturierung	
94 °C	30 sec Denaturierung	} 10 Schleifen
T_{A_P2}	15 sec Bindung des Gegen-Primers P2	
$T_{A_Ü_P1}$	30 sec Bindung des Überlappungs-Primers P1	
72 °C	≥ 30 sec DNA-Synthese	
94 °C	30 sec Denaturierung	} 26 Schleifen
T_{A_P1}	15 sec Bindung des Überlappungs-Primers P1	
T_{A_P2}	30 sec Bindung des Gegen-Primers P2	
72 °C	≥ 30 sec DNA-Synthese	
72 °C	5 min Fertigstellung nicht vollständig synthetisierter PCR-Produkte	
4 °C	Lagerung	

T_A = Anlagerungs-Temperatur = T_M minus 4 °C

T_{A_M} = T_M des Mutagenese-Primers minus 10 °C oder T_A des Gegenprimers, falls $T_A < T_{A_M}$

$T_{A_Ü}$ = T_M des Überlappungsbereichs zweier Primer von zwei aufeinander folgenden PCR-Stufen minus 4 °C

2.17.2. Restriktion (Maniatis et al., 1989)

Reaktionsansätze zum Verdau von DNA hatten die folgende Grundzusammensetzung:

1 µg	DNA
x µl	Aqua dest.
0,1 x Endvolumen	10 x Reaktionspuffer
5 U	Restriktionsenzym 1
5 U	Restriktionsenzym 2 (optional)

Das Endvolumen der Reaktion betrug immer mindestens das 10-fache Volumen der eingesetzten Enzymmenge, weil sonst durch den hohen Glycerin-Gehalt unspezifische Reaktionen begünstigt wurden. Der Ansatz wurde 1-2 h bei 37 °C inkubiert. Ein Doppelverdau mit zwei Enzymen gleichzeitig war nur möglich, wenn die beiden Enzyme in demselben Reaktionspuffer arbeiteten.

2.17.3. Dephosphorylierung (Maniatis et al., 1989)

Um bei der ungerichteten Klonierung eines DNA-Fragments in nur eine Restriktionsschnittstelle eine Re-Ligation des Vektors zu vermeiden, wurde dieser vor der Ligation an den 5'-Enden mit Shrimp Alkalischer Phosphatase (SAP, Boehringer/Roche, Mannheim) dephosphoryliert. Der Ansatz (9 µl Endvolumen) hatte folgende Zusammensetzung:

50 ng Vektor-DNA
 0,9 µl 10 x Reaktionspuffer
 1 µl SAP (1 U/µl)

Die Dephosphorylierung erfolgte 20 min bei 37 °C. Anschließend wurde das Enzym durch 15-minütige Inkubation bei 65 °C inaktiviert.

2.17.4. Ligation

Ein 10 µl Ligationsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

z µl Milli-Q-Wasser
 1 µl 10 x Ligase-Puffer
 1 µl restringierte Vektor-DNA, eventuell dephosphoryliert
 x µl Insert 1
 y µl Insert 2 (optional) mit $x + y + z = 7$
 1 µl T4-DNA-Ligase (Roche)

Vektor und Insert(s) standen etwa im Verhältnis von 1 : 3 (: 3).

Der Ansatz wurde 14-20 h bei 16 °C inkubiert.

2.17.5. Transformation

2.17.5.1. Herstellung Calcium-kompetenter *E. coli*

Eine Bakterien-Kultur wurde in 10 ml LB inokuliert und für ca. 14 h im Schüttler bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Mit 100 µl dieser Vorkultur wurden 40 ml frisches LB-Medium angeimpft und die Bakterien bis zu einer $OD_{600} = 0,5$ angezogen. Die Zellen wurden kurz auf Eis abgekühlt und 5 min bei 5.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml kalte 0,1 M $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert und wieder zentrifugiert (s. o.). Danach wurde das Pellet in 9 ml kalte 0,1 M $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert, erneut zentrifugiert und zuletzt in 1 ml 0,1 M $CaCl_2$, 15 % [v/v] Glycerin aufgenommen. Aliquots à 100 µl wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

2.17.5.2. Transformation Calcium-kompetenter *E. coli*

Ein 100 µl Aliquot kompetenter *E. coli*-Bakterien wurde langsam auf Eis aufgetaut. In der Zwischenzeit wurden 2 µl Plasmid-DNA (5 ng/µl) oder 1-5 µl Ligationsansatz mit kalter 0,1 M CaCl₂-Lösung auf 100 µl aufgefüllt. Diese Lösung wurde zu der Bakteriensuspension gegeben, der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und 1 h auf Eis inkubiert. Dann folgte im Wasserbad bei 42 °C der Hitzeschock für exakt 120 sec. Anschließend wurden die Zellen mit 650 µl LB-Medium versorgt und zur Ausbildung der neuen Resistenz 1 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Zum Schluss wurden sie in 100-300 µl Portionen auf selektivem LB-Medium ausplattiert.

2.17.5.3. Herstellung elektrokompetenter *E. coli* (Tung and Chow, 1995)

Eine Bakterien-Kultur wurde in 10 ml LB inokuliert und für ca. 14 h im Schüttler bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Mit 2 x 2 ml dieser Vorkultur wurden 2 x 200 ml frisches LB-Medium angeimpft und die Bakterien ungefähr 3 h angezogen bis zu einer OD₆₀₀ = 0,6. Dann wurden die Zellen 30 min auf Eis gekühlt und in 50 ml Falcon Tubes abzentrifugiert (5 min, 5.000 rpm, 4 °C). Danach wurden die Bakterien jeweils mit 50 ml kaltem Aqua dest. gewaschen. Die Zellen wurden wieder pelletiert und jeweils in 25 ml kaltem Aqua dest. resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden jeweils vier Pellets vereinigt und zweimal nacheinander in 50 ml 10 % [v/v] Glycerin gewaschen. Anschließend wurden die beiden Pellets jeweils in 10 ml kaltem GYT-Medium resuspendiert, wieder zentrifugiert und zuletzt in je 2 ml GYT gelöst. Etwa 80 Aliquots à 50 µl wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C bis zur Elektroporation gelagert.

GYT: 10 % [v/v] Glycerin, 0,125 % [w/v] Selekt-Hefe-Extrakt,
0,25 % [w/v] Trypton

2.17.5.4. Herstellung elektrokompetenter *A. tumefaciens*

Eine Bakterienkolonie wurde in 3 ml YEB_{Rif}-Medium angeimpft und für 14-16 h bei 28 °C im Schüttler bei 250 rpm angezogen. Die Agrobakterien dieser Vorkultur wurden komplett in 50 ml frisches YEB_{Rif}-Medium überimpft und 8 h lang bis zu einer OD₆₀₀ = 0,5 inkubiert. Die Zellen wurden 30 min auf Eis inkubiert. Die Agrobakterien wurden nun mehrfach hintereinander abzentrifugiert (5.000 rpm, 10 min, 4 °C) und wieder resuspendiert, und zwar nacheinander in

25 ml 1 mM Hepes, pH 7,5,
 12,5 ml 1 mM Hepes, pH 7,5,
 10 ml 10 % [v/v] Glycerin, 1 mM Hepes, pH 7,5,
 5 ml 10 % [v/v] Glycerin, 1 mM Hepes, pH 7,5,
 2 ml 10 % [v/v] Glycerin

und zuletzt in 1 ml 10 % [v/v] Glycerin.

40 µl Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -70 °C aufbewahrt.

2.17.5.5. Elektroporation (Tung and Chow, 1995)

Die elektrokompenten Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut und die Elektroporationsküvette dort vorgekühlt. Dann wurden 1-2 µl DNA – entweder ein Ligationsansatz oder ein aufgereinigtes Plasmid (5 ng/µl) – zu den Zellen pipettiert. Die Suspension wurde kurz gemischt und luftblasenfrei in die Küvette überführt. Die Küvette wurde außen kurz trocken gewischt und die Elektroporation durchgeführt. Unmittelbar danach wurden entweder 1 ml YEB-Medium oder 650 µl SOC zu den Zellen gegeben und diese in ein Glasröhrchen überführt. Dann folgte eine einstündige Inkubation im Schüttler bei 200 rpm. Zuletzt wurden die Zellen portionsweise auf selektivem Medium ausgestrichen und im Brutschrank angezogen. Für *E. coli* und *A. tumefaciens* wurden jeweils unterschiedliche Parameter für die Elektroporation berücksichtigt, die im Folgenden aufgelistet sind.

	<u><i>E. coli</i></u> :	<u><i>A. tumefaciens</i></u> :
Transformierte DNA:	Ligation oder Plasmid	nur Plasmid
Elektroporationsküvette (Bio-Rad):	1 mm	2 mm
Kapazität:	25 µF	25 µF
Spannung:	1,6 kV	2,5 kV
Widerstand:	200 Ω	400 Ω
Flüssig-Medium nach Elektroporation:	SOC	YEB
Inkubationstemperatur:	37 °C	28 °C
Zeit, bis Kolonien erscheinen:	12-16 h	48-72 h

SOC: 2 % [w/v] Trypton, 0,5 % [w/v] Selekt-Hefe-Extrakt, 10 mM NaCl,
 10 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂

2.17.6. Screening-Methoden

2.17.6.1. Kolonie-Hybridisierung

Um bei einer großen Anzahl von Bakterien zu überprüfen, ob in ihnen die gewünschte DNA enthalten war, wurde die Kolonie-Hybridisierung angewendet. Dazu wurden Bakterien parallel auf einer Kontroll-Platte und auf einer Platte mit Protran BA85-Membran (Schleicher & Schüll, Dassel) angezogen. Nach etwa 12-16 h Wachstum wurde die Membran mit der bewachsenen Seite nach oben nacheinander auf drei Filterpapiere gelegt, die mit 10 % [w/v] SDS, Denaturierungslösung bzw. Neutralisationslösung angefeuchtet worden waren. Der Zellaufschluss durch das SDS dauerte 3 Minuten, DNA-Denaturierung und -Neutralisation jeweils 5 Minuten. Nach kurzem Waschen des Filters in 10 x SSC und anschließendem Trocknen wurde die vorliegende DNA durch zweistündiges Backen bei 80 °C an der Membran fixiert. Die Hybridisierung erfolgte analog zur Southern-Hybridisierung. Die Plasmide wurden aus denjenigen Bakterien-Klonen der Kontroll-Platte präpariert, deren Pendant ein positives Hybridisierungssignal gegeben hatte.

2.17.6.2. Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR ist ein schnelles Verfahren, um zahlreiche *E. coli*-Klone voneinander zu unterscheiden, die mit einem Gemisch aus zwei Vektoren, die den gleichen Selektionsmarker besitzen, transformiert worden sind. Die PCR wurde wie unter 2.17.1. beschrieben durchgeführt. Als DNA-Matrize wurde eine Bakterien-Kolonie mit einer gelben Pipettenspitze aufgenommen, auf eine Kontroll-Platte getupft und im PCR-Ansatz verteilt. Die Kontrollplatte wurde bebrütet, und aus PCR-positiven Klonen wurden die Plasmide präpariert.

2.17.6.3. Blau-Weiß-Selektion

Bei einigen Vektoren, wie zum Beispiel pBluescript, liegt die multiple Klonierungsstelle (MCS) inmitten einer Gensequenz (*lacZ*) für das α -Peptid der β -Galactosidase. Fügt man dem Medium das Substrat X-Gal (1,6 ml/l Stocklösung, siehe 2.12.) und IPTG (320 μ l/l Stocklösung, siehe 2.12.) als Induktor für die *lacZ*-Expression zu, dann wandeln die Bakterien mit Hilfe einer intakten β -Galactosidase das Substrat X-Gal in einen unlöslichen Indigo-Farbstoff um. Ist die β -Galactosidase-Sequenz durch eine Insertion unterbrochen, so wird das Substrat nicht umgesetzt.

Auf diese Weise lassen sich positive weiße Kolonien von negativen blauen Kolonien, die nur den religierten leeren Vektor besitzen, unterscheiden.

2.17.7. QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis (Stratagene)

Die Methode der Ziel-gerichteten Mutagenese wurde eingesetzt, wenn eine Punktmutation eingeführt werden sollte. Dazu wurden auf beiden Plasmidsträngen an dieser Stelle komplementäre mutagenisierende Primer konstruiert und nach den Angaben des Kit-Herstellers eine PCR durchgeführt. Dabei entstanden Plasmide mit der gewünschten Mutagenese und einem Bruch pro Strang. Dann folgte ein Dpn I-Verdau, bei dem nur die aus *E. coli* stammende dam-methylierte Matrizen-DNA abgebaut wurde. Das neu synthetisierte Plasmid wurden in *E. coli* XL1-Blue transformiert. Dort wurde es repariert, vermehrt und konnte wieder präpariert werden.

2.17.8. Anlage von Dauerkulturen (Glycerin-Stocks)

Zur langfristigen Aufbewahrung von Bakterien- oder Hefe-Klonen wurden diese in selektivem Medium angezogen, mit Glycerin steril 1:1 vermischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.18. Sequenzierung

Plasmid-DNAs oder aus einem Agarose-Gel ausgeschnittene PCR-Produkte wurden auf eine Konzentration von 250 ng/μl eingestellt und zusammen mit geeigneten Primern (10 pmol/μl) abgegeben. Die Sequenzierungen wurden von der ADIS-Gruppe des Max-Planck-Instituts für Züchtungsforschung in Köln durchgeführt.

2.19. RT-PCR

Die RT-PCR ist ein halb-quantitatives Verfahren zum selektiven Nachweis von mRNAs in einem mRNA-Pool. Dabei werden die DNA-freien mRNAs zunächst in cDNA transkribiert. Danach wird die RNA verdaut, und die einsträngige cDNA dient als Matrize für eine PCR-Amplifikation mit spezifischen Primern.

DNase-Verdau: 1 μg Poly(A)⁺-RNA oder 16 μg Gesamt-RNA
(in 200 μl Endvolumen) 4 μl RNase freie DNase (10 U/μl, Boehringer/Roche)
in 100 mM Natriumacetat, pH 5,2, 5 mM MgCl₂

Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert, anschließend mit PCI extrahiert (siehe 2.15.8.) und mit 0,5 Volumen 7,5 M Ammoniumacetat und 2 Volumen 100 % Ethanol für 1 h bei -20 °C gefällt. Nach 20-minütiger Zentrifugation (14.000 rpm, 4 °C) wurde das RNA-Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und in 20 µl DEPC-Wasser resuspendiert.

cDNA-Synthese:

- 5 µl DNase verdaute RNA
- 2 µl Oligo(dT)₁₀-Primer (25 pmol/µl, Boehringer/Roche)
- 1 µl 10 mM dNTPs
- 4 µl DEPC-H₂O

5 min Inkubation bei 65 °C zur Denaturierung der RNA,
auf Eis abkühlen und kurz abzentrifugieren

- 4 µl Reaktionspuffer zur Synthese des 1. cDNA-Stranges
- 2 µl 0,1 M DTT
- 1 µl RNase-Inhibitor (40 U/µl, Boehringer/Roche)

2 min Inkubation bei 38 °C zur Einstellung der optimalen
Reaktionstemperatur für die Reverse Transkriptase

- 1 µl Superscript II RT (200 U/µl, GibcoBRL/Invitrogen)

1 h Inkubation bei 38 °C zur cDNA-Synthese

15 min Hitze-Inaktivierung der Superscript II RT bei 70 °C

RNase-Verdau:

- 1 µl RNase H

20 min Inkubation bei 37 °C zum Abbau der RNA

Zur Kontrolle, ob für PCR-Produkte tatsächlich die neu synthetisierte cDNA die Matrize gewesen ist, und nicht etwa unverdaute DNA oder sonstige Verunreinigungen, wurde von jeder RNA zusätzlich eine parallele Probe ohne Reverse Transkriptase angesetzt. Für die PCR-Reaktion wurden jeweils 1 µl unverdünnte und 1 µl 1:10 verdünnte cDNA eingesetzt. Alle PCR-Reaktionen (siehe 2.17.1.) wurden mit demselben PCR-Programm durchgeführt, wobei als Annealing-Temperatur die niedrigste Annealing-Temperatur aller Primer-Paare ausgewählt wurde.

2.20. Elektrophorese, Blotting- und Hybridisierungsmethoden

2.20.1. Agarose-Gel-Elektrophorese von DNA und Gesamt-RNA

Zur Aufreinigung einzelner DNA-Fragmente, zur Beurteilung ihrer Qualität und zur ungefähren Abschätzung ihrer Quantität wurden Nukleinsäure-Proben im Agarose-

Gel aufgetrennt. Je nach Größe der Fragmente variierte die Agarose-Konzentration von 0,8-4 %. Je kleiner die Fragmente waren, desto höherprozentiger wurde das Gel gewählt. Vor dem Gellauf wurden die Proben zur Beschwerung und zur späteren Verfolgung der Lauffront mit 0,1 Volumen DNA-Probenpuffer versetzt, der bei sehr kleinen Fragmenten kein Bromphenolblau enthielt. Die Auftrennung der Proben erfolgte in 1 x TAE-Puffer bei einer Stromstärke von maximal 100 mA. Zur Detektion der Banden wurde das Gel nach der Elektrophorese 15 min in Ethidiumbromid-Lösung gefärbt und anschließend 10 min in 1 x TAE-Laufpuffer wieder entfärbt. Durch Einlagerung von Ethidiumbromid in die DNA-Doppelhelix und in Sekundärstrukturen der RNA wurden Nukleinsäure-Banden im UV-Licht sichtbar. Anhand eines mitaufgetrennten Größenmarkers (1 kb-Leiter, GibcoBRL/Invitrogen) konnten Größe und ungefähre Menge von DNA-Banden abgeschätzt werden.

Agarose-Gel: 0,8-4 % [w/v] Agarose in 1 x TAE-Puffer

Ethidiumbromid-Lösung: 1 mg/l Ethidiumbromid in 1 x TAE-Puffer

2.20.2. RNA-Agarose-Gel-Elektrophorese für RNA-Blots

Zur Auftrennung von RNA für Northern-Blots wurden denaturierende Agarose-Gele verwendet. Dabei verhinderte insbesondere Formaldehyd die Ausbildung von RNA-Sekundärstrukturen, die eine spätere Hybridisierung erschwert hätten. Zur Vorbereitung wurden alle Proben mit Milli-Q-Wasser auf das gleiche Volumen aufgefüllt, im Verhältnis von 1:1 mit RNA-Probenpuffer versetzt und 30 min bei 65 °C denaturiert. Anschließend wurden sie zügig auf ein Northern-Agarose-Gel aufgetragen und im elektrischen Feld bei einer Stromstärke von 70-80 mA in Northern-Laufpuffer aufgetrennt.

5 x Mops: 41,7 g/l Mops, 4,1 g/l wasserfreies Natriumacetat,
10 ml/l 0,5 M EDTA, pH 7,0

RNA-Probenpuffer: 100 µl 5 x Mops, 175 µl 37 % Formaldehyd,
500 µl Formamid,
0,2 µl 10 % [w/v] Bromphenolblau-Lösung

Northern-Agarose-Gel (1,2 %): 1,8 g Agarose, 30 ml 5 x Mops, 93 ml Aqua dest.,
27 ml 37 % Formaldehyd

Die Agarose wurde in der Mikrowelle zunächst nur in 5 x Mops und Wasser geschmolzen. Dann wurde das Formaldehyd zugegeben, gemischt und das Gel gegossen.

Northern-Laufpuffer: 200 ml/l 5 x Mops, 80 ml/l 37 % Formaldehyd

2.20.3. Transfer von DNA auf Nitrozellulosemembran und anschließende Fixierung (Southern, 1975)

Nach der Agarose-Gel-Elektrophorese (siehe 2.20.1.) wurde ein Gel mit genomischer DNA zuerst 15 min in 0,25 M HCl gelegt, um die langen DNA-Stränge für einen effizienteren Transfer zu spalten. Zur DNA-Denaturierung wurden dann alle DNA-Gele 30 min in alkalischer Denaturierungslösung und anschließend zweimal 15 min in Neutralisationslösung geschwenkt. Nach kurzem Waschen des Gels in 20 x SSC wurde der Blot mit Protran BA 85-Membran (Schleicher & Schüll) analog zum Northern-Blot (siehe 2.20.4.) aufgebaut. Die Fixierung der DNA an die Membran erfolgte durch 2-stündiges Backen bei 80 °C.

2.20.4. Transfer von RNA auf Nylonmembran und anschließende Fixierung (Thomas, 1980)

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der RNA im Northern-Gel (siehe 2.20.2.) wurde die RNA mit Hilfe von Kapillarkräften auf eine Nylonmembran (Hybond-N) übertragen. Das Gel wurde dazu auf zwei Lagen Whatman-Papier gelegt, die mit zwei gegenüberliegenden Enden in ausreichend 20 x SSC ragten. Luftblasenfrei wurde die Hybond-Membran auf das Gel gelegt und darüber zwei weitere Lagen Whatman-Papier in Größe der Membran. Zuletzt folgten viele Lagen Saugpapier und ein Gewicht, das den Stapel zusammendrückte. Beim Aufbau musste darauf geachtet werden, dass die Salzlösung nur durch das Gel und die darüber liegende Membran in das Papier gesaugt werden konnte. Nach dem Transfer wurde die RNA durch UV-Crosslinking an der Membran fixiert. Dazu wurde der Filter von der RNA-Seite her für 3 min mit UV-Licht (LKB-Transilluminator) bestrahlt. Anschließend

wurde die Membran zur weiteren RNA-Fixierung zwischen Filterpapier liegend bei 80 °C 2 h gebacken.

2.20.5. Herstellung einer $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP-markierten Sonde mittels Random-Primer-Labeling und Gelausschlusschromatographie (Feinberg and Vogelstein, 1983)

Die radioaktive Markierungsreaktion wurde mit Hilfe des HexaLabel™ DNA Labeling Kits von Fermentas nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden zunächst kurze Hexanukleotide als Zufalls-Primer an die denaturierte DNA (aufgereinigte PCR-Produkte oder Restriktionsfragmente) angelagert. Diese wurden in 3'-Richtung von Klenow-Polymerase auf 80-200 bp verlängert, wobei einer der 4 Bausteine, dCTP, radioaktiv markiert war.

Zur Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide wurde anschließend eine Gelausschlusschromatographie durchgeführt. Dazu wurde eine 1 ml Spritze vor der Spitze mit einem GF/C-Filter versehen und luftblasenfrei mit 1 ml Sephadex G-50-Säulenmaterial in 1 x TE gefüllt. Der Reaktionsansatz wurde auf diese Säule gegeben und fraktionsweise 10 mal mit 100 μl 1 x TE eluiert. Nach Messung mit dem Geigerzähler konnten die Fraktionen, die das erste Maximum bildeten, vereinigt und als Sonde weiterverwendet werden. Unmittelbar vor Gebrauch wurde die Sonde 5 min bei 95 °C denaturiert.

2.20.6. Hybridisierung und Autoradiographie

Die gebackene Membran wurde zunächst in Hybridisierungspuffer (siehe unten) für 3-5 h bei 65 °C bzw. 42 °C im Schüttelwasserbad vorhybridisiert. Dann wurde der Hybridisierungspuffer erneuert und die denaturierte Sonde (siehe 2.20.5.) zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung durch Blot-Waschlösung ersetzt und die Membran 3-4 mal 20-30 min lang bei 65 °C bzw. 42 °C gewaschen. Wenn die Waschlösung keine Radioaktivität mehr enthielt, wurde die Membran getrocknet, auf trockenes Filterpapier mit der DNA bzw. RNA-Seite nach oben aufgeklebt und in Klarsichtfolie verpackt. Dann wurde ein Röntgenfilm (X-OMAT, Kodak) aufgelegt und, in Abhängigkeit von der Stärke des gemessenen Signals, bis zu 7 Tage bei -70 °C exponiert.

	<u>Southern-Blot</u>	<u>Northern-Blot</u>
Hybridisierungspuffer:	Genomic Blot Puffer	Northern-Hybridisierungspuffer
Hybridisierungstemperatur:	65 °C	42 °C
Blot-Waschtemperatur:	65 °C	42 °C

100 x Denhardt's: 2 % [w/v] BSA Fraktion V, 2 % [w/v] Ficoll 400,
2 % [v/w] PVP 360.000

Heringssperma-DNA, sonifiziert (Biomol):

10 mg/ml wurden in 1 x TE 2-4 h auf dem Magnetrührer gelöst, durch mehrmaliges Aufziehen mit einer Plastikspritze geschert und in Aliquots bei -20 °C gelagert. Vor Gebrauch wurde die DNA 5 min bei 95 °C denaturiert.

Genomic Blot Puffer: 15 ml 4 M NaCl, 10 ml 0,1 M Pipes, pH 6,8,
200 µl 0,5 M EDTA, pH 8,5, 1 ml 10 % [w/v] SDS,
10 ml 100 x Denhardt's, 63,7 ml Aqua dest.,
100 µl denaturierte Heringssperma-DANN

Northern-Hybridisierungspuffer: 50 ml Formamid, 25 ml 20 x SSC,
1 ml 100 x Denhardt's, 1 ml 0,1 M Pipes, pH 6,8,
500 µl denaturierte Heringssperma-DNA

Blot-Waschlösung: 0,1 % [w/v] SDS, 2 x SSC

2.20.7. Denaturierende Protein-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie-Färbung (Laemmli, 1970)

Protein-Proben, die in 1 x SDS-Probenpuffer aufgenommen worden waren, wurden 5 min gekocht und dann auf ein 12 %iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte von der Kathode zur Anode bei einer maximalen Stromstärke von 10 mA (1-1,5 mm Gel-Dicke). Nach dem Gellauf wurde das Gel für einige Stunden in Coomassie-Färbelösung gelegt, bis vor einem blauen Hintergrund tiefblaue Banden sichtbar wurden. Danach wurde das Gel für einige Stunden entfärbt.

2 x SDS-Probenpuffer:	62,5 mM Tris, pH 6,8, 10 % [v/v] Glycerin, 2 % [w/v] SDS, 5 % [v/v] β -ME, 0,1 % [w/v] Bromphenolblau
4 %iges Sammelgel:	3,05 ml Aqua dest., 0,65 ml 30 % Polyacrylamid/ 0,8 % Bisacrylamid (Roth), 1,25 ml 0,5 M Tris, pH 6,8, 50 μ l 10 % [w/v] SDS, 25 μ l 10 % [w/v] APS ¹ , 5 μ l TEMED
12 %iges Trenngel:	4,95 ml Aqua dest., 6 ml 30 % Polyacrylamid/ 0,8 % Bisacrylamid (Roth), 3,75 ml 1 M Tris, pH 8,8, 150 μ l 10 % [w/v] SDS, 150 μ l 10 % [w/v] APS ¹ , 6 μ l TEMED
5 x SDS-Laufpuffer:	15 g/l Tris, 72 g/l Glycin, 5 g/l SDS
Coomassie-Färbelösung:	2,5 g/l Coomassie Brilliant Blue R 250, 500 ml/l Methanol, 70 ml/l Eisessig
Entfärber-Lösung:	500 ml/l Methanol, 70 ml/l Eisessig

2.21. Screening einer genomischen Bank von *Craterostigma plantagineum* im Bakteriophagen-Vektor EMBL 4 λ

Die genomische Bank bestand aus dem Bakteriophagen-Vektor EMBL 4 λ mit sich überlappenden cos-Enden, dessen mittlere Region über Bam HI-Schnittstellen gegen 14-20 kb lange Fragmente genomischer *Craterostigma*-DNA ausgetauscht worden war (Stratagene). Aus dieser Bank sollte ein reiner Phagenklon isoliert werden.

2.21.1. Phageninfektion

5 ml *E. coli* K 803-Übernachtskultur wurden in 100 ml LB-Medium überimpft und bis zu einer OD₆₅₀ = 0,5 angezogen. Nach Zentrifugation (4.000 rpm, 10 min, 4 °C) wurden die Bakterien steril in 5 ml 10 mM MgCl₂ resuspendiert und spätestens am nächsten Tag verwendet.

¹ frisch ansetzen

Infektionsansatz: 200 μ l *E. coli* K 803-Zellen
(in 300 μ l Endvolumen) x μ l Phagenstocklösung (Genomische Bank oder
von gepickten Phagen)
y μ l SM-Phagen-Puffer

Dieser Ansatz wurde 20 min bei RT inkubiert, dann mit 3 ml 40 °C warmem Top-Agar vermischt und auf NZCYM-Platten verteilt. Nach Inkubation bei 37 °C waren die entstandenen Plaques als durchsichtige Punkte in einem konfluent gewachsenen Bakterienrasen zu erkennen.

2.21.2. Plaquelift und Hybridisierung

Um diejenigen Klone zu identifizieren, die die gesuchte DNA enthielten, wurde Nitrocellulosemembran (Protran BA 85 von Schleicher & Schüll, Dassel) auf Plattengröße zurechtgeschnitten, auf der Rückseite markiert und 1 Minute lang auf den gekühlten Top-Agar gelegt. In dieser Zeit konnte auf die Unterseite der Petrischale das individuelle Muster des Filters übertragen werden. Danach wurde der Filter mit der aufgelegten Seite zuoberst nacheinander auf Filterpapiere gelegt, die mit 10 % [w/v] SDS, Denaturierungslösung bzw. Neutralisationslösung angefeuchtet worden waren. Der Zellaufschluss durch das Detergenz SDS dauerte 3 min, DNA-Denaturierung und -Neutralisierung jeweils 5 min. Nach kurzem Waschen in 10 x SSC und anschließendem Trocknen wurde die nun auf dem Filter als Einzelstrang vorliegende DNA durch zweistündiges Backen bei 80 °C fixiert. Die Weiterbehandlung der Filter erfolgte analog zur Southern-Hybridisierung.

2.21.3. Picken von (Einzel-) Plaques

Nach der Entwicklung der Filme wurden die charakteristischen Muster der Filter auf die jeweiligen Filme übertragen. Die Filme wiederum wurden so ausgerichtet, dass sich ihre Muster mit denen auf den entsprechenden Petrischalen zur Deckung bringen ließen. Auf diese Weise konnten Plaques, die die gesuchte DNA enthielten, auf der bewachsenen Platte identifiziert und mit einer Pasteur-Pipette gepickt werden. Während einiger Stunden Inkubation in 500 μ l SM-Phagen-Puffer diffundierten die Phagen aus dem Agar heraus. Die Bakterien wurden anschließend durch Zugabe von 2-3 Tropfen Chloroform abgetötet.

Wenn alle Plaques einer Platte ein Signal auf dem Filter hervorgerufen hatten, war die Phagenstocklösung rein und konnte für die Isolierung der λ -DNA eingesetzt werden. Phagenstocklösung wurde bei 4 °C gelagert.

2.21.4. λ -DNA-Präparation aus Plattenlysat und Klonierung in pUC19

E. coli K 803-Zellen wurden frisch mit reiner Phagenstocklösung infiziert (siehe 2.21.1.). Von den inkubierten Platten wurden mehrmals steril 20 Plaques gepickt und daraus 500 μ l konzentrierte Phagenstocklösung gewonnen. Je 100 μ l davon dienten zur Infektion weiterer *E. coli* K 803 und damit zur Gewinnung von Platten mit hoher Plaquedichte. 15 dieser Platten wurden mit je 4 ml SM-Puffer versetzt und bei 4 °C leicht für 4 h geschüttelt. Das so gewonnene Plattenlysat wurde zur Abtötung der Bakterien mit Chloroform versetzt (2 % [v/v] Endkonzentration), und die λ -DNA darin wurde nach den Angaben des Herstellers mit Hilfe des λ -DNA-Präparationskits (Qiagen) isoliert.

Die isolierte λ -DNA wurde mit Bam HI verdaut, mit Phenol-Chloroform extrahiert und in die Bam HI-Schnittstelle des pUC19-Vektors ligiert. Nach Transformation in kompetente *E. coli* TG-2 wurde eine Blau-Weiß-Selektion durchgeführt und positive Klone mit Hilfe von Kolonie-Hybridisierung auf das Vorhandensein des Sonden-Fragments gescreent.

SM-Phagenpuffer: 1 M Tris, pH 7,5
5,8 g/l NaCl
2,0 g/l MgSO₄ * 7 H₂O
2 % [w/v] Gelatine

2.22. Protein-DNA-Bindungsstudien (EMSAs)

Mit Hilfe von Gelverzögerungs-Assays, auch EMSAs (Electrophoretic Mobility Shift Assays) genannt, kann man untersuchen, ob Proteine an bestimmte DNA-Fragmente binden. Dazu wird die untersuchte DNA radioaktiv markiert und mit Proteinen inkubiert. Anschließend wird der Ansatz im großporigen Acrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wird getrocknet und autoradiographiert. Dort, wo Proteine an die DNA gebunden haben, beobachtet man Banden, die im Vergleich zur freien DNA langsamer durch das Gel gelaufen sind.

2.22.1. Sonden-Herstellung und Aufreinigung

Als Ziel-DNA für Bindungsstudien wurden 86-280 bp lange DNA-Restriktionsfragmente eingesetzt, deren kohäsive Enden durch Klenow-Enzym am 3'-OH-Ende aufgefüllt wurden. Dabei wurde radioaktives dCT³²P eingebaut.

Ansatz für die Markierungsreaktion (20 µl):

- 13 µl Aqua dest.
- 2 µl 10 x Reaktionspuffer
- 1 µl DNA (~100 ng/µl)
- 2 µl 500 µM dNTPs ohne dCTP
- 1 µl dCT³²P
- 1 µl Klenow-Enzym (2 U/µl)

Der Ansatz wurde 1 h bei RT inkubiert und danach mit Hilfe des Nukleotide Removal Kits von Qiagen nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Zum Schluss wurde die Sonde mit 30 µl Puffer EB (Qiagen) eluiert. Die Aktivität der Sonde wurde im Szintillationsmessgerät bestimmt. Dazu wurde 1 µl Sonde auf Hybond-N pipettiert, 5 min bei RT getrocknet und mit Szintillationslösung im ³²P-Kanal gemessen.

2.22.2. Bindereaktion

Die Bindereaktion wurde in der angegebenen Reihenfolge zusammenpipettiert:

- v µl Aqua dest. (Mit Aqua dest. wurde das Endvol. auf 20 µl aufgefüllt.)
- w µl 2 x Bindepuffer (Mit 2 x Bindepuffer wurde das Volumen der Protein-Lösung auf 10 µl aufgefüllt; siehe 2.15.9. und 2.15.11.)
- 2 µl 10 % [w/v] Bromphenolblau-Ls. (wurde nur der freien Probe zugefügt)
- 1-2 µl Poly [dA-dT] · Poly [dA-dT] (0,2-1 µg/µl) (= unspezifischer Kompetitor)
- x µl radioaktiv markierte DNA (Gesamtaktivität von 10.000 -15.000 cpm)
- y µl unmarkierte DNA (Spezifischer Kompetitor wurde in 100- bis 500-fachem Überschuss zugegeben.)
- z µl Protein-Lösung in 2 x Bindepuffer (mit z ≤ 10)

20 µl Gesamtvolumen

Die Reaktion wurde 10 min bei RT inkubiert und danach auf das Gel aufgetragen.

2.22.3. Elektrophorese und Autoradiographie

Das Gel wurde vor dem Probenauftrag mindestens 1 h bei 100 V vorlaufen gelassen. In dieser Zeit wurden die Taschen mehrmals mit Laufpuffer ausgespült. Die Proben wurden bei angelegter Spannung aufgetragen, und der eigentliche Gellauf fand bei

150 V für 3-4 h statt. Anschließend wurde das Gel auf Whatman-Papier transferiert und im Vakuum bei ungefähr 60 °C 1-2 h getrocknet. Zur Autoradiographie wurde über Nacht ein Röntgenfilm aufgelegt.

Gel: 26,1 ml Aqua dest., 10 ml 1 x TAE, 7 ml 50 % [v/v] Glycerin,
6,67 ml 30 % Polyacrylamid/0,8 % Bisacrylamid (Roth),
250 µl 10 % [w/v] APS¹, 50 µl TEMED

Laufpuffer: 0,2 x TAE (für 50 x TAE siehe 2.13.)

2.23. Hefe-One Hybrid-Screening

Ein Hefe-One Hybrid-Screening dient dazu, Proteine zu identifizieren und zu isolieren, die an bestimmte DNA-Sequenzen binden.

2.23.1. Konstruktion einer cDNA-Bibliothek im Vektor pPC 86

Für die Synthese der cDNA-Bibliothek wurden 5 µg Poly(A)⁺-RNA benötigt. Die Craterostigma-Pflanzen dafür waren auf Erde angezogen worden und vor der Präparation (siehe 2.15.2.) 24 h als ganze Pflanzen in einer Glasschale liegend mit halb geöffnetem Deckel sehr langsam getrocknet worden, so dass die Blätter sich nur leicht ledrig anfühlten. Die Konstruktion der cDNA-Bank erfolgte mit Hilfe des GibcoBRL/Invitrogen-Kits „SuperScriptTM Plasmid System with GatewayTM Technology for cDNA Synthesis and Cloning“. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren, mit zwei Ausnahmen: Alle Fällungen wurden für 1 h bei -20 °C durchgeführt und nicht wie angegeben bei RT und ohne Inkubationszeit, weiterhin wurden alle Pellets bei RT getrocknet und nicht bei 37 °C.

Zuerst wurde am Poly(A)⁺-Ende der RNA ein Not I-Adapter angelagert, der für die Reverse Transkriptase Superscript II RT als Starter für die Synthese des ersten cDNA-Stanges diente. Danach wurde die RNA verdaut und im selben Schritt der zweite cDNA-Strang aufgebaut. Im nächsten Schritt wurde ein Sal I-Adapter anligiert. Dann wurde der Not I-Adapter mit Not I restringiert, so dass die cDNA über Sal I und Not I klonierbar war. Der Ansatz wurde anschließend säulenchromatographisch aufgereinigt, die einzelnen Fraktionen tropfenweise aufgefangen und ihr DNA-Gehalt anhand von Szintillationsmessungen bestimmt. Je zweimal drei Aliquots wurden vereinigt und 30-40 ng cDNA davon in den Vektor pPC 86 ligiert (siehe Anhang). Die

¹ frisch ansetzen

Ansätze wurden gefällt, in 10 µl Aqua dest. resuspendiert und je zwei 1,5 µl Aliquots in elektrokompetente *E. coli DH10B* transformiert. Von diesen vier Ansätzen wurden aber nur 0,5 % zur Berechnung der Gesamtzahl an transformierten Zellen ausplattiert. Der Rest wurde in 4 x 200 ml LB_{amp} angeimpft und bei 30 °C und 150 rpm für ca. 14 h inkubiert. Die vier Plasmid-Präparationen erfolgten mit Hilfe des Maxi-Plasmid-Präparationskits von Qiagen.

2.23.2. Transformation von Hefezellen

2.23.2.1. Herstellung kompetenter Hefezellen (Gietz and Woods, 1994; Agatep et al., 1998)

Zwei frische Hefekolonien wurden in 50 ml YPD-Medium angeimpft und etwa 24 h bei 30 °C und 250 rpm angezogen. Die Vorkultur wurde zum Animpfen der Hauptkultur (250 ml frisches YPD-Medium) benutzt, deren Anfangs-OD₆₀₀ bei ca. 0,15 lag. Nach etwa 5 h Wachstum bei 30 °C und 250 rpm erreichte die Hefe-Suspension eine OD₆₀₀ von 0,5. Ein Aliquot davon wurde unter dem Mikroskop untersucht, um bakterielle Kontamination auszuschließen und um festzustellen, ob die Hefezellen 1 bis 2 Knospen aufwiesen. Zwischenzeitlich wurde die restliche Suspension für 5 min bei 2.400 rpm und 20 °C pelletiert. Alle Pellets wurden in 50 ml sterilem Milli-Q-Wasser vereinigt und wieder wie oben zentrifugiert. Die Zellen wurden in 1 ml 1 x LiAc resuspendiert, wieder zentrifugiert, mit 1 x LiAc auf einen Titer von $2 \cdot 10^9$ Zellen/ml eingestellt (OD₆₀₀ = 1 entspricht ungefähr 10^6 Zellen/ml - dies kann jedoch von Linie zu Linie variieren) und sofort zur Transformation verwendet.

2.23.2.2. Hefe-Transformation im kleinen Maßstab (Gietz and Woods, 1994; Agatep et al., 1998)

50 µl Hefe-Suspension wurde kurz abzentrifugiert. Zum Pellet wurden nacheinander dazugegeben (Endvolumen 360 µl):

240 µl 50 % [w/v] PEG 4.000

36 µl 10 x LiAc

50 µl Heringssperma-DNA (2 µg/µl)

33 µl Milli-Q-Wasser

1 µl DNA (entsprechend 100 ng bis 4 µg)

Die Mischung wurde 1 min gevortext, 30 min bei 30 °C inkubiert und 30 min bei 42 °C im Wasserbad (Hitzeschock). Anschließend wurde kurz abzentrifugiert, das

Pellet in 500 µl Milli-Q-Wasser resuspendiert und auf selektivem SC-Minimal-Medium mit 2,5 mM 3-AT ausplattiert. Die Platten wurden bei 30 °C bis zu 7 Tage bebrütet. Zur Kontrolle der Transformationseffizienz wurden 4 µl Suspension in 400 µl Milli-Q-Wasser verdünnt und auf SC-Medium ohne Selektionsmarker und 3-AT ausgestrichen. Nach der folgenden Formel konnte aus der Anzahl der gewachsenen Kolonien die Transformationsrate als transformierte Hefezellen pro µg DNA berechnet werden.

$$\text{Transformationsrate} = \text{Anzahl der Kolonien} * 125 / \text{eingesetzte DNA-Menge } [\mu\text{g}]$$

2.23.2.3. Hefe-Transformation im großen Maßstab (Clontech Matchmaker One Hybrid-System Protocol)

In ein 50 ml Falcon Tube wurde gegeben:

20 µg cDNA-Bank

200 µl hochmolekulare Heringssperma-DNA Typ III (10 µg/µl)

1 ml kompetente Hefezellen, mischen

6 ml PEG/LiAc

Die Mischung wurde 10 sec gevortext und für 30 min bei 30 °C und 250 rpm inkubiert. Um die Zellen für den Hitzeschock durchlässiger zu machen, wurden 700 µl DMSO zugegeben, vorsichtig gemischt und der Ansatz bei 42 °C im Wasserbad für 15 min inkubiert. Dann wurden die Zellen 2 min auf Eis abgekühlt und bei 2.200 rpm 5 min bei RT abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 ml SC ohne Histidin resuspendiert und, auf zwei 50 ml Röhrchen aufgeteilt, 1 h bei 30 °C im Schüttler bei 200 rpm inkubiert. Zum Schluss wurde wieder wie oben beschrieben zentrifugiert, die Zellen in je 3,5 ml 1 x TE resuspendiert und in 500 µl Aliquots auf großen Platten mit selektivem SC-Minimal-Medium mit 3-AT und ohne Leucin, Tryptophan und Histidin ausgestrichen. Wie oben beschrieben wurde auch hier die Transformationseffizienz ermittelt und die Zellen im Brutschrank bei 30 °C bis zu 7 Tage lang inkubiert.

YPD-Medium: 10 g/l Bakto-Hefe-Extrakt, 20 g/l Pepton, pH 5,8,
50 ml/l 40 % [w/v] Glukose-Lösung wurde nach dem Autoklavieren sterilfiltriert zugegeben

10 x TE:	0,1 M Tris, 10 mM EDTA, pH 7,5, autoklaviert
10 x LiAc:	1 M Lithiumacetat, pH 8,4, sterilfiltriert
1 x TE/LiAc:	1 Teil 10 x TE, 1 Teil 10 x LiAc, 8 Teile steriles Aqua dest. Diese Lösung wurde immer frisch angesetzt.
PEG/LiAc:	8 Teile 50 % [w/v] PEG 4.000, sterilfiltriert, 1 Teil 10 x TE, 1 Teil 10 x LiAc

Hochmolekulare Heringssperma DNA Typ III (Sigma):

Die DNA-Fäden wurden 3 h in 1 x TE auf dem Rührer gelöst (10 mg/ml), für 10 min auf 96 °C erhitzt, im Eiswasser abgekühlt und in Aliquots bei -20 °C gelagert. Unmittelbar vor dem Gebrauch wurde ein Aliquot 5 min lang bei 100 °C aufgeköcht und auf Eis wieder abgekühlt.

SC-Medium: 6,7 g/l YNB ohne Aminosäuren (Difco # 291940),
für Platten 15 g/l Selekt Agar
50 ml/l 40 % [w/v] Glukose-Lösung und
100 ml/l 10 x Dropout-Lösung wurden nach dem Autoklavieren
sterilfiltriert zugegeben.

10 x Dropout-Ls.: 400 mg/l Adenin (Sigma A-8626)^{1, 2, 3, 4}
200 mg/l Histidin (Sigma H-8000)^{1, 2, 3}
1000 mg/l Leucin (Sigma L-8000)^{1, 3}
300 mg/l Lysin (Sigma L-5501)^{1, 2, 3, 4}
200 mg/l Tryptophan (Sigma T-0254)^{1, 2}
200 mg/l Uracil (Sigma U-0750)^{1, 2, 3, 4}

1 Bestandteil der 10 x Dropout-Lösung für Hefen ohne Plasmide

2 Bestandteil der 10 x Dropout-Lösung für Hefen mit dem Plasmid pSK 1

3 Bestandteil der 10 x Dropout-Lösung für Hefen mit dem Plasmid pPC 86

4 Bestandteil der 10 x Dropout-Lösung für Hefen mit den Plasmiden pSK 1 und pPC 86

3-AT-Lösung: 1 M 3 Amino-1,2,4-triazol (Sigma A-8056)

3-AT ist ein kompetitiver Inhibitor der His3-Promotoraktivität, der verhindert, dass Hefezellen ohne spezifische Interaktion von cDNA-Fusionsprotein und His3-Promotor wachsen können. 3-AT wurde dem autoklavierten SC-Medium in einer Endkonzentration zwischen 0,5 und 20 mM (je nach Versuch) sterilfiltriert zugegeben.

2.23.3. Plasmid-Präparation aus Hefe

2 ml selektives Medium wurden mit einer Hefe-Kolonie inokuliert und bis zu dichtem Bewuchs angezogen. Die Zellen wurden abzentrifugiert (5.000 rpm, RT, 5 min) und in 200 µl Hefe-Lysis-Puffer resuspendiert. Es wurden eine Spatelspitze mit Säure gewaschene Glaskügelchen (425-600 µm, Sigma G-8772) und 200 µl Phenol: Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) zugefügt. Bei maximaler Geschwindigkeit wurde 2 min gevortext, dann zentrifugiert (14.000 rpm, 10 min, RT). Die DNA im wässrigen Überstand wurde mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5,2, 1 µl Glycogen (Roche) und 2,5 Volumen 100 % Ethanol 30 min bei -70 °C gefällt. Danach wurde die Lösung abzentrifugiert (14.000 rpm, 4 °C, 20 min), das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl 10 mM Tris, pH 8,0 resuspendiert. Von dieser Lösung wurden 1-2 µl für PCR oder *E. coli*-Transformation eingesetzt.

Hefe-Lysis-Puffer: 2 % [v/v] Triton X-100, 1 % [w/v] SDS, 100 mM NaCl,
10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0

2.24. Pflanzentransformation

2.24.1. Stabile Transformation von *Arabidopsis* mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* (Clough and Bent, 1998)

Die Agrobakterien enthalten das binäre Vektorsystem pBIN/pAL 4404 mit pBIN als entschärftem Ti-Plasmid. Zwischen den Border-Sequenzen befinden sich dort anstelle der ursprünglichen parasitären Gene die zu transformierende Fremd-DNA und NPTII als bakterielles Kanamycin-Resistenzgen unter der Kontrolle eines Pflanzenpromotors. pAL 4404 fungiert als Helferplasmid, ohne das die Fremd-DNA nicht in die Pflanzenzelle eingeschleust werden kann. Es handelt sich hierbei ebenfalls um ein abgewandeltes Ti-Plasmid ohne Border-Sequenzen und zu

inserterende DNA, aber mit vir-Region. Treffen die Bakterien auf verletzte Pflanzenzellen, werden die Virulenzgene der vir-Region auf dem Helferplasmid exprimiert. Als Folge davon werden die Fremd-DNA und der Selektionsmarker, das NPTII-Gen, aus dem pBIN-Plasmid ausgeschnitten, in den Kern der Pflanzenzelle transferiert und dort unspezifisch ins Genom integriert.

2.24.1.1. Transformation und Suche nach erfolgreich transformierten Samen

Eine Agrobakterien-Kolonie wurde in 3 ml YEB_{Kan}-Medium angeimpft und bei 28 °C über Nacht im Schüttler angezogen. Diese Vorkultur wurde in 250 ml frisches YEB_{Kan}-Medium gegeben und bis zu einer OD₅₆₀ = 0,5 angezogen. Die Suspension wurde in ein 500 ml Becherglas überführt, mit 250 µl des Detergenz Silwet L-77 (Crompton N.V. - OSI Specialties, Antwerpen, Belgien) versehen und auf einem Magnetrührer gut gemischt. Die verwendeten Arabidopsis-Pflanzen waren gut gewässert und besaßen viele Infloreszenzen mit noch verschlossenen, jungen Blüten. Sämtliche Schoten waren am Vortag der Transformation entfernt worden. Für die Transformation wurden die Arabidopsis-Infloreszenzen für 10-15 sec in die Agrobaktériensuspension getaucht („Floral dip“). Danach wurden die Pflanzen für 24 h mit einer Plastikhaube abgedeckt, gut gewässert und bis zur Samenreife kultiviert.

Die reifen Samen wurden unter selektiven Bedingungen angezogen. Dazu wurden sie sterilisiert, zuerst für 2 min in 70 % Ethanol und danach für 30 min in Samen-Sterilisierlösung. Danach wurden die Samen 3-4 mal mit sterilem Aqua dest. gespült, auf sterilem Filterpapier verteilt und mit einer Pinzette auf MS-H_{Kan}-Medium ausplattiert. Nach drei Tagen Vernalisation im Kühlraum bei 4 °C wurden die Platten unter Langtag-Bedingungen bei 22 °C angezogen. Aus erfolgreich transformierten Samen wuchsen Kanamycin-resistente grüne Pflanzen heran, die, wenn der Platz in der Petrischale zu eng wurde, auf Erde umgesetzt wurden. Ihre Samen wurden ebenfalls gesammelt.

Samen-Sterilisierlösung: 7 % [w/v] NaOCl, 0,1 % [w/v] SDS

2.24.1.2. Qualitative und quantitative GUS-Assays von Arabidopsis (Jefferson, 1987; Gallagher, 1992)

Da das Reporterenzym β -D-Glucuronidase mehrere unterschiedliche Substrate verarbeiten kann, wurden zwei Tests, deren Reaktionsmechanismen in Abb. 7 dargestellt sind, durchgeführt.

Zur Induktion der Promotoraktivität wurden die Arabidopsis-Pflanzen zuerst vorbehandelt. Ein Teil der Pflanzen wurde in einer abgedeckten Petrischale angetrocknet, Keimlinge nur für 6-8 Stunden, größere Pflanzen für 14 Stunden. Andere Pflanzen wurden 24 Stunden in ABA-Lösung (10^{-4} M ABA in sterilem

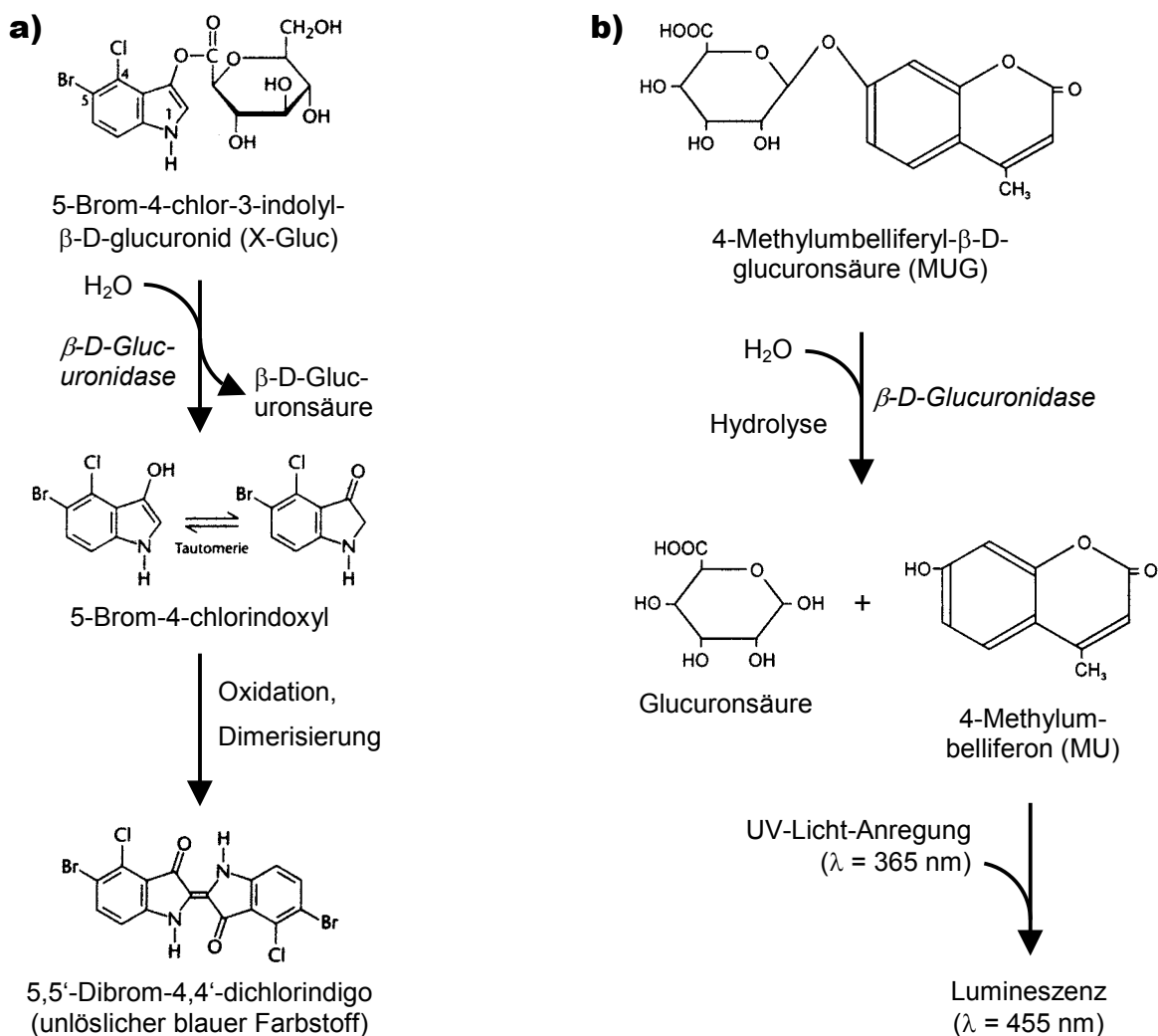


Abb. 7: Reaktionsmechanismen von GUS-Enzym-Assays

a) Optischer GUS-Nachweis mit dem Substrat X-Gluc (nach Stasburger, 2002)

b) Fluorometrischer GUS-Nachweis mit dem Substrat MUG (nach www.elmex.co.jp/elmex/elmex_e/products/kit/XM.pdf)

Leitungswasser) oder in sterilem Leitungswasser inkubiert. Dann erfolgte entweder eine GUS-Färbung mit X-Gluc als Substrat, oder die Proben wurden bei -70 °C eingefroren und für einen fluorometrischen GUS-Test mit dem Substrat MUG gesammelt.

GUS-Assay mit X-Gluc als Substrat

Die vorbehandelten Pflanzen wurden auf Filterpapier getrocknet und über Nacht bei 37 °C in GUS-Färbelösung inkubiert. Am nächsten Morgen erfolgte die Entfärbung mit vergälltem EtOH bei 80 °C. Sobald das Chlorophyll herausgelöst worden war, wurden die Proben kurz in 10 % [v/v] Glycerin gewaschen, auf eine Overhead-Projektor-Folie gelegt und eingescannt.

GUS-Assay mit MUG als Substrat

5 bis 10 vorbehandelte Arabidopsis-Keimlinge oder eine etwa 3 Wochen alte Pflanze wurden mit 200 µl GUS-Extraktionspuffer und etwas Quarzsand mit einem Glasmörser fein zermahlen. Die Proben wurde dann 5 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Vom Überstand wurden 10 µl entnommen und zusammen mit 62 µl GUS-Extraktionspuffer und 8 µl 10 mM MUG bei 37 °C inkubiert. Nach 1 h wurde die Reaktion mit 920 µl 0,2 M Natriumcarbonat-Lösung abgestoppt und im Fluorometer gemessen. Dabei wurde mit UV-Licht der Wellenlänge $\lambda_1 = 365$ nm angeregt, während die MU-Fluoreszenz bei einer Emissionswellenlänge von $\lambda_2 = 455$ nm bestimmt wurde. Falls die Messung zu hohe Werte ergab, wurde die Lösung mit 0,2 M Natriumcarbonat-Lösung verdünnt und die Messung wiederholt. Zur späteren Berechnung der GUS-Aktivität wurden außerdem 5 µl des Überstandes nach der Zentrifugation auf ihren Proteingehalt hin untersucht (Bradford-Protein-Assay, siehe 2.16.2.). Die GUS-Aktivität wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{GUS-Aktivität [pmol MU : min : } \mu\text{g Protein]} = F * 1000 : (4,83 * 60 * P)$$

mit **F** = abgelesene Zahl am Fluorometer, hochgerechnet auf unverdünnten Ansatz
und **P** = µg Protein der Probe

Die erforderliche Eichmessung mit dem Reaktionsprodukt MU zur Ermittlung der Berechnungskonstanten wurde im Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in

Köln durchgeführt, und die daraus resultierenden Ergebnisse sind in der Formel berücksichtigt (Xin Deng, persönliche Mitteilung).

GUS-Extraktionspuffer: 50 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7,0
 0,1 % [v/v] Triton X-100
 1 mM EDTA
 10 mM β -Mercaptoethanol (frisch zugeben)

2.24.2. Transiente Transformation von Craterostigma-Blättern mittels Particle Gun Bombardment (Rasco-Gaunt et al., 1999)

Mit Hilfe einer Gen-Kanone, deren Prinzip in Abb. 8 beschrieben ist, werden kleine mit DNA beladene Goldpartikel in die obersten Zellschichten von Pflanzengewebe geschossen. Gelangt die DNA in den Kern der Zelle, können die eingebrachten Gene exprimiert werden.

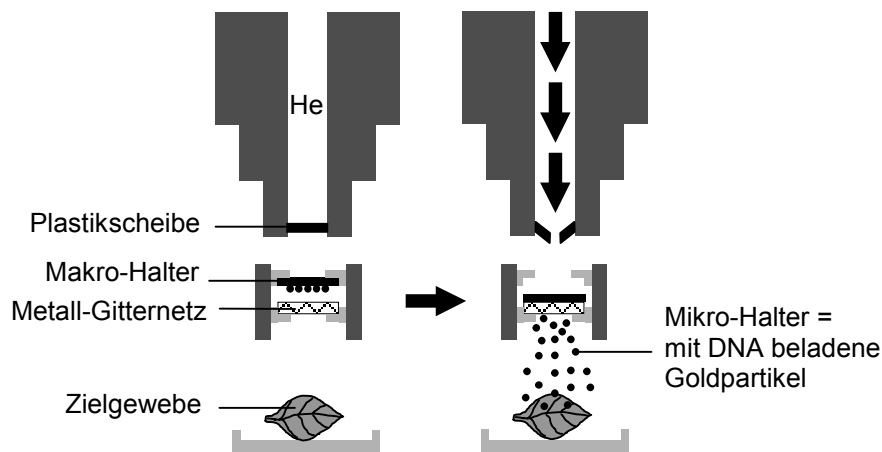


Abb. 8: Prinzip der Gen-Kanone

Heliumgas bringt eine Plastikscheibe bei einem definierten Druck zum Bersten. Dadurch wird der Makro-Halter, auf dem DNA-beladene Goldpartikel sitzen, gegen ein Metall-Gitternetz beschleunigt. Die Mikro-Halter lösen sich vom Makro-Halter und dringen in die obersten Schichten des pflanzlichen Zielgewebes ein.

Vorbehandlung des Goldes

60 mg 1,6 μ m Goldpartikel wurden in 1 ml 100 % EtOH zweimal hintereinander je 2 min gevortext und 1 min sonifiziert. Dadurch sollten die verklumpten

Goldkügelchen voneinander getrennt werden. Anschließend wurde die Suspension für 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert und das Gold in 1 ml Aqua dest. resuspendiert. Danach wurde wieder zentrifugiert und in 1 ml 50 % [v/v] Glycerin resuspendiert. In 50 µl Portionen aliquotiert, wurde das vorbehandelte Gold nun für maximal 2 Monate im Kühlschrank aufbewahrt.

Vorbereitung der Hilfsmittel und Bindung der DNA an das Gold

Vor dem Bombardment wurden die Hilfsmittel folgendermaßen in einer Sterilbank vorbereitet. Metall-Gitter, Makro-Halter und die Halterungen für die Makro-Halter wurden in 70 % EtOH sterilisiert. Die Plastikscheiben wurden kurz in Isopropanol sterilisiert. Dann wurde alles im Luftzug auf Filterpapier getrocknet.

Ein 50 µl-Goldaliquot wurde gevortext und nacheinander bei fortlaufendem Vortexen mit den folgenden Lösungen versehen:

4 µl Plasmid-DNA (1 µg/µl)

50 µl 2,5 M CaCl₂

20 µl 100 mM Spermidin (vor Gebrauch frisch in H₂O ansetzen; Sigma S-0266)

Das Vortexen wurde 3 min lang auf höchster Stufe fortgesetzt. Dann wurde das Gold nur sehr kurz abzentrifugiert, damit sich keine Klumpen bildeten, und in 250 µl 100 % EtOH gewaschen (vortexen). Wieder wurde sehr kurz zentrifugiert und das Gold in 80 µl 100 % EtOH aufgenommen. Nun musste diese Suspension innerhalb von 15 min auf Makro-Halter geladen werden. Dazu wurden während des Vortexens 10 µl-Aliquots mit einer gelben Spitze entnommen und senkrecht in die Mitte von Makro-Haltern pipettiert. Das Ethanol als Trägerflüssigkeit verdunstete im Luftzug.

Bombardment und Inkubation der Blätter

Für das Bombardment von Craterostigma-Blättern wurden 1350 psi Plastikscheiben in der Gen-Kanone befestigt. Dann wurden ein Metall-Gitternetz und ein beladener Makro-Halter in die Maschine eingesetzt. Die Blätter wurden flach, mit der Blattoberseite nach oben, in eine Petrischale gelegt und 6 cm unterhalb von Metall-Gitter und Makro-Halter positioniert. Es wurde ein Unterdruck von 27 mm Hg-Säule in der Schießkammer aufgebaut. Anschließend wurde ein Helium-Überdruck in der Zuleitung zur Kammer erzeugt, so dass die eingespannte Plastikscheibe bei ihrem Soll-Druck von 1350 psi zerbrechen konnte. Der Unterdruck in der Kammer wurde wieder ausgeglichen und das beschossene Blatt entnommen. Die Blätter wurden nun in kleine Petrischalen mit Deckel gelegt, die für den Trockenstress-Test entweder leer waren oder zur Untersuchung der ABA-Induzierbarkeit mit 10⁻³ M ABA-Lösung in

autoklaviertem Leitungswasser gefüllt waren oder zur Kontrolle nur autoklaviertes Leitungswasser enthielten. Die Inkubation erfolgte über Nacht im Dunkeln bei RT.

Nachweis der Expression des GUS-Reportergens in Craterostigma-Blättern durch X-Gluc-Färbung

Am nächsten Morgen nach dem Beschießen wurden die Blätter kurz mit Handtuchpapier trocken getupft und in X-Gluc-Färbelösung gelegt. Die getrockneten Blätter saugten sich selbständig mit der Lösung voll. Die in Wasser oder ABA-Lösung inkubierten Blätter wurden in ihren Schalen in einen Exsikkator gelegt, um dort die X-Gluc-Färbelösung durch Vakuum-Infiltration in die Blätter zu saugen. Alle Proben wurden anschließend für 18-20 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Zur Extraktion des Chlorophylls aus den Blättern wurde danach die X-Gluc-Färbelösung gegen vergälltes EtOH ausgetauscht. Die Blätter wurden so lange bei 80 °C entfärbt, bis sie weiß waren. Dabei wurde die 70 %ige EtOH-Lösung mehrmals gewechselt. Die GUS-Expression wurde als indigoblaue Färbung (siehe Abb. 7) auf der Blattoberseite sichtbar. Zum Schluss wurden die Blätter in 10 % [v/v] Glycerin gelegt, und die Anzahl der Signale wurde unter dem Binokular ermittelt.

2.25. Subzelluläre Lokalisierung von GFP-Fusionsproteinen in *Craterostigma plantagineum*

Zum Nachweis der subzellulären Lokalisation von Proteinen wurden ihre cDNAs im GFP-Leseraster oberhalb der Reporter-cDNA in den Vektor pCK-GFP-S65C kloniert. Dann wurde dieses Plasmid mit Hilfe der Particle Gun in die Zellen der oberen Epidermis von *Craterostigma*-Blättern geschossen (siehe 2.24.2.) und die Blätter über Nacht in Leitungswasser inkubiert. Nach Anregung mit 488 nm-Licht wurden die Zellen unter dem Laser-Scanning-Mikroskop betrachtet. In zwei voneinander getrennten Kanälen wurde dann das grüne Fluoreszenzlicht (530 nm) des überexprimierten GFP-Fusionsproteins und die rote Autofluoreszenz der Chloroplasten (590 nm) gespeichert. Mit Hilfe von Adobe Photoshop 5.0 konnten die Daten von rotem und grünem Kanal wieder zu einem Bild kombiniert werden.

3. Ergebnisse

3.1. Isolierung des C2-Gens aus einer genomischen Bibliothek von *Craterostigma plantagineum*

Um den Promotor des C2-Gens zu analysieren, musste dieser zuerst aus einer genomischen Bank isoliert werden. Diese bestand aus 14-20 kb langen Fragmenten genomischer *Craterostigma*-DNA, die über Bam HI-Schnittstellen in den Bakteriophagen-Vektor EMBL 4 λ kloniert worden waren (Stratagene).

3.1.1. Die Sequenz des C2-Leserasters dient als Sonde für das Screening der genomischen Bank

Als Sonde für die Isolierung eines genomischen C2-Klons wurde ein cDNA-Fragment verwendet, das sich über das gesamte C2-Leseraster erstreckte. Dazu wurde das C2 cDNA-Insert zunächst mit Eco RI und Xho I aus dem Vektor pcC C2 (Ditzer, 1999) ausgeschnitten. Im zweiten Schritt folgte dann ein Rsa I-Verdau, mit dem die C2 cDNA in drei Fragmente zerteilt wurde. Das längste Fragment (372 bp) wurde als Sonde eingesetzt. Die Sequenz ist im Anhang aufgeführt.

3.1.2. Screening der genomischen Bank und Klonierung des C2-Promotors

Nach drei Screening-Durchgängen konnten von zwei verschiedenen λ -Klonen konzentrierte Phagenstocklösungen gewonnen werden. Daraus wurden die λ -DNAs isoliert und mit Bam HI verdaut. Die Fragmente wurden in die Bam HI-Schnittstelle des pUC19-Vektors ligiert und in kompetente *E. coli* TG-2 transformiert. Mit Hilfe der Blau-Weiß-Selektion ließen sich positiv transformierte Bakterien erkennen. Positive Klone wurden durch Kolonie-Hybridisierung identifiziert. Klon B30 lieferte ein starkes Hybridisierungssignal. Dieser Klon enthielt ein etwa 5,9 kb großes Insert. Zur Erstellung einer Restriktionskarte und zur Lokalisation der Promotorsequenz wurden verschiedene Verdauungen durchgeführt. Dazu wurde der B30-Vektor mit Bam HI, Eco RI, Eco RV, Hind III, Pst I, Sal I, Sma I, Sph I, Xba I und Xho I einzeln oder in Kombination geschnitten. Zum Teil wurden die erhaltenen Banden geblottet und mit der C2-Sonde hybridisiert. Wie in Abb. 9, Teil a dargestellt ist, konnte die Position des C2-Leserasters im pB30-Plasmid zwischen zwei Eco RI-Schnittstellen lokalisiert werden. Im zweiten Schritt wurde ein etwa 2,3 kb großes Xba I-Fragment mit dem

C2-Leseraster ausgeschnitten und in die Xba I-Schnittstelle von pUC19 subkloniert. Das erhaltene Konstrukt pC2X5 ist in Abb. 9, Teil b dargestellt. Das C2X5-Insert wurde dann mit den Primern pUC Forward, pUC Reverse und C2X5-prom sequenziert. Die Sequenz ist in Abb. 10 aufgeführt. Sie beinhaltet das C2-Leseraster, aus dem sich das C2-Protein ableiten lässt.

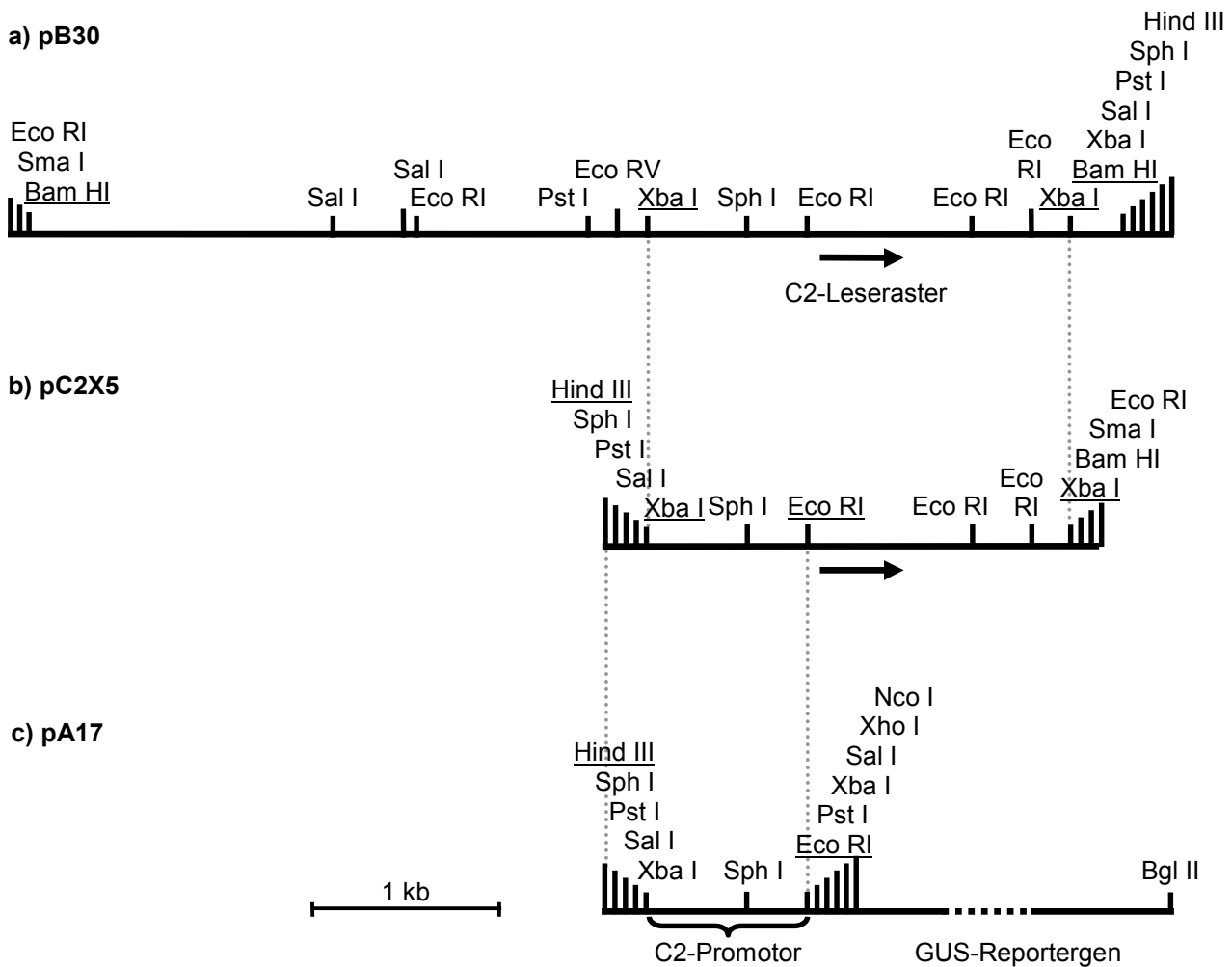


Abb. 9: Klonierung des C2-Promotors

a) pB30: Ein etwa 5,9 kb großes Fragment, in dem das C2-Leseraster enthalten war, wurde aus einer genomischen Bank isoliert und über Bam HI in pUC19 kloniert. Anhand von Restriktionsverdau und anschließenden Southern-Analysen mit der C2-Sonde, konnte die Position des C2-Leserasters (Pfeil) ermittelt werden.

b) pC2X5: Das markierte Xba I-Fragment wurde in pUC19 subkloniert und sequenziert.

c) pA17: Der C2-Promotor wurde mit Hind III und Eco RI aus dem Vektor pC2X5 ausgeschnitten und in pBT10gus vor das GUS-Reportergen kloniert.

Die unterstrichenen Restriktionsschnittstellen dienen zur Klonierung.

Das Leseraster besteht aus zwei Exons, die durch ein 97 bp langes Intron unterbrochen werden. Stromaufwärts des Startcodons sind 840 bp Promotorsequenz isoliert worden. Um die Aktivität des Promotors charakterisieren zu können, wurde er im dritten Klonierungsschritt mit dem Reporter gen β -Glucuronidase fusioniert. Dazu wurden 820 bp der Promotorsequenz mit Hind III und Eco RI aus dem Konstrukt pC2X5 ausgeschnitten und in den Vektor pBT10gus kloniert (siehe Abb. 9, Teil c). Der erhaltene Vektor pA17 diente dann auch als Ausgangskonstrukt für weitere Subklonierungen des C2-Promotors.

Abb. 10 (auf Seite 72): Genomische C2-Sequenz im Vektor pC2X5

In pC2X5 sind etwa 2,3 kb genomische C2-Sequenz subkloniert. Das 336 bp lange C2-Leseraster, aus dem sich das 111 Aminosäuren lange LEA-Protein C2 ableiten lässt, ist unterstrichen. Potentielle regulatorische Motive im C2-Promotor sind dunkel unterlegt. Restriktionsschnittstellen sind doppelt unterstrichen.

Xba I						
5'-	<u>TCTAGAT</u> TTTT	ATAAAAAATG	GTCCTTTAAA	CAATTGTTGT	TTTTGTGACA	TGATCTAAAC 60
						Sac I
	TCTATTT CAC	ACCTG TCATT	AATGGATTGG	TTGTCATGCT	TTGGATAATG	CTTGAGCTCA 120
	AG TC AATTGG	AGAATGTTCA	CTCCTAATTA	AAGTTCGAGA	GCAAGCAAAT	TTAATTGAAT 180
	GTAAAAATCT	TTGGGGACAA	AAAGGAGTGA	CATAGTTAGA	GTATAT AAGT	GTGTTGAAGA 240
	C TACACTCAA	AAAA AAGTGT	GTTGAAGACA	AAACCAAATT	TATTAATTTA	GTACATATAC 300
	CTTGCAGTTG	CAATTATATT	TATGCAATTT	ACTCTCGTAT	TGGCAATTGA	AGTTCCTTAA 360
	ACTCCCTTAG	CCAATTCCCC	TTCATTACTC	TT AAATAAAA	ATAAAAAAAA	AACAATAAAT 420
	CAA A CT TGAA	AAGAGAGAGA	AAACAAACCA	TCAATGCATC	TTGATCATCA	ACACGTAT GC 480
	ATCATATGTA	TATCATATAT	TATAATAAAA	TGCAAATAAG	T CACGTATTT	TATTGTATAC 540
						Sph I
	CGTATCAACA	A TGGTAAAGA	AATACTTTTT	TTCCCTTCTA	TTCTTG CATG	CGTGGC GTCT 600
	CAATAATTGT	AAAGAAAGCA	AATGCAATGG	ATAAAAGACA	CATAAGAGGC	CCGCGTGGCT 660
	TCTCCTCCCT	TCTTAACCGC	CTCAATGAAC	CAGACCGTCA	CACGTA CATA	TAGATAGTAT 720
	CTATCTCTAT	ACAA ATATAT	ATATATATAT	AT GCCATTTA	CGCCCATCGA	ATTGCATTAC 780
						Eco RI
	TCAAACCTTA	TATTTTCAGTA	AAAGATATAA	GACCG GAATTC	G AAAAAAAAA	G AAAAAGAAA 840
	M Q T A K Q	K V S D	A A A	S A Q	Q N V D	
	A ATGCAGACG	GCGAAACAGA	AAGTGAGCGA	CGCGGCGGCT	TCAGCTCAGC	AGAACGTCGA 900
	K V R A K A	Q E K				
	TAAAGTTCGA	GCCAAAGCCC	AAGAAAAGGT	AATATTTTTT	AATCTAATTT	AGAGATCTTC 960
	ATATTATATG	TGAACTATTG	GGAGTCAACA	TATTGAAATG	TTTGTGACGC	TTTTAACGTA 1020
	M E K T D	A R T	S E E K	E M A	H E R	
	AATAGATGGA	GAAAACCGAT	GCGAGGACAT	CAGAAGAGAA	AGAAATGGCC	CACGAGCGTA 1080
	K E I S E A E	A K M	K K H E	S K A	Q N V	
	AGGAGATTAG	CGAAGCCGAA	GCTAAGATGA	AGAAGCACGA	ATCCAAGGCA	CAAAACGTGG 1140
	D K K A H S H	Q Q P	P L G A	E A P	P T E	
	ATAAGAAGGC	CCACAGCCAC	CAGCAGCCGC	CGCTTGGTGC	GGAGGCGCCG	CCCCTGAGG 1200
	G G V T P T P	S P A	A G G Q	Y P G	G A G	
	GTGGCGTTAC	CCCTACTCCT	AGTCCGGCGG	CCGGTGGTCA	GTATCCTGGT	GGTGCTGGGA 1260
						Rsa I
	S H V M *					
	GTCATGTGAT	GTGATTTGTT	TAGTACGTTT	TATAATCAGT	TCGCCTTTCC	ATGTATCTGT 1320
	GATTTTAAAT	TTGATGTTTT	TTGTGTGCCT	ATGTCTTGTG	GACAGTTTAT	ATGGTTTATA 1380
	TATGGGATGG	ATTTCTTGAG	AAAAACGACC	ATAGTCTAAA	ATATTGGCTC	AAAATGGCCC 1440
	TCGTTTTTTTT	TTAAGATTCA	ATGATAAAAA	TCAAAAACAA	ATCAAATTCG	TTCAAAAAGA 1500
	CACAATTAGA	CGACGTCGTC	CAACAACGAC	AAACAGCCAA	TGCAAGTCTA	ATTCTAATCC 1560
	CATAAATCAA	ACATAAAAAG	AAAAAGAAAA	AAACAAACCC	ACCTCCAATA	CACACAACAT 1620
	TAGGGTCGCA	ATCGAGTCGA	ATGCCGTAAT	ATTCTATTTG	TATTCGGATG	ACAATCGAAT 1680
						Eco RI
	ACGAATACTC	AAATACTTAA	TCGGATCATA	AAATCGATTC	TTATTC GAAT	TCGAATATTT 1740
	TTTCGAATAT	TCGAATCGAA	TATTATATTC	AAAGTCATCT	TTCATTTTTT	ATTTAATAAAA 1800
	ATATAAATAA	TATTATTTTT	AAAATTTATA	TTGAATTATA	ATAAATTATA	TTTAAATATA 1860
	TATTGAATTA	TAACATATTA	TTTTTAATGT	TTTAGTGAGT	TACCATATAT	TATATGTGAA 1920
	TATATATTTA	TTATACTATA	TCTTATGTTA	TATTATTCGA	AGCGAATAAT	TCGATTATTT 1980
	TCGAATCGAA	TGTTGTGATT	TCATATTCGC	ATTTCGTATAT	TTCTCGAATT	AAAAATAATA 2040
						Eco RI
	TTTTTATTCG	GATTCGTATT	CTAAATATTC	GAATTCGAAT	CTTAAAATTT	CGAATCGAAC 2100
	GCAAATCGAA	CAAAAAAGT	TCGATTCGTT	TGCAACCCTG	CACAACATCG	AAAGAAGCCC 2160
	GGAAACAGCT	TTAAACTAAT	AAACCACATT	GATTACCTTC	GATAAATTCG	ATCTCTTTCT 2240
						Xba I
	TCAAGAATCG	AGTCCAAAAG	TCTCAATCAA	ATCAACGTCC	<u>TTCTAGA</u> -3'	2300

3.1.3. Der C2-Promotor enthält mehrere potentielle cis-regulatorische Elemente

Innerhalb der 840 bp langen C2-Promotorsequenz befinden sich mehrere auffällige Motive, die bei der Expression des C2-Gens regulatorisch wirksam sein könnten. Besonders ins Auge fällt eine Region, die 140 und 370 bp stromaufwärts des Translationsstarts liegt. Darin befinden sich fünf potentielle ABA-Response-Elemente (ABRE) und ein HDZip-Bindemotiv. Außerdem fallen zwei palindromische Sequenzen auf, von denen eine zwischen den mutmaßlichen ABRE liegt. Die andere palindromische Sequenz besitzt eine starke Ähnlichkeit mit der Bindestelle des bZip-Proteins Opaque-2 aus Mais. In Tabelle 2 sind alle auffälligen Motive zusammengefasst.

3.1.4. Der Promotor des homologen LEA-Gens aus *Arabidopsis thaliana* ist anders aufgebaut als der C2-Promotor

Da homologe Proteine gleiche Funktionen haben können und möglicherweise auch gleichartig reguliert werden, wurde die genomische Sequenz des C2-homologen Proteins aus *Arabidopsis* ermittelt. Dazu wurde eine PSI-Blast-Analyse mit der abgeleiteten C2-Proteinsequenz durchgeführt. An erster Stelle der homologen Proteine stand das putative LEA-Protein Le25-Homolog aus *Arabidopsis*. Anhand der cDNA-Sequenz und mit Hilfe der *Arabidopsis*-Datenbank konnte die genomische Sequenz auf Chromosom 1 ermittelt werden. Sie ist in Abb. 11 aufgeführt. Beim Vergleich der beiden Proteinsequenzen fällt auf, dass 39 % der C2-Aminosäuren identisch sind mit der abgeleiteten Sequenz des homologen *Arabidopsis*-Proteins. Weiterhin besitzen beide Proteine ein Intron, das an der gleichen Stelle liegt. In der Le25-homologen Promotorregion fallen besonders zwei Motive auf, die etwa 150 bp und 190 bp stromaufwärts des Translationsstarts liegen. Sie haben große Ähnlichkeit mit den beiden Non-ACGT-ABRE im C2-Promotor, die dort etwa 190 bp und 250 bp oberhalb des Translationsstarts positioniert sind (siehe Tab. 2). Außerdem findet man noch zwei ACGT-Elemente. Eines davon weist den gleichen Abstand zum Translationsstart auf wie ein potentielles ACGT-ABRE im C2-Promotor. Neben diesen Übereinstimmungen fehlen andere im C2-Promotor vorhandene Motive, wie zum Beispiel die HDZip-Bindestelle. Somit gibt es zwar Ähnlichkeiten aber keine exakten Entsprechungen zwischen den beiden Promotoren.

Tabelle 2: Auffällige und potentiell regulatorisch wirksame Motive im C2-Promotor und Vergleich mit Promotor-Motiven des homologen Arabidopsis-Gens

Position im C2-Promotor [bp]	C2-Sequenz	Beschreibung und mögliche Funktion	Literatur	Position im homologen <i>A. th.</i> -Promotor	<i>A. th.</i> -Sequenz
69-75	ACACCTG	Konsensus-Bindestelle des LEA-Gen-Dc3-Promotor-Bindefaktors DPBF, eines bZip-Proteins aus der Sonnenblume (ACACNNG)	1	471-477	ACACGTG
111-122	←→ CTTGAGCTCAAG	Palindromische Sequenz, sehr ähnlich der Bindestelle des bZip-Proteins Opaque-2 aus Mais (TGACTCA)	2	-	-
227-241 und 255-269	AAGTGTGT TGAAGAC	15 bp Wiederholung	-	-	-
393-424	AAATAAAAATA AAAAAAAAACA ATAAATCAAA	A-reiche Sequenz	-	-	-
472-478 und 522-528 und 701-706	CACGTAT und CACGTAT und CACGTA	Hybrid aus G- und A-Box; Potentielle ACGT-haltige ABA-Response-Elemente (ACGT-ABRE)	3 4 5	81-85 und 472-476	CACGT und CACGT
530-551	←←← TTATTGTATACC →→→ GTATCAACAA	Palindromische Sequenz	-	-	-
587-596 und 650-659	CATGCGTGGC und CCCGCGTGGC	Sph-Box; Potentielle ABA-Response-Elemente ohne ACGT (Non-ACGT-ABRE)	4 6 7	411-420 und 451-460	TCTACGTGGC und GACACGTGGC
601-609	←→ CAATAATTG	Bindestelle für HDZip-Transkriptionsfaktoren	8 9 10	-	-
735-752	(AT) ₉	9 AT-Wiederholungen	-	-	-
822-841	AAAAAAAAAAG AAAAAGAAAA	A-reiche Sequenz unmittelbar vor dem Translationsstart	-	576-599	AAACAGAA AACTAAAG AAAAAAA

Die Positionsangaben beziehen sich auf die Sequenzen in Abb. 10 und Abb. 11. Pfeile markieren palindromische Sequenzen. Die Zahlen in der Literaturspalte bedeuten:

1: Kim et al., 1997

6: Hobo et al., 1999a

2: Uno et al., 2000

7: Hattori et al., 1995

3: Izawa et al., 1993

8: Sessa et al., 1997

4: Martinez-Garcia et al., 1998

9: Johannesson et al., 2001

5: Williams et al., 1992

10: Deng et al., 2002

GAACAGTGAC	TTTGTGCGAA	GGAACAACCA	ACGATCCTCT	ATCTGATGGA	GTGGAAACTT	60													
CTACAGGAAT	CCGGAACTCA	<u>CACGTCGCAG</u>	TCGTAGCTCC	TCGACGGAAA	TTCGTAATAT	120													
ATCTCCGATT	AATCGGAAAA	TTCTTCTTCT	GAAGCGAAGT	ACAAAATGTA	CAGGGCAAAA	180													
TCAGAGCCAT	AGTTTTGGAG	GATTTTGATT	TTCGCGGCTT	TTACTAGTCG	AGAGGTTGAA	240													
GAAGATAAGA	GAGTGTTTCT	GAGAAAAGAG	ACCAATCAAC	CATTCCTACTG	CTAAATCATA	300													
AACCGGAAAT	ACAAACCAAA	AACTTTTCCG	GTTTACAAAA	TTCGGCCAAT	TAAACCACCA	360													
AAATCCGGTA	GAGGCGGTGC	GTGGATATCA	GATTAGGCCA	GCGAAGCATC	<u>TCTACGTGGC</u>	420													
AACTAGATAG	AAAGCTGGGA	ATTGAAACAA	<u>GACACGTGGC</u>	GACATTAATA	<u>ACACGTGGAA</u>	480													
TTAATGTGAC	CCATTTGGAC	CGACGAAGCC	ATGCATACAT	TTCCTTATTT	AAATCGAATA	540													
AGAATCATTC	AAGAGTAATT	AGTTAGAGTT	TAGAGAAACA	GAAAACATAA	GAAAAAAAT	600													
<u>M</u>	<u>Q</u>	S	<u>A</u>	<u>K</u>	<u>Q</u>	<u>K</u>	I	<u>S</u>	<u>D</u>	M	<u>A</u>	S	T	<u>A</u>	K	E	K	M	V
<u>ATGCAATCGG</u>	<u>CGAAACAGAA</u>	<u>GATAAGCGAT</u>	<u>ATGGCTAGTA</u>	<u>CAGCCAAGGA</u>	<u>GAAGATGGTG</u>	660													
I	C	Q	<u>A</u>	<u>K</u>	<u>A</u>	D	<u>E</u>	<u>K</u>											
<u>ATATGTCAAG</u>	<u>CAAAAGCTGA</u>	<u>TGAGAAGGTT</u>	CTAAATTTAG	AATTATGCTA	ATGATTTTCGT	720													
TTAACATCAT	TGATATGATT	AAATAGTTAT	GGATTGTTTG	ATTGATTCAA	ATATTAATGA	780													
	A	<u>E</u>	R	A	M	<u>A</u>	<u>R</u>	<u>T</u>	K	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>K</u>	<u>E</u>	I	<u>A</u>	<u>H</u>	<u>Q</u>	<u>R</u>	
<u>CGTGCAGGCA</u>	<u>GAGCGGGCGA</u>	<u>TGGCGAGGAC</u>	<u>GAAAGAGGAG</u>	<u>AAAGAGATAG</u>	<u>CGCACCAACG</u>	840													
R	K	A	K	<u>E</u>	<u>A</u>	<u>E</u>	<u>A</u>	<u>N</u>	<u>M</u>	D	M	<u>H</u>	M	A	<u>K</u>	<u>A</u>	A	H	A
<u>GAGAAAGGCG</u>	<u>AAGGAAGCAG</u>	<u>AAGCGAATAT</u>	<u>GGATATGCAC</u>	<u>ATGGCTAAAG</u>	<u>CGGCTCATGC</u>	900													
E	D	<u>K</u>	L	M	A	K	<u>Q</u>	S	H	Y	H	V	T	D	H	G	<u>P</u>	H	V
<u>GGAAGACAAG</u>	<u>CTTATGGCTA</u>	<u>AGCAATCTCA</u>	<u>CTACCATGTT</u>	<u>ACTGATCATG</u>	<u>GTCCCCACGT</u>	960													
P	Q	Q	A	<u>P</u>	V	<u>P</u>	<u>A</u>	<u>P</u>	<u>A</u>	P	V	M	G	H	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>
<u>GCCTCAACAA</u>	<u>GCGCCTGTAC</u>	<u>CGGCTCCCGC</u>	<u>ACCGGTTATG</u>	<u>GGACACGGTT</u>	<u>ACGGGCATAA</u>	1020													
<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>
<u>TCCTACCGGA</u>	<u>GTTACCTCAG</u>	<u>TGCCCTCCTCA</u>	<u>GACCTATCAT</u>	<u>CCGACTTATC</u>	<u>CTCCGACGGG</u>	1080													
H	H	N	H	<u>H</u>	H	Y	*												
<u>ACATCATAAT</u>	<u>CATCATCACT</u>	<u>ACTAATCCGA</u>	CCTACTATCT	TTTTAAAATA	AAAAAAAATA	1140													
ACCTGATTAT	ACGTGTGGGG	CCTTTAGTGG	TTTTCTTAGT	TCTTAGGCAT	GTGCTTAAAA	1200													
TTAAGTGATT	AAGCGTTGAG	TTGATGTTTG	CAACTTTGCG	TACACGTTTG	TTGATAAATA	1260													
TTTTGGTTAT	TCC																		

Abb. 11: Genomische Sequenz des Le25-homologen LEA-Gens aus *Arabidopsis thaliana* und die daraus abgeleitete Proteinsequenz (Accession X89505, Gen-Locus At1g32560)

In der Promotorregion sind Motive, die putativen ABRE des C2-Promotors ähneln, doppelt unterstrichen. Das Leseraster ist einfach unterstrichen. Die mit C2 identischen Aminosäuren sind schwarz unterlegt. Der grau unterlegte Proteinbereich fehlt bei C2.

3.1.5. Der C2-Promotor ist durch Trockenstress und ABA induzierbar

Um die Expression des C2-Promotors mit Promotor::GUS-Konstrukten zu charakterisieren, wurden zwei verschiedene Pflanzensysteme gewählt. Das homologe System *Craterostigma plantagineum* wurde mit Hilfe von Bombardment-Experimenten transient transformiert, während das heterologe System *Arabidopsis thaliana* mit Hilfe von Agrobakterien stabil transformiert wurde. Im ersten Schritt wurde zunächst die Expression des originalen 820 bp langen C2-Promotors untersucht. Diese Ergebnisse sind in den Abschnitten 3.1.5.1. und 3.1.5.2. dargestellt. Um im nächsten Schritt wichtige regulatorische Motive im C2-Promotor zu identifizieren, wurden dann veränderte Versionen des C2-Promotors untersucht. Diese Ergebnisse folgen im Kapitel 3.2.

3.1.5.1. Bombardment-Experimente mit *Craterostigma*-Blättern

Um die Induzierbarkeit des C2-Promotors in *Craterostigma plantagineum* bei Trockenstress und ABA-Induktion zu untersuchen, wurde die Technik des Particle Gun Bombardments eingesetzt. Dazu mussten zunächst die optimalen Bombardment-Parameter ermittelt werden. Als Test-Konstrukt diente p6-19::GUS. Es wurden die folgenden Versuchsparameter in unterschiedlichen Kombinationen getestet, wobei sich die in Fettdruck dargestellten Parameter am Ende der Testphase als die beste Kombination erwiesen.

- Gasdruck: 900 psi, 1100 psi, **1350 psi**, 1550 psi, 1800 psi
- Zieldistanz: 3 cm, **6 cm**, 9 cm, 12 cm
- Golddurchmesser: 1,0 µm, **1,6 µm**
- Blatorientierung: **Beschuss der Oberseite**, Beschuss der Unterseite
- Alter der Pflanzen: **junge Pflanzen (mit 10-12 Blättern)**, ältere Pflanzen (mit mehr als 12 Blättern)
- Alter der Blätter: **junge innere Blätter, mittelalte Blätter (mitte-innen)**, mittelalte Blätter (mitte-außen), alte äußere Blätter
- Austrocknung: **langsames Austrocknen in einer geschlossenen Petrischale**, schnelles Austrocknen im Luftzug der Sterilbank

Zur Untersuchung des C2-Promotors wurden *Craterostigma*-Blätter mit dem Plasmid pA17 (820 bp C2-Promotor::GUS) beschossen und anschließend über Nacht entweder ausgetrocknet, in ABA-Lösung inkubiert oder zur Kontrolle in steriles

Leitungswasser gelegt (siehe 2.24.2. im Material und Methoden-Teil). Nach der GUS-Färbung wurden dort, wo das Reporter-gen exprimiert worden war, türkisfarbene Signale in den Blättern sichtbar. Wie in Abb. 12 zu sehen ist, lässt sich die Induktion des C2-Promotors im ausgetrockneten und im ABA-behandelten Blatt nachweisen. Dabei bewirkt Trockenstress eine wesentlich stärkere Induktion als ABA-Behandlung. In der H₂O-Kontrolle wird der Promotor erwartungsgemäß nicht induziert.

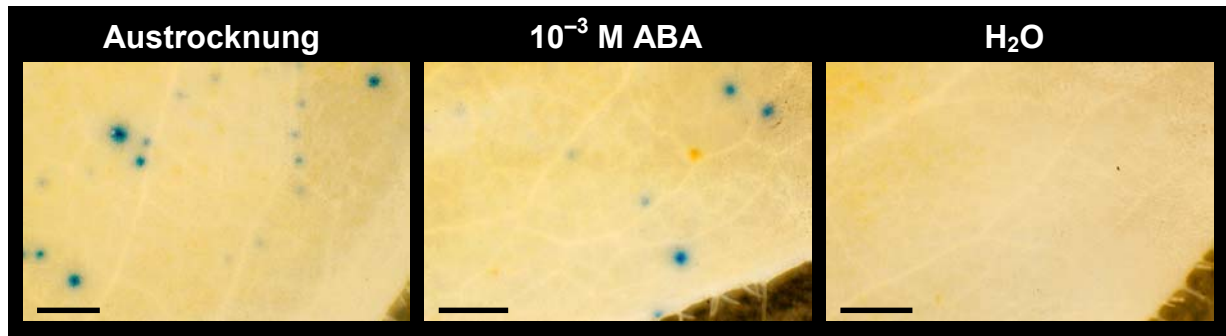


Abb. 12: Particle Gun Bombardment zum Nachweis der C2-Promotor-Aktivität bei Trockenstress- und ABA-Induktion

Blätter von *Craterostigma plantagineum* wurden mit dem Plasmid pA17 (C2-Promotor::GUS) beschossen (siehe Einzelheiten in Material und Methoden).

Die Größenbalken entsprechen jeweils 1 mm.

3.1.5.2. In transgenen Arabidopsis-Pflanzen wird der C2-Promotor nach Trockenstress und ABA-Behandlung induziert

Parallel zur Untersuchung der C2-Expression in transient transformierten *Craterostigma*-Blättern anhand von Particle Gun Bombardments erfolgte auch eine Charakterisierung des C2-Promotors in stabil transformierten *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen. Dazu wurde das C2-Promotor::GUS-Insert mit Hind III und Bgl II aus dem Plasmid pA17 ausgeschnitten und über Hind III und Bam HI in die multiple Klonierungsstelle des pBIN-Vektors kloniert (siehe Vektorkarte im Anhang). Dann wurden Wildtyp-Pflanzen (Ökotyp Col 0) mit Hilfe der „Floral Dip“-Methode mit diesem Konstrukt transformiert und ihre Samen auf MS-H_{Kan}-Medium ausplattiert, um erfolgreich transformierte Pflanzen zu selektieren. Insgesamt konnten vier transformierte Pflanzen gefunden werden. Diese Pflanzen wurden auf Erde umgesetzt und bis zur Samenreife angezogen. Die Samen wurden gesammelt und wieder auf MS-H_{Kan}-Medium ausplattiert.

Im Alter von 19 Tagen wurden die Pflanzen zur weiteren Anzucht auf Erde umgesetzt. Zum Nachweis der erfolgreichen Transformation wurde aus diesen F1-Pflanzen genomische DNA präpariert und in zwei getrennten Ansätzen mit Hind III bzw. Eco RI verdaut, geblottet und mit dem 820 bp langen C2-Promotorfragment des pA17-Plasmids hybridisiert (siehe das Hind III/Eco RI-Promotorfragment in pA17 in Abb. 9, Teil c). Die C2-Promotorsequenz ließ sich, im Gegensatz zur Wildtyp-Kontrolle, in allen vier transgenen Linien nachweisen.

Die Untersuchung der C2-Promotoraktivität erfolgte mit 11 Tage alten, 19 Tage alten und 5½ Wochen alten transgenen Arabidopsis-Pflanzen. Als Vorbehandlung wurden die Pflanzen entweder ausgetrocknet oder in ABA-Lösung bzw. in Leitungswasser inkubiert. Anschließend folgte eine GUS-Färbung zum Nachweis der C2-Promotoraktivität. Dabei zeigte sich, dass das GUS-Reportergen in 11 Tage alten Keimlingen konstitutiv in der gesamten Pflanze exprimiert wird. In 19 Tage alten Jungpflanzen findet nur noch eine schwache konstitutive Expression statt. Dafür lässt sich eine starke Trockenstress- und ABA-induzierte Expression in der gesamten Pflanze beobachten. In adulten Pflanzen nimmt das Niveau der Expression insgesamt ab. Die konstitutive Expression ist nur noch sehr gering und auf die Blattansätze begrenzt. Aber auch in diesen Pflanzen bewirken Austrocknung und ABA-Behandlung noch eine eindeutig nachweisbare Induktion der Promotoraktivität, insbesondere in jungen Blättern, aber auch in den Blüten und in den Wurzeln. Die transgenen Pflanzen sind in Abb. 13 dargestellt.

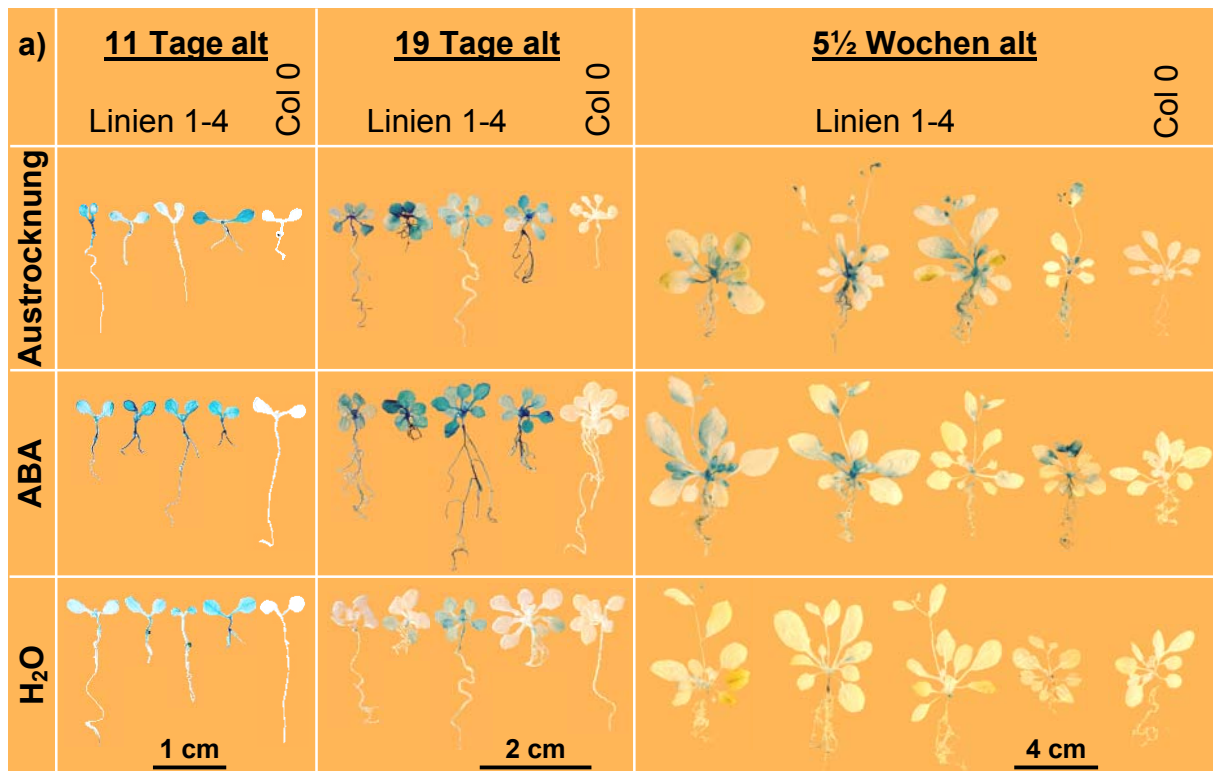


Abb. 13: Aktivität des C2-Promotors in vier unabhängigen transgenen Arabidopsis-Linien (C2-Promotor::GUS aus pA17)

Transgene Arabidopsis-Pflanzen wurden zunächst auf MS-H_{kan}-Medium angezogen. Zur Induktion der Promotoraktivität wurden sie dann durch Austrocknung oder Inkubation in ABA-Lösung oder Wasser vorbehandelt. Anschließend folgte eine GUS-Färbung.

a) Übersicht

- b-d) Vergrößerungen: b) Linie 4, 7 Tage alt, H₂O
 c) Linie 1, 19 Tage alt, ABA
 d) Linie 3, 5½ Wochen alt, getrocknet

3.2. Ein 76 bp langes Fragment des C2-Promotors spielt eine Rolle bei der Trockenstress- und ABA-abhängigen Expression des C2-Gens

3.2.1. Zur Identifizierung von Promotorelementen, die die Trockenstress- und ABA-abhängige Expression regulieren, wurden verschiedene C2-Promotorregionen mit dem Reporter gen β -Glucuronidase (GUS) fusioniert

Um die Aktivität des C2-Promotors zu testen, war dieser im Vektor pBT10gus mit dem Reporter gen β -Glucuronidase (GUS) fusioniert worden. Dieses pA17-Plasmid diente dann als Ausgangskonstrukt für die Erstellung weiterer C2-Promotor::GUS-Konstrukte. Zunächst wurde eine 5'-Deletionsreihe konstruiert, bei der der C2-Promotor sukzessiv am 5'-Ende verkürzt wurde. Weiterhin wurden verschiedene C2-Promotor-Fragmente aus dem Promotor isoliert, zum Teil mutagenisiert und über Hind III und Sal I gerichtet vor den CaMV 35S-Minimalpromotor und das GUS-Reporter gen in den Vektor pK373 kloniert. Ausgehend vom pA17-Konstrukt wurden außerdem gezielt vier Motive im 820 bp langen C2-Promotor mutagenisiert (Mutagenese-Reihe). In Tabelle 3 werden die Eigenschaften und der Bau der einzelnen Konstrukte detailliert beschrieben. In Abbildung 14 sind alle Konstrukte graphisch dargestellt. Der Nachweis einer korrekten Klonierung erfolgte jeweils durch Sequenzierung. Dabei wurden die Fragmente im pBT10gus-Vektor mit dem Primer GUS-Start und die Sequenzen im pK373-Vektor mit dem pGEM-Primer SP6 sequenziert. Die Bindestellen der beiden Primer sind auf den Vektorkarten im Anhang angegeben. Bei den Mutagenese-Konstrukten wurde der Nachweis anhand von Restriktionsverdau geführt, da durch die Mutagenesen entweder eine Restriktionsschnittstelle neu eingeführt oder eine vorhandene Restriktionsschnittstelle zerstört worden war.

Tabelle 3: Konstruktionsbeschreibungen und Mutagenesen der C2-Promotor::GUS-Konstrukte

End-konstrukt	Position im C2-Promotor (Insertlänge) [bp]	Ausgangskonstrukt	Konstruktion	Mutagenese
C2-5'-Deletionskonstrukte				
p648 C2	167 – 820 (654)	pC2X5	PCR mit den Primern C2-Fragment 1-Hind und C2-Extension (Primer liegt im C2-Leseraster in Richtung des Startcodons), Hind III/Eco RI-Restriktion des PCR-Produkts und Ligation in den Vektor pBT10gus	keine
p517 C2	298 – 820 (523)	pC2X5	PCR mit den Primern C2-Fragment 2-Hind und C2-Extension (Primer liegt im C2-Leseraster in Richtung des Startcodons), Hind III/Eco RI-Restriktion des PCR-Produkts und Ligation in den Vektor pBT10gus	keine
p352 C2	463 – 820 (358)	pC2X5	PCR mit den Primern C2-ACGT-Hind III und C2-Extension (Primer liegt im C2-Leseraster in Richtung des Startcodons), Hind III/Eco RI-Restriktion des PCR-Produkts und Ligation in den Vektor pBT10gus	keine
pA17-Sph	586 – 820 (235)	pA17	Subklonierung des Sph I-Fragments aus pA17 in den Vektor pBT10gus	keine
pA17-Pst	662 – 820 (159)	pA17-Sph pA17	PCR von pA17-Sph mit Primern C2-prom150 und GUS-rev, Pst I/Eco RI-Verdau des PCR-Produkts; Ausschneiden des C2-Promotors mit Pst I und Eco RI aus pA17 und Ligation des verdauten PCR-Produkts in den leeren pA17-Vektor	keine
Isolierte C2-Promotorfragmente				
p119 C2	562 – 686 (125)	pA17	PCR mit den Primern C2promHind III und C2promSal I, Hind III/Sal I-Verdau des Produkts und Ligation in den Vektor pK373	keine
p86-1	580 – 667 (88)	pA17	PCR mit den Primern C2-prom-Hind-Help und C2-prom-Sal-Help, Hind III/Sal I-Verdau des Produkts und Ligation in den Vektor pK373	keine
p86-2	580 – 667 (88)	pA17	PCR mit dem PCR-Produkt von p86-1 als Vorlage und den Primern C2-ZIP+ABRE-Hind und C2-ZIP+ABRE-Sal, Hind III/Sal I-Verdau des Produkts und Ligation in den Vektor pK373	d, h
p86-3	580 – 667 (88)	pA17	Erste PCR mit pA17 als Vorlage und den Primern C2-ZIP-Muta1 und C2-prom-Sal-Help, zweite PCR mit dem ersten PCR-Produkt als Vorlage und den Primern C2-ZIP-Muta2-Hind und C2-prom-Sal-Help, dritte PCR mit dem zweiten PCR-Produkt als Vorlage und den Primern C2-prom-Hind-Help und C2-prom-Sal-Help, Hind III/Sal I-Verdau des dritten PCR-Produkts und Ligation in den Vektor pK373	f

p86-4	580 – 667 (88)	pA17	Alle drei PCR-Stufen wie bei Konstrukt p86-3, vierte PCR mit dem dritten PCR-Produkt von p86-3 als Vorlage und den Primern C2-ZIP+ABRE-Hind und C2-ZIP+ABRE-Sal, Hind III/Sal I-Verdau des vierten PCR-Produkts und Ligation in den Vektor pK373	d, f, h
p203 C2	463 – 667 (205)	pA17	pA17-PCR mit den Primern C2-ACGT-Hind III und C2-prom-Sal-Help, Hind III/Sal I-Verdau des Produkts und Ligation in den Vektor pK373	keine
p152-1	463 – 540 (78) und 586 – 667 (82)	pA17 p86-1	pA17-PCR mit den Primern C2-ACGT-Hind III und C2-ACGT-Sph I, Hind III/Sph I-Verdau des Produkts; Isolierung des C2-Inserts aus p86-1 mit Sph I und Sal I; gleichzeitige Ligation der beiden Fragmente über Hind III und Sal I in den Vektor pK373	Deletion von 541 bis 585
p152-2	463 – 540 (78) und 586 – 667 (82)	pA17 p86-1	Erste PCR mit dem PCR-Produkt von Konstrukt p152-1 und den Primern C2-Muta-ACGT-Hind und C2-Muta1-ACGT-Sph, zweite PCR mit dem ersten PCR-Produkt als Vorlage und den Primern C2-Muta-ACGT-Hind und C2-Muta2-ACGT-Sph, Hind III/Sph I-Verdau des Produkts; Isolierung des C2-Inserts aus p86-1 mit Sph I und Sal I; gleichzeitige Ligation der beiden Fragmente über Hind III und Sal I in den Vektor pK373	Deletion von 541 bis 585 und a, b
p166 C2	298 – 465 (168)	pA17	pA17-PCR mit den Primern C2-Fragment2-Hind und C2-Fragment2-Sal, Hind III/Sal I-Verdau des Produkts und Ligation in den Vektor pK373	keine
p240-1	580 – 667 (88) und 662 – 820 (159)	p86-1 pC2X5	Hind III/Sal I-Restriktion des C2-Promotor-Fragments aus dem Vektor p86-1; pC2X5-PCR mit dem Primern C2-SALhelp-andersrum und C2-Extension (Primer liegt im C2-Leseraster), Sal I/Eco RI-Verdau des Produkts; gleichzeitige Ligation beider Fragmente über Hind III und Eco RI in den Vektor pBT10gus	Sal I- Schnitt- stelle zwischen den Frag- menten
p240-2	580 – 667 (88) und 662 – 820 (159)	p86-2 C2X5	Hind III/Sal I-Restriktion des C2-Promotor-Fragments aus dem Vektor p86-2; pC2X5-PCR mit dem Primern C2-SALhelp-andersrum und C2-Extension, Sal I/Eco RI-Verdau des Produkts; gleichzeitige Ligation beider Fragmente über Hind III und Eco RI in den Vektor pBT10gus	Sal I- Schnitt- stelle zw. den Frag- menten, d, h
p240-3	580 – 667 (88) und 662 – 820 (159)	p86-3 pC2X5	Hind III/Sal I-Restriktion des C2-Promotor-Fragments aus dem Vektor p86-3; pC2X5-PCR mit dem Primern C2-SALhelp-andersrum und C2-Extension, Sal I/Eco RI-Verdau des Produkts; gleichzeitige Ligation beider Fragmente über Hind III und Eco RI in den Vektor pBT10gus	Sal I- Schnitt- stelle zw. den Frag- menten, f
p240-4	580 – 667 (88) und 662 – 820 (159)	p86-4 pC2X5	Hind III/Sal I-Restriktion des C2-Promotor-Fragments aus dem Vektor p86-4; pC2X5-PCR mit dem Primern C2-SALhelp-andersrum und C2-Extension, Sal I/Eco RI-Verdau des Produkts; gleichzeitige Ligation beider Fragmente über Hind III und Eco RI in den Vektor pBT10gus	Sal I- Schnitt- stelle zw. den Frag- menten, d, f, h

820 bp C2-Mutagenese-Konstrukte				
pA17-Sal	1 – 820 (820)	pC2X5, pA17	pC2X5-PCR mit den Primern PUC-rev-Hind und C2-loop-rev und Hind III/Sal I-Restriktion des Produkts; pA17-PCR mit den Primern C2-loop-for und GUS-Start und Sal I/Eco RI-Restriktion des Produkts; gleichzeitige Ligation der beiden restringierten Fragmente über Hind III und Eco RI in pBT10gus	c
pB	1 – 820 (820)	pA17-Sal	Site-Directed Mutagenesis mit den Primern HDZIPfor(strata) und HDZIPrev(strata)	c, g
pA	1 – 820 (820)	pA17-Sal	Site-Directed Mutagenesis mit den Primern ABRE1for(strata) und ABRE1rev(strata)	c, e
pE	1 – 820 (820)	pA	Site-Directed Mutagenesis mit den Primern ABRE2for(strata) und ABRE2rev(strata)	c, e, i
pH	1 – 820 (820)	pE	Site-Directed Mutagenesis mit den Primern ABRE1+HDZIP(strata)for und ABRE1+HDZIP(strata)rev	c, e, g, i
pD	1 – 820 (820)	pA17	Site-Directed Mutagenesis mit den Primern HDZIPfor(strata) und HDZIPrev(strata)	g
pC	1 – 820 (820)	pA17	Site-Directed Mutagenesis mit den Primern ABRE1for(strata) und ABRE1rev(strata)	e
pF	1 – 820 (820)	pC	Site-Directed Mutagenesis mit den Primern ABRE2for(strata) und ABRE2rev(strata)	e, i
pG	1 – 820 (820)	pF	Site-Directed Mutagenesis mit den Primern ABRE1+HDZIP(strata)for und ABRE1+HDZIP(strata)rev	e, g, i

Die Konstruktionen der Plasmide erfolgte entweder über Subklonierung restringierter Fragmente, über (Mutagenese-) PCR oder durch Site-Directed Mutagenesis. Mit Hilfe von bis zu vierstufigen (Mutagenese-) PCRs und Site-Directed Mutagenesis wurden die folgenden Mutagenesen eingeführt:

a) ACGT-ABRE (472 – 478) CAC **GTAT** → CAT **AGAT**

b) ACGT-ABRE (522 – 528) CAC **GTAT** → CAT **AGAT**

c) Palindromische Sequenz (530 – 551) $\overleftarrow{\text{T}}\text{TATTGT}\overleftarrow{\text{A}}\text{ATAC C } \overrightarrow{\text{G}}\text{ATCAACAA} \overrightarrow{\text{A}}$
→ TCAATGT**CGAC** C ATATCTACAA, neue Sal I-Schnittstelle

d) Non-ACGT-ABRE (587 – 596) CATGC **GTGGC** → CATA**C** ATTGC, Sph I-Schnittstelle zerstört

e) Non-ACGT-ABRE (587 – 596) CATGC **GTGGC** → CAT**CC** CT**CGC**, Sph I-Schnittstelle zerstört

f) HDZip (601 – 609) $\overleftarrow{\text{C}}\text{AAT } \overrightarrow{\text{A}} \overrightarrow{\text{ATTG}}$ → CAAT **C** AT**GA**

g) HDZip (601 – 609) $\overleftarrow{\text{C}}\text{AAT } \overrightarrow{\text{A}} \overrightarrow{\text{ATTG}}$ → CGAT A **TCTG**, neue Eco RV-Schnittstelle

h) Non-ACGT-ABRE (650 – 659) CCCGC **GTGGC** → CCC**AC** ATTGC

i) Non-ACGT-ABRE (650 – 659) CCCGC **GTGGC** → CCC**GA** G**CTCC**, neue Sac I-Schnittstelle

Alle angegebenen Positionen beziehen sich auf die C2-Promotorsequenz in Abb. 10. Die fett gedruckten Nukleotide wurden verändert. Die Pfeile über den Motiven markieren palindromische Sequenzen.

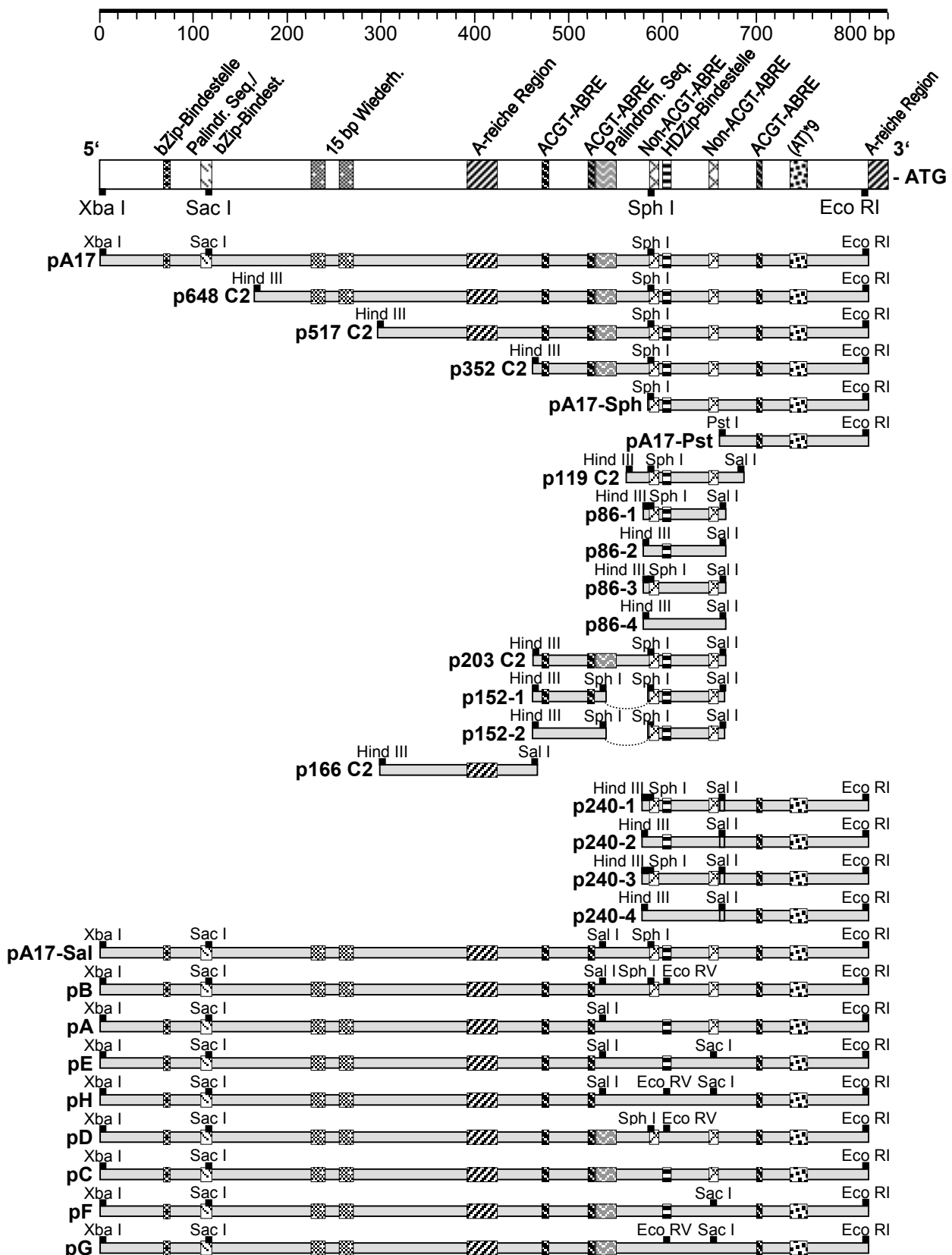


Abb. 14: Übersicht über die C2-Promotor::GUS-Konstrukte in den Vektoren pBT10gus und pK373

Die Promotor-Fragmente von p119 C2, p86-1, p86-2, p86-3, p86-4, p203 C2, p152-1, p152-2, p166 C2, p240-1, p240-2, p240-3 und p240-4 sind jeweils in den Vektor pK373 kloniert worden, der zusätzlich den CaMV 35S-Minimalpromotor enthält. Alle anderen Konstrukte liegen in pBT10gus vor.

3.2.2. Bombardments von Craterostigma-Blättern zeigen, dass eine 76 bp lange Promotorregion mit zwei ABRE und einem HDZip-Bindemotiv essentiell ist für die Expression des C2-Gens bei Trockenstress und ABA-Induktion

Um die Aktivität des C2-Promotors im homologen System *Craterostigma plantagineum* zu charakterisieren, wurden einzelne Zellen transient durch Beschuss transformiert.

3.2.2.1. Bombardments mit Konstrukten der 5'-Deletionsreihe

Nachdem geeignete Bombardment-Parameter ausgetestet worden waren, folgten ballistische Experimente mit modifizierten C2-Promotor::GUS-Konstrukten. Zunächst wurde eine 5'-Deletionsreihe getestet, wobei vom pA17-Konstrukt ausgehend bis hin zum pA17-Pst-Konstrukt sukzessiv am 5'-Ende jeweils 70 bis 170 bp deletiert worden waren. Die beschossenen *Craterostigma*-Blätter wurden zur Induktion der GUS-Reporterexpression anschließend entweder langsam ausgetrocknet oder in ABA-Lösung bzw. zur Kontrolle in Leitungswasser inkubiert. Anschließend wurde die GUS-Expression enzymatisch durch die Umwandlung des Substrats X-Gluc in einen türkisfarbenen unlöslichen Farbstoff nachgewiesen. Wie in Abb. 15 dargestellt ist, beobachtet man nach ABA-Behandlung bei allen Konstrukten der Deletionsreihe, mit Ausnahme von pA17-Pst, eine gleichmäßig schwache Induzierbarkeit des Reportergens. Austrocknung führt ebenfalls zur Induktion aller getesteten Promotor-Fragmente, auch hier mit pA17-Pst als Ausnahme. Bei diesem Konstrukt kann somit weder durch ABA-Behandlung noch durch Trockenstress eine Expression des Reportergens induziert werden. Während jedoch ABA bei allen Konstrukten, von pA17 bis hin zu pA17-Sph, zu einer fast gleichmäßig starken Expression führt, beobachtet man nach Austrocknung, dass die Stärke der Expression abnimmt, je kürzer der Promotor wird. Insbesondere die Deletion einer Promotorregion, die zwei ACGT-ABRE sowie eine palindromische Sequenz beinhaltet und die bei pA17-Sph im Gegensatz zu p352 C2 fehlt, scheint einen Einfluss auf die Stärke der C2-Promotor-Aktivität zu haben. Die 3'-benachbarte Region, in der sich zwei Non-ACGT-ABRE und ein HDZip-Bindemotiv befinden, ist dagegen sogar essentiell für die Induzierbarkeit des C2-Promotors bei Trockenstress und nach ABA-Behandlung.

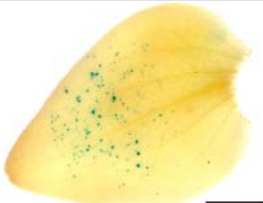





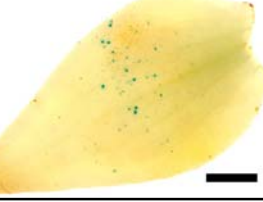
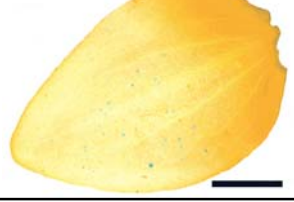
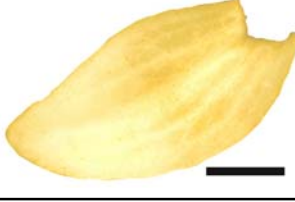
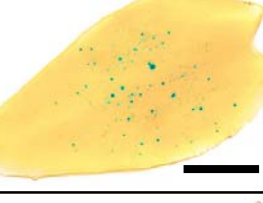
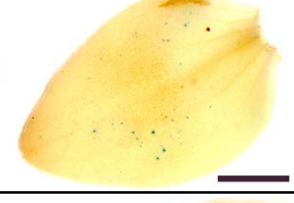




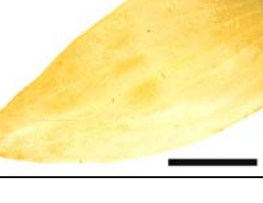


	Austrocknung	ABA	H ₂ O	1	2	3
pA17				+	+	-
p648 C2				+	+	-
p517 C2				+	+	-
p352 C2				+	+	-
pA17-Sph				+	+	-
pA17-Pst				-	-	-

Abb. 15: Bombardments von *Craterostigma*-Blättern mit den C2-Promotor::GUS-Konstrukten der 5'-Deletionsreihe

Blätter von *Craterostigma plantagineum* wurden mit pA17 und p648 C2, p517 C2, p352 C2, pA17-Sph sowie pA17-Pst, den Konstrukten der 5'-Deletionsreihe (siehe Tab. 3 und Abb. 14), beschossen. Anschließend wurden die Blätter austrocknet bzw. in ABA-Lösung oder in Leitungswasser inkubiert. Anhand einer GUS-Färbung wurde die Expression des GUS-Reportergens nachgewiesen. Die angegebenen Größenbalken stehen jeweils für 5 mm. In der Tabelle rechts ist eine Abschätzung der relativen Expressionsstärken aufgelistet. Die Zahlen bedeuten: 1) Austrocknung, 2) ABA-Behandlung und 3) H₂O-Kontrolle.

3.2.2.2. Bombardments mit Konstrukten aus isolierten C2-Promotorfragmenten

Für die nächsten Bombardment-Versuche wurden dann gezielt die Promotorbereiche, die potentielle cis-regulatorische Elemente enthalten, vor den CaMV 35S-Minimalpromotor und das GUS-Reportergen kloniert. So entstanden die Konstrukte p203 C2, p119 C2, p86-1, p86-2, p86-3, p86-4, p152-1, p152-2, p166 C2, p240-1, p240-2, p240-3 und p240-4 (siehe dazu Tab. 3 und Abb. 14). Mit diesen Konstrukten wurden weitere ballistische Versuche durchgeführt. Bombardments mit den Konstrukten p240-1, p203 C2, p119 C2 und p152-1 ergaben die stärksten Signale, wobei die Werte von Konstrukt p240-1 ungefähr denen von pA17-Sph entsprachen. p203 C2, p119 C2 und p152-1 lieferten schwächere Signale. Die Transformation mit den Konstrukten p86-1, p152-2, p166 C2, p240-3 und p240-4 führte zu keiner GUS-Expression. Mit p86-2, p86-3, p86-4 sowie p240-2 wurden keine Bombardments mehr durchgeführt. Insgesamt betrachtet konnte mit isolierten Bereichen des C2-Promotors nur eine geringe GUS-Expression erzielt werden.

3.2.2.3. Bombardments mit Konstrukten der Mutagenesereihe

Im nächsten Schritt wurden gezielt vier potentiell regulatorisch wirksame Motive im C2-Promotor einzeln oder in Kombination mutagenisiert, ohne dabei die gesamte Sequenzumgebung zu verändern. Auf diese Weise entstanden die Konstrukte pA17-Sal, pD, pF und pH der Mutagenesereihe (siehe Tab. 3 und Abb. 14). Die Bombardment-Ergebnisse dieser Konstrukte sind in Abb. 16 dargestellt. Hier wird deutlich, dass die palindromische Sequenz, die im pA17-Sal-Konstrukt mutagenisiert ist, bei Trockenstress keinen Einfluss auf die Promotoraktivität hat. Nach ABA-Behandlung scheinen die pA17-Sal-Signale jedoch etwas stärker auszufallen als bei pA17, so dass dieses Promotorelement möglicherweise eine ABA-abhängige Silencer-Funktion innehat. Bombardments mit dem pD-Konstrukt, bei dem das HDZip-Motiv mutagenisiert vorliegt, fallen, sowohl nach Trockenstress als auch nach ABA-Behandlung, deutlich schwächer aus als mit dem Ausgangskonstrukt pA17. Das pF-Konstrukt, bei dem die beiden Non-ACGT-ABRE verändert worden sind, liefert sogar noch schwächere Signale als pD. Wenn wie bei den Konstrukten pG und pH die beiden Non-ACGT-ABRE und das HDZip-Motiv in Kombination mutagenisiert sind, erhält man weder nach Austrocknung noch nach ABA-Behandlung irgendein Signal. Dabei spielt es keine Rolle, ob die palindromische Sequenz intakt vorliegt oder nicht.


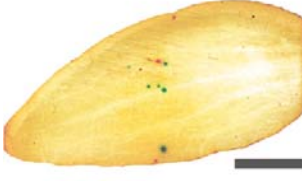









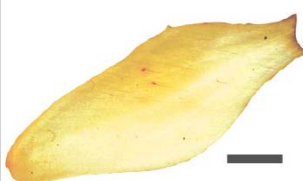






	Austrocknung	ABA	H ₂ O	1	2	3
pA17				+++	++	-
pA17-Sal				+++	+++	-
pD				+	+	-
pF				-	-	-
pG				-	-	-
pH				-	-	-

Abb. 16: Bombardments von *Craterostigma*-Blättern mit den C2-Promotor::GUS-Konstrukten der Mutagenesereihe

Blätter von *Craterostigma plantagineum* wurden mit pA17 und pA17-Sal, pD, pF, pG sowie pH, den Konstrukten der Mutagenesereihe (siehe Tab. 3 und Abb. 14), beschossen. Anschließend wurden die Blätter ausgetrocknet bzw. in ABA-Lösung oder in Leitungswasser inkubiert. Anhand einer GUS-Färbung wurde die Expression des GUS-Reportergens nachgewiesen. Die angegebenen Größenbalken stehen jeweils für 5 mm. In der Tabelle rechts ist eine Abschätzung der relativen Expressionsstärken aufgelistet. Die Zahlen bedeuten: 1) Austrocknung, 2) ABA-Behandlung und 3) H₂O-Kontrolle.

Dies führt zu dem Schluss, dass die beiden Non-ACGT-ABRE und das HDZip-Motiv wichtig sein müssen für die Trockenstress- und ABA-abhängige Regulation des C2-Promotors.

3.2.2.4. Co-Bombardments mit HDZip

Von Wolfgang Frank stand ein pflanzlicher Expressionsvektor zur Verfügung, pCPHB-1 (Frank et al., 1998) mit dem ein HDZip-Protein aus *Craterostigma plantagineum* unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors exprimiert werden konnte. Da im C2-Promotor eine Bindestelle für einen solchen Transkriptionsfaktor-Typ vorhanden ist, wurden Co-Bombardments mit verschiedenen C2-Promotor::GUS-Konstrukten durchgeführt. Im einzelnen wurden pA17, pA17-Sph, p203 C2, p119 C2, p86-1, p152-1 und p152-2 zusammen mit pCPHB-1 transformiert. Die Resultate lieferten keinen Anhaltspunkt dafür, dass das untersuchte HDZip-Protein CPHB-1 einen Einfluss auf die C2-Promotoraktivität haben könnte.

3.2.3. In transgenen Arabidopsis-Pflanzen wird der C2-Promotor nur dann exprimiert, wenn zwei ABRE und ein HDZip-Bindemotiv intakt vorliegen

3.2.3.1. Herstellung transgener Arabidopsis-Linien

Zur weiteren Charakterisierung des C2-Promotors wurden einige Konstrukte der Deletions- und Mutagenesereihe in das Arabidopsis-Genom inseriert. Dazu wurden die C2-Promotor::GUS-Inserts aus den Plasmiden p517 C2, p352 C2, pA17-Sph, pA17-Pst, pF, pD, pA17-Sal und pH (siehe Tab. 3 und Abb. 14) mit Hind III und Bgl II ausgeschnitten und in die Hind III und Bam HI-Schnittstellen des pBIN19-Vektors kloniert. Diese Konstrukte wurden danach in Agrobakterien transformiert. Die Agrobakterien-Transformation der Arabidopsis-Pflanzen wurde zweimal im Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung (Köln-Vogelsang) von Barbara Eilts durchgeführt. Anschließend wurden die Samen der transformierten Pflanzen auf MS-H_{Kan}-Medium ausplattiert. Kanamycin-resistente Pflanzen wurden auf Erde umgesetzt und bis zur Samenreife angezogen. Zum Nachweis, dass die Pflanzen korrekt transformiert worden waren, wurde aus den Arabidopsis-Pflanzen genomische DNA für eine PCR isoliert. In einer ersten PCR mit den Primern NPTII-sense und NPTII-antisense wurde das Kanamycin-Resistenzgen nachgewiesen. Hierbei wurde ein etwa 600 bp langes Produkt amplifiziert. Bei einer zweiten C2-spezifischen PCR mit den Primern pBIN Richtung Hind und C2 in pBIN erhielt man

Gesamtproteinextrakte isoliert und das darin vorhandene GUS-Protein mit einem Enzymtest quantitativ nachgewiesen.

3.2.3.2. X-Gluc-Färbungen zeigen die C2-Expression in transgenen Arabidopsis-Pflanzen

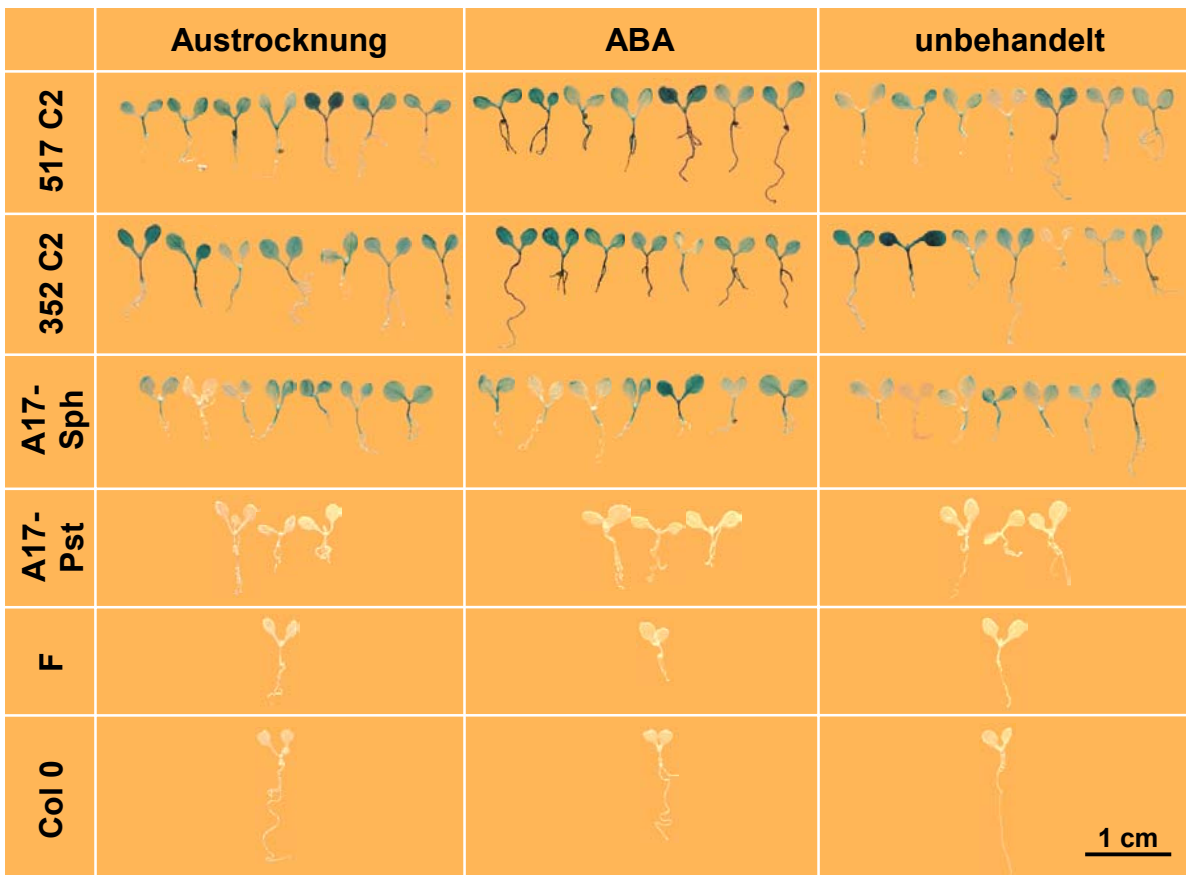
Transgene Arabidopsis-Pflanzen wurden 10 bzw. 24 Tage lang auf MS-H_{Kan}-Medium angezogen und dann wie im Material und Methoden-Teil detailliert beschrieben vorbehandelt und histochemisch gefärbt.

In den Blättern 10 Tage alter Keimlinge (Abb. 18, Teile a und c) ist der C2-Promotor, soweit er in den 517 C2-, 352 C2- und A17-Sph-Fragmenten noch vorhanden ist, konstitutiv aktiv. In den Wurzeln hat eine ABA-Behandlung der 517 C2- und 352 C2-Linien eine stärkere GUS-Expression zur Folge als Trockenstress und die Kontrollbehandlung. Die Stärke der Expression in den Wurzeln der A17-Sph-Linien entspricht der Expressionsstärke in ausgetrockneten und unbehandelten 517 C2- und 352 C2-Linien. Bei den mit den A17-Pst- und F-Fragmenten transformierten Pflanzen ist, wie bei der Wildtyp-Kontrolle, keinerlei Expression sichtbar geworden.

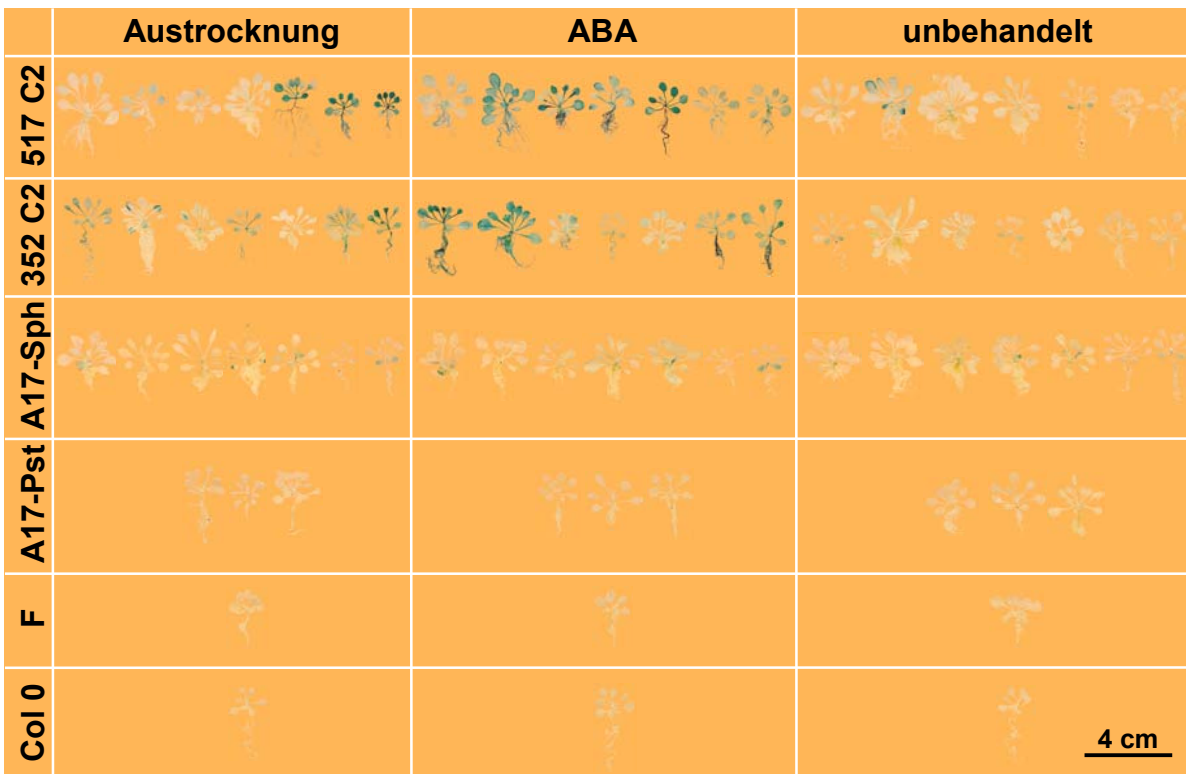
Im Alter von 24 Tagen werden die C2-Promotor::GUS-Konstrukte differenzierter exprimiert (Abb. 18, Teile b und d). Bei der unbehandelten Kontrolle der 517 C2- und 352 C2-Pflanzen, sowie bei den A17-Sph-Pflanzen insgesamt tritt nur noch eine sehr schwache Expression auf, die sich auf die Kotyledonen beschränkt. ABA-Behandlung bewirkt bei den 517 C2- und 352 C2-Linien eine starke Induktion des C2-Promotors in der gesamten Pflanze. Trockenstress hat bei diesen Linien noch eine deutlich sichtbare, aber schwächere Expression zur Folge. Dabei variiert die Expressionstärke zwischen den einzelnen Linien eines Konstrukts. Wie schon bei den Keimlingen kann auch bei den Jungpflanzen keine Expression in den A17-Pst-Pflanzen und der F-Linie beobachtet werden.

Die GUS-Färbung der transgenen Arabidopsis-Pflanzen zeigt, dass für die Funktionalität des C2-Promotors die beiden Non-ACGT-ABRE essentiell sind. In den Konstrukten, wo sie entweder deletiert (A17-Pst) oder mutagenisiert (F) sind, ist der Promotor nicht aktiv.

a) 10 Tage alte transgene Arabidopsis-Keimlinge



b) 24 Tage alte transgene Arabidopsis-Jungpflanzen



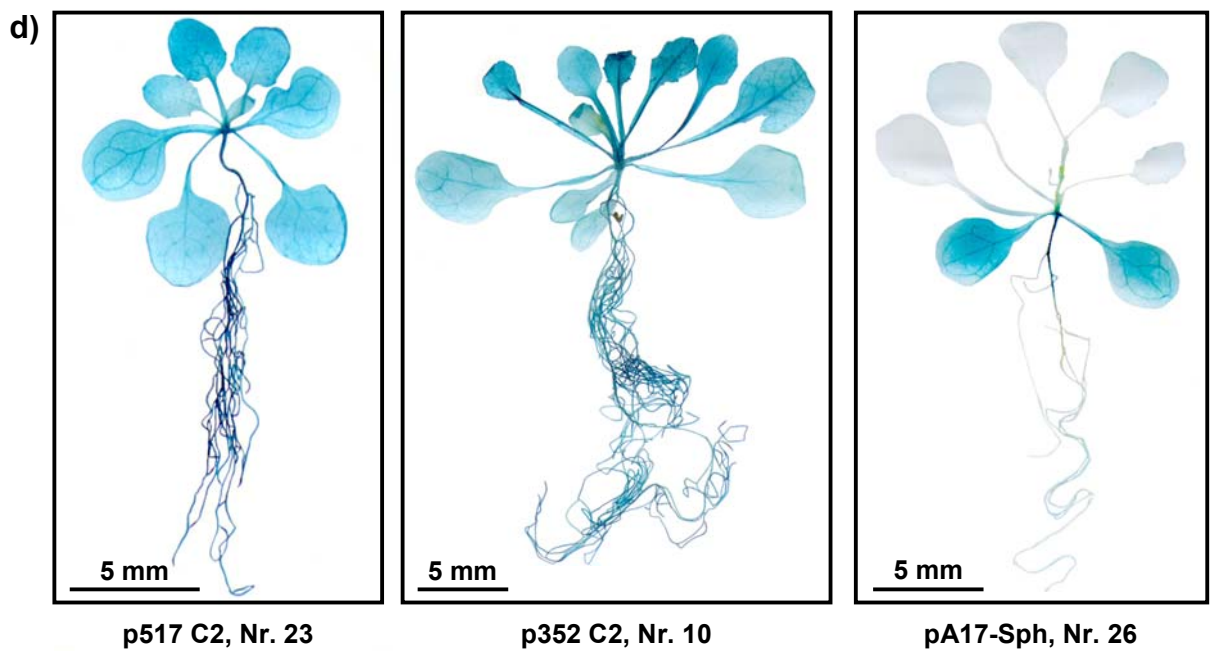
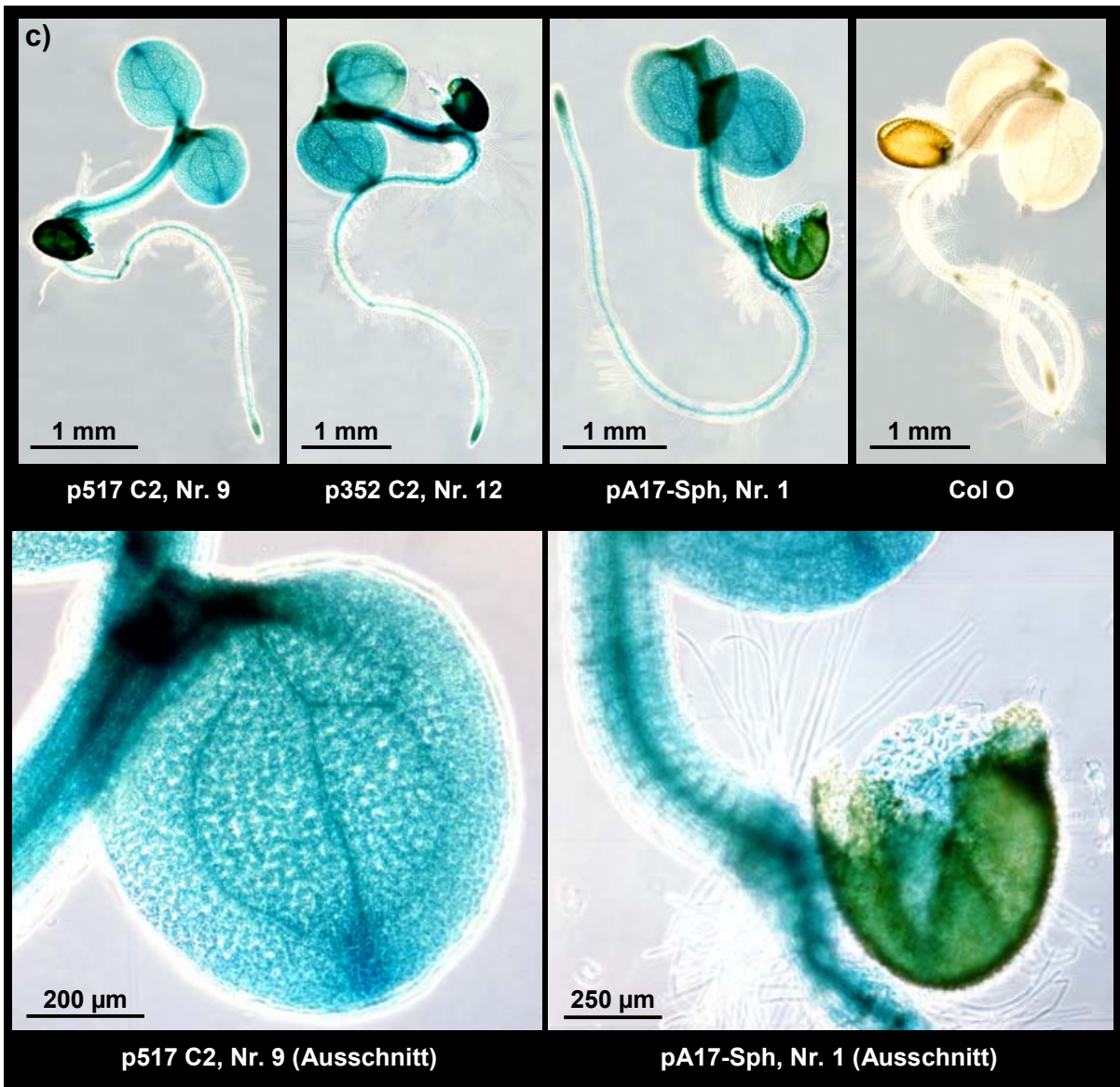


Abb. 18: GUS-Färbung transgener C2-Promotor::GUS Arabidopsis-Linien

Transgene *Arabidopsis thaliana* wurden auf MS-H_{Kan}-Medium bis zum Alter von **a)** 10 bzw. **b)** und **d)** 24 Tagen angezogen und zur Vorbehandlung entweder getrocknet oder in ABA-Lösung inkubiert. Dann folgte eine GUS-Färbung. Unbehandelte Pflanzen wurden vom Medium genommen und direkt für die GUS-Färbung verwendet. Pro transformiertes Konstrukt wurden bis zu sieben transgene Linien untersucht. Dabei handelte es sich um die folgenden Linien:

- p517 C2-Fragment: Nr. 4, 5, 9, 14, 15, 23 und 24
- p352 C2-Fragment: Nr. 10, 12, 16, 17, 18, 19 und 20
- pA17-Sph-Fragment: Nr. 1, 2, 6, 8, 11, 25 und 26
- pA17-Pst-Fragment: Nr. 21, 27 und 28
- pF-Fragment: Nr. 22

a) und **b)** Übersichten

c) und **d)** Vergrößerungen von Keimlingen und 24 Tage alten Pflanzen

c) Die Keimlinge wurden vor der GUS-Färbung 7 Tage auf feuchtem Filterpapier angezogen.

Eine Übersicht über die transformierten Konstrukte ist in Abb. 14 zu sehen.

3.2.3.3. Quantitative GUS-Expression

Mit Hilfe eines enzymatischen GUS-Tests wurde die Aktivität des C2-Promotors quantifiziert. Dafür wurden aus getrockneten, mit ABA behandelten bzw. unbehandelten Keimlingen und Jungpflanzen zunächst Gesamtproteinextrakte gewonnen. Ein Aliquot davon wurde in einen Enzymtest eingesetzt, bei dem das Substrat 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronsäure (MUG) in 4-Methylumbelliferon (MU) umgewandelt wird. Anhand der fluorometrisch ermittelten Konzentration des gebildeten MU konnte auf die Menge des vorhandenen GUS-Enzyms rückgeschlossen werden. Diese wiederum verhielt sich analog zur Aktivität des vorangeschalteten Promotors.

10 – 12 Tage alte Keimlinge

Wie aus Abb. 19, Teil a ersichtlich ist, zeigen die Wildtyp-Arabidopsis-Keimlinge (Col 0) in allen drei Messgruppen eine Hintergrund-Aktivität im Bereich von 30-80 pmol MU pro Minute pro μ g Protein. Vergleicht man nun die Messergebnisse der Mutanten-Linien mit diesem Wert, so stellt man fest, dass die Keimlinge der 517 C2- und der 352 C2-Linien eine zum Teil weit über 100-fach höhere GUS-Aktivität aufweisen, sowohl nach Trockenstress, als auch nach ABA-Behandlung. Man beobachtet diese gesteigerte Aktivität auch bei allen vier ABA-behandelten A17-Linien, wohingegen die ausgetrockneten A17-Keimlinge eine mit der Kontrolle vergleichbare Aktivität zeigen. In den untersuchten A17-Sph-Keimlingen induzieren

Trockenstress und ABA nur noch in einigen Linien, darunter Nr. 1, 8, 11 und 26, eine um den Faktor zehn höhere GUS-Aktivität als beim Wildtyp. Bei den A17-Sph-Linien Nr. 2 und 6 liegen die Messwerte im Bereich der Wildtyp-Pflanzen. Bei den unbehandelten A17-, 517 C2-, 352 C2- und A17-Sph-Keimlingen beobachtet man insgesamt ein niedrigeres Aktivitätsniveau als nach Austrocknung und ABA-Behandlung. Aber auch hier ergeben einige Linien, wie zum Beispiel A17 Linie 4, 517 C2 Nr. 15, 352 C2 Nr. 10 und 12, sowie A17-Sph Nr. 26, noch zum Teil mehr als zehn mal so hohe Werte wie der Wildtyp. In allen drei Messgruppen besitzen die drei A17-Pst-Linien und die F-Linie durchweg ein Aktivitätsniveau, das im Bereich der Col 0-Ergebnisse liegt.

19 – 24 Tage alte Jungpflanzen

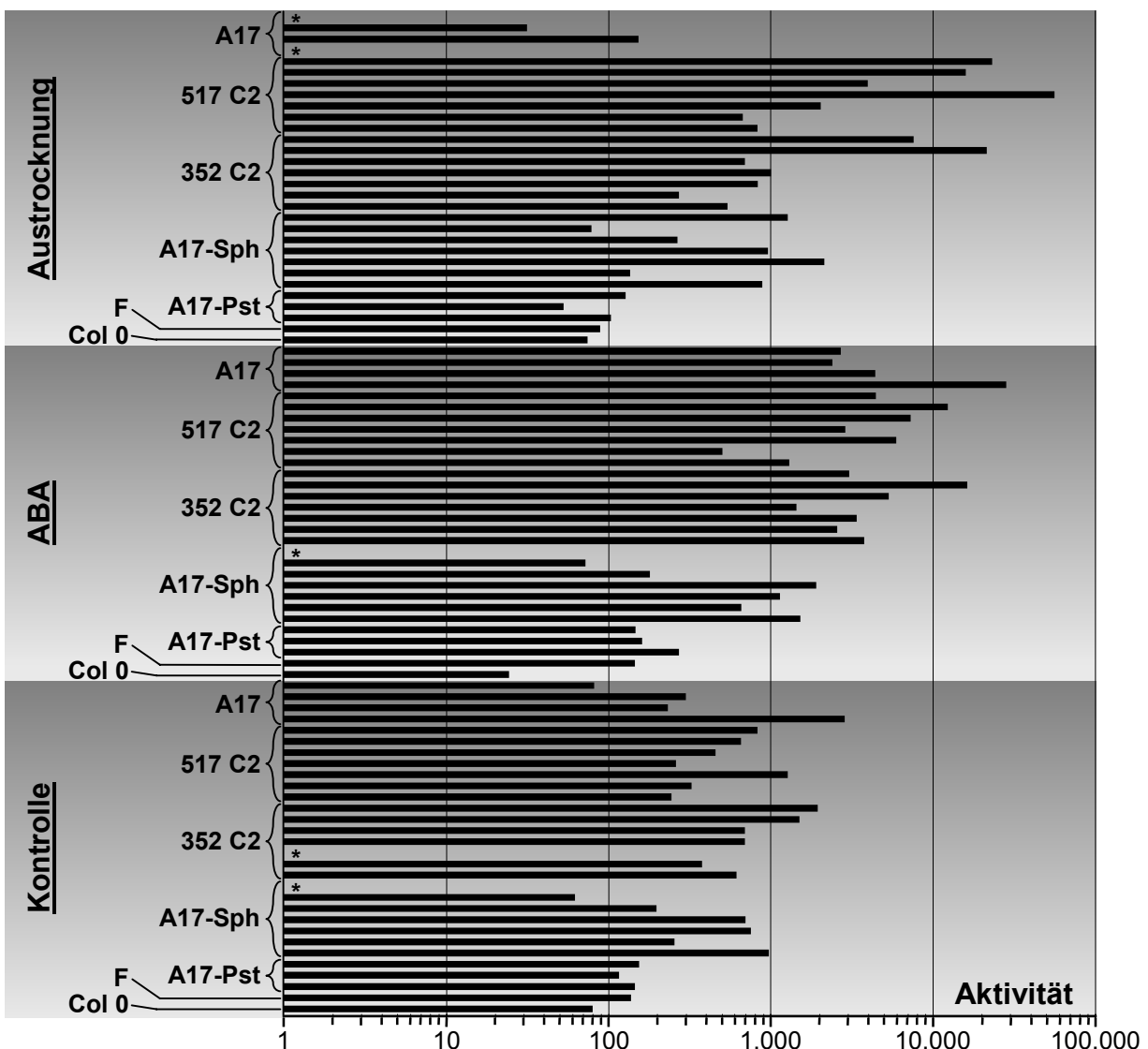
In den 19 – 26 Tage alten Jungpflanzen, deren Messwerte in Abb. 19, Teil b aufgeführt sind, beobachtet man nach Austrocknung zum Teil deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Linien eines Transformationsansatzes. Insbesondere die Messwerte der A17-Linien 1 und 3, der 517 C2-Linien Nr. 4, 5, 9 und 14, der 352 C2-Linien Nr. 12, 16 und 18 sowie aller A17-Sph-Linien außer Nr. 26 liegen im Bereich der Wildtyp-Ergebnisse. Im Gegensatz dazu weisen die Linien A17 Nr. 2 und 4, 517 C2 Nr. 15, 23 und 24 sowie 352 C2 Nr. 20 eine mindestens um den Faktor 3,8 höhere Aktivität auf als der Wildtyp. Dieses Muster stimmt exakt mit den Ergebnissen der GUS-Färbung in Abb. 18, Teil b überein. Nach ABA-Behandlung findet man die stärkste GUS-Aktivität in den vier A17-Linien, in 517 C2 Nr. 15 sowie in 352 C2 Nr. 10 und 12. Hier werden 12,5- bis 42,3-fach höhere Aktivitäten gemessen als bei Col 0. In anderen 352 C2-Linien, wie zum Beispiel Nr. 18, und in fast allen A17-Sph-Linien unterscheidet sich die gemessene GUS-Aktivität nur geringfügig von derjenigen der Wildtyp-Kontrolle. In den unbehandelten Kontrollen erhält man nahezu bei allen Proben Messwerte im Bereich der Col 0-Ergebnisse. Wie schon bei den Keimlingen beobachtet man auch bei keiner der A17-Pst und F-Jungpflanzen eine vom Wildtyp-Niveau abweichende GUS-Aktivität, weder bei Trockenstress, noch nach ABA-Behandlung.

Wie auch Abb. 19, Teil c zeigt, kann man zusammenfassend feststellen, dass der C2-Promotor in 10 – 12 Tage alten Keimlingen der A17-, der 517 C2- und der 352 C2-Linien insgesamt deutlich durch Trockenstress und ABA induzierbar ist und dort eine bis zu 360-fach höhere mittlere relative Aktivität aufweist als in A17-Pst- und F-Keimlingen. In Pflanzen der A17-Sph-Linien bewirkt ABA nur eine vergleichbar

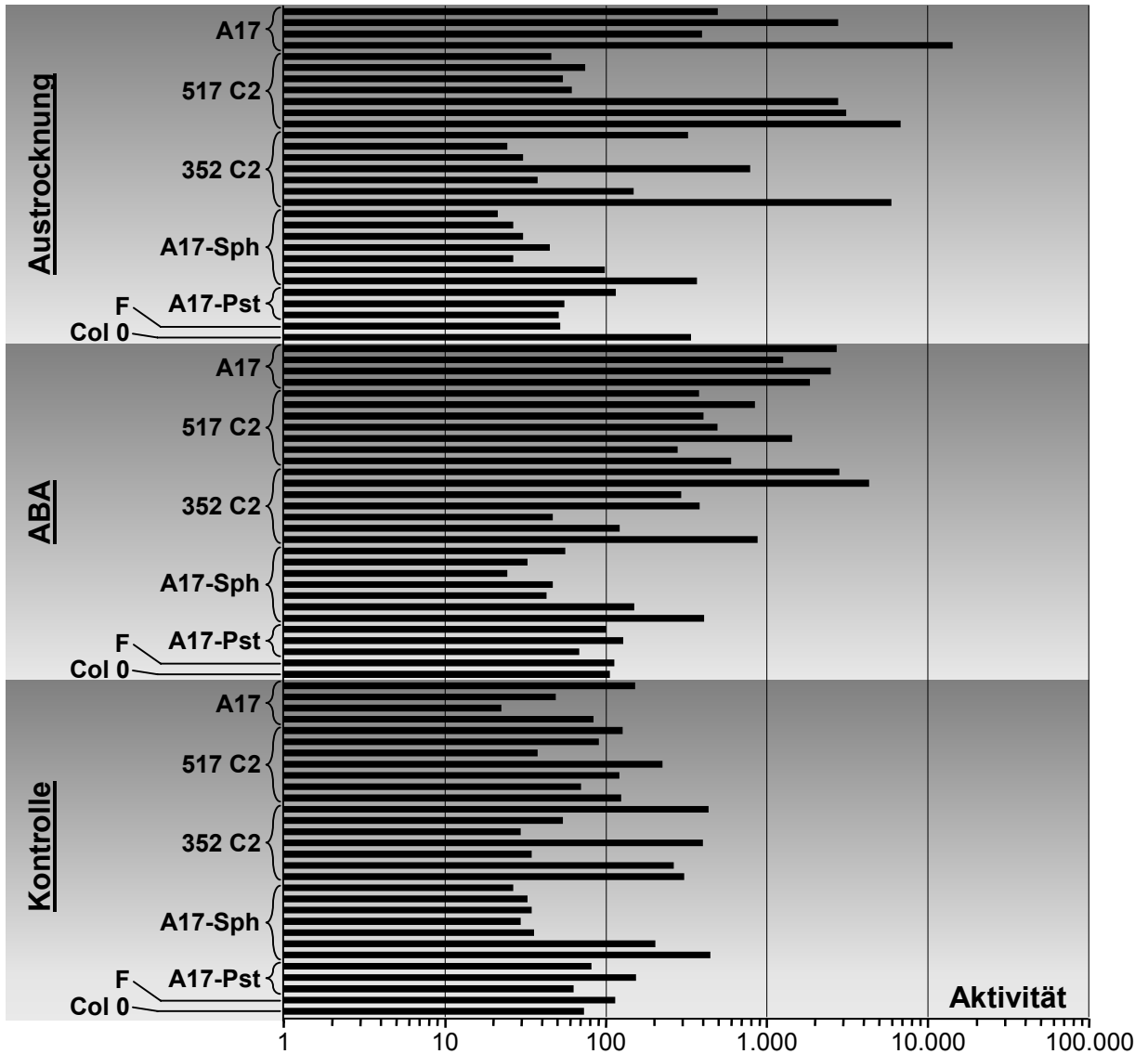
schwache Induktion des verbliebenen C2-Promotorfragments, die aber immer noch 36-fach höher liegt als bei der Wildtyp-Kontrolle. In den Pst- und F-Linien lässt sich keine Induktion des C2-Promotors nachweisen. In älteren Pflanzen sinkt die Induzierbarkeit des C2-Promotors deutlich ab. Die größte durchschnittliche Aktivitätserhöhung (um den Faktor 20) beobachtet man hier in ABA-behandelten A17-Pflanzen.

Somit zeigen diese quantitativen GUS-Assays, dass für die Funktionalität des C2-Promotors bei Trockenstress und ABA-Induktion die Promotorregion wichtig ist, durch die sich die Konstrukte A17-Sph und A17-Pst unterscheiden. In dieser Differenzregion sind zwei ABRE und ein HDZip-Bindemotiv enthalten. Insbesondere die beiden ABRE, die beim F-Konstrukt mutagenisiert worden sind und hier den einzigen Unterschied zum voll funktionsfähigen A17-Konstrukt ausmachen, müssen für die C2-Expression bei Trockenstress und ABA-Behandlung essentiell sein.

a) GUS-Aktivität in 10 – 12 Tage alten Arabidopsis-Keimlingen



b) GUS-Aktivität in 19 – 26 Tage alten Arabidopsis-Jungpflanzen



c) Relative mittlere GUS-Aktivität der transgenen Arabidopsis-Pflanzen

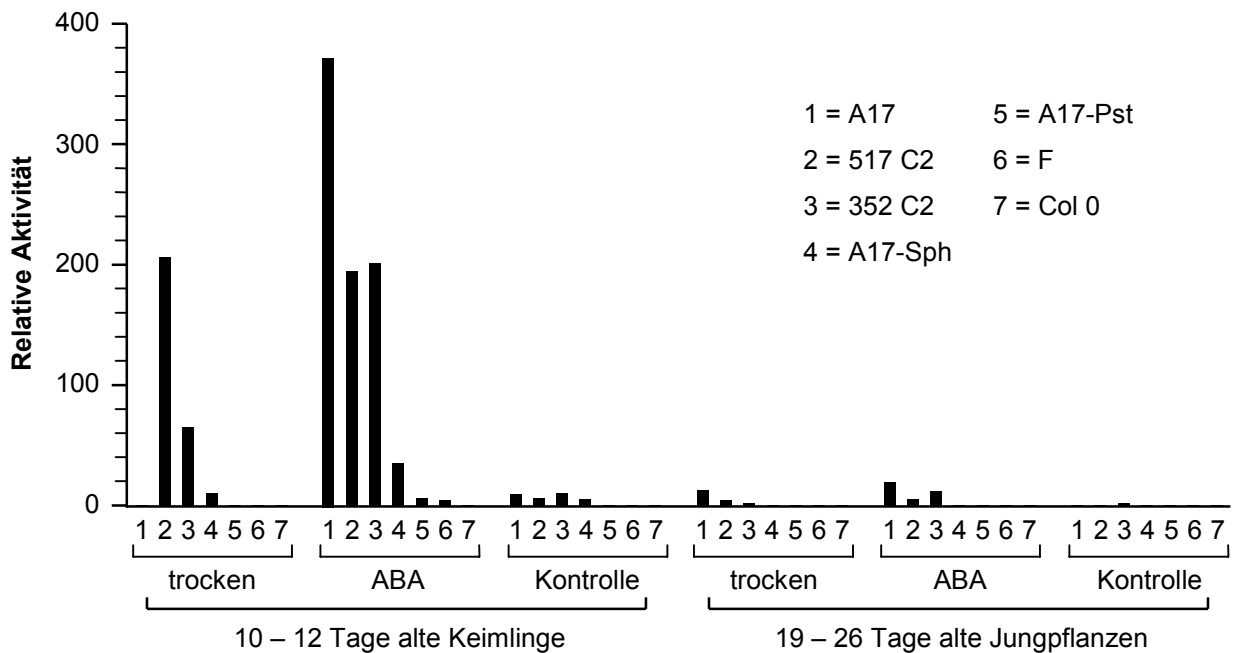


Abb. 19: Quantifizierung der GUS-Aktivität in *Arabidopsis thaliana*

Pflanzen verschiedener transgener Arabidopsis-Linien wurden auf selektivem Medium angezogen und zur Induktion der C2-Promotoraktivität in ABA-Lösung inkubiert oder getrocknet. Die Kontroll-Pflanzen wurden direkt vom Medium genommen. Mit Gesamt-Proteinextrakten dieser Pflanzen wurden quantitative GUS-Aktivitätstest durchgeführt. Aus den Messwerten wurde die GUS-Aktivität in pmol MU pro Minute pro μg Protein berechnet. Unter **a)** sind die GUS-Aktivitäten 10-12 Tage alter Arabidopsis-Keimlinge aufgeführt, während **b)** die GUS-Aktivität in 19-26 Tage alten Arabidopsis-Jungpflanzen zeigt. In den Diagrammen **a)** und **b)** sind die GUS-Aktivitäten folgender transgener Linien jeweils als Balken von oben nach unten angeordnet dargestellt (* = Messwert fehlt):

- A17::GUS: Linien 1, 2, 3 und 4
- 517 C2::GUS: Nr. 4, 5, 9, 14, 15, 23 und 24
- 352 C2::GUS: Nr. 10, 12, 16, 17, 18, 19 und 20
- A17-Sph::GUS: Nr. 1, 2, 6, 8, 11, 25 und 26
- A17-Pst::GUS: Nr. 21, 27 und 28
- F::GUS: Nr. 22

Zur Berechnung der relativen GUS-Aktivität unter **c)** wurden die Einzelmesswerte der verschiedenen transgenen Linien anschließend arithmetisch gemittelt und durch den entsprechenden Col 0-Messwert dividiert.

3.2.4. DNA-Protein-Bindungsstudien untersuchen die Bedeutung einer 85 bp langen C2-Promotorregion mit zwei ABRE und einem HDZip-Bindemotiv

Um zu zeigen, dass an die 85 bp lange C2-Promotor-Region, durch die sich die beiden Konstrukte pA17-Sph und pA17-Pst unterscheiden, auch tatsächlich Proteine binden, wurden Bindungsstudien (EMSAs) durchgeführt. Dazu wurden Kernproteinextrakte aus frischen und getrockneten *Craterostigma*-Blättern hergestellt. Zusätzlich standen aufgereinigte Proben eines HDZip-Fusionsproteins von Wolfgang Frank (Frank et al., 1998) zur Verfügung, die ebenfalls getestet wurden. Als DNA-Proben wurden die C2-Promotor-Fragmente aus den beiden Plasmiden p86-1 und p86-4 verwendet (siehe Abb. 14). Beim 86-1-Fragment handelt es sich um die Original-C2-Sequenz, während das 86-4-Fragment an den beiden ABRE und dem HDZip-Bindemotiv mutagenisiert ist. Beide Fragmente wurden radioaktiv markiert und zusammen mit den Kernproteinextrakten oder dem HDZip-Fusionsprotein inkubiert. Auf dem Autoradiogramm in Abb. 20 sieht man nach Inkubation des 86-1-Fragments mit dem HDZip-Fusionsprotein eine klar definierte retardierte Bande (Pfeil nach links), die umso stärker wird, je mehr Fusionsprotein im Ansatz enthalten ist. Es ist allerdings nicht möglich, dieses Signal durch Konkurrenz

mit 200-facher Menge unmarkierter DNA zu unterdrücken. Inkubiert man das HDZip-Fusionsprotein mit dem mutagenisierten 86-4-Fragment, so beobachtet man ebenfalls eine verzögert durch das Gel laufende Bande, die etwa auf gleicher Höhe liegt wie das Signal mit der 86-1-DNA. Auch hier gelingt es selbst durch 250-fache und 500-fache Konkurrenz nicht, die retardierte Bande wieder zu eliminieren. Bei der Inkubation von 20 µg Kernproteinextrakten aus frischen und getrockneten *Craterostigma*-Blättern mit den beiden Fragmenten aus p86-1 und p86-4 erscheint ebenfalls bei beiden Fragmenten eine verzögerte Bande (Pfeil nach rechts). Auch hier bleibt das Signal selbst nach 300-facher Konkurrenz mit unmarkierter Proben-DNA unverändert stark. Diese Bande ist reproduzierbar und tritt auch bei Wiederholungen des Versuchs mit anderen Kernproteinextrakten auf. Neben den auf der Abbildung verwendeten Kernproteinextrakten wurden vier weitere getestet: zwei aus frischen und zwei aus getrockneten Blättern, die alle eine deutlich abgrenzbare retardierte Bande in vergleichbarer Höhe erzeugen.

Insgesamt betrachtet scheinen Proteine aus dem Nukleus und das untersuchte HDZip-Fusionsprotein an die beiden untersuchten C2-Promotorfragmente zu binden. Dabei spielt es jedoch keine Rolle, ob die Sequenzen der beiden ABRE und des HDZip-Motivs verändert sind oder nicht. Weiterhin ist es nicht möglich, die Bindeproteine durch im Überschuss zugegebene unmarkierte DNA der radioaktiven Probe zu entziehen.

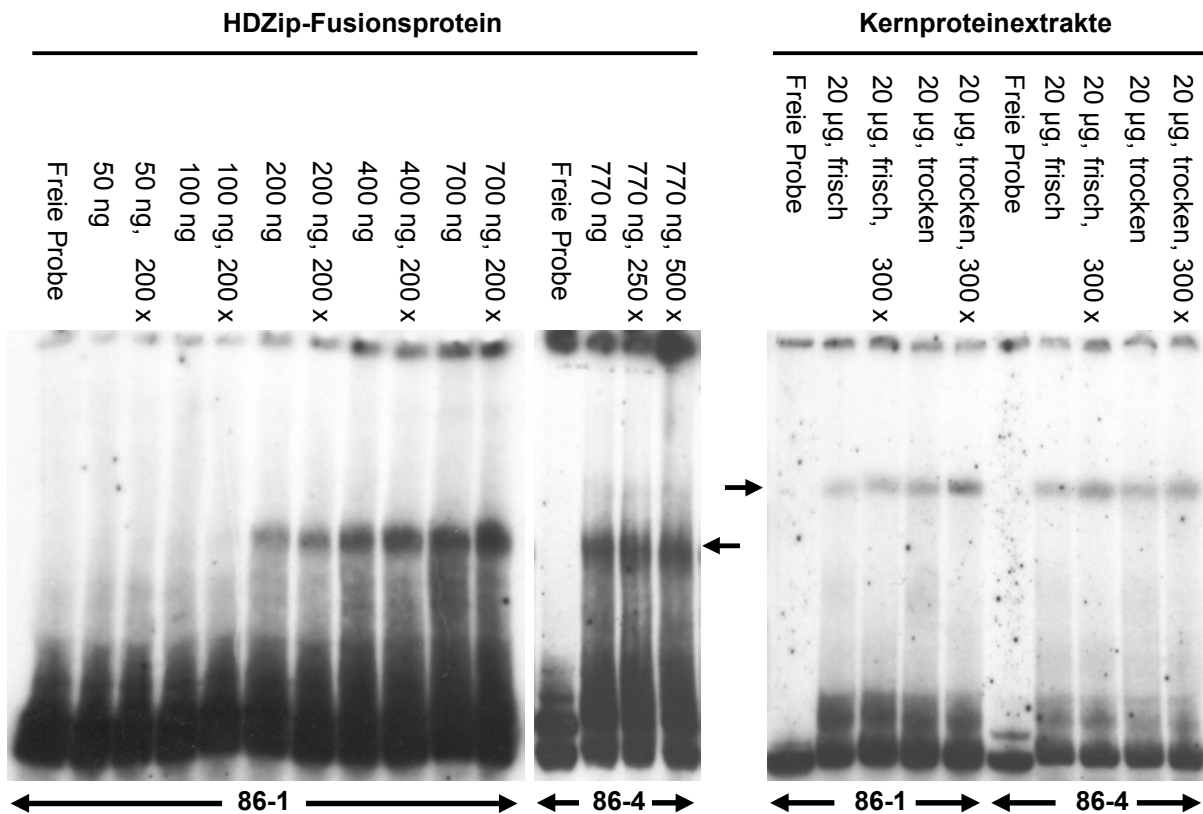


Abb. 20: Bindungsstudien mit den 86-1- und 86-4-C2-Promotorfragmenten und Kernproteinextrakten bzw. aufgereinigtem HDZip-Fusionsprotein

Die C2-Promotor-Inserts wurden mit Hind III und Sal I aus den Plasmiden p86-1 und p86-4 (siehe Abb. 14) ausgeschnitten und durch das Auffüllen kohäsiver Enden radioaktiv markiert. Dann wurden die aufgereinigten Fragmente entweder mit Kernproteinextrakten aus frischen oder getrockneten *Craterostigma*-Blättern oder alternativ mit in *E. coli* überexprimiertem und aufgereinigtem HDZip-Fusionsprotein inkubiert, im Polyacrylamidgel aufgetrennt und autoradiographiert. Die vier HDZip/86-4-Ansätze in der Mitte enthalten je 200 ng, alle anderen Proben jeweils 1 µg unspezifischen Kompetitor (Poly [dA-dT] · Poly [dA-dT]). Ein Teil der Proben wurde zusätzlich im Überschuss mit spezifischem Kompetitor, d. h. mit unmarkiertem DNA-Fragment, versetzt. Bei diesen Ansätzen geben die Zahlen (z. B. 200 x) das Verhältnis von Kompetitor-DNA zu markierter DNA an.

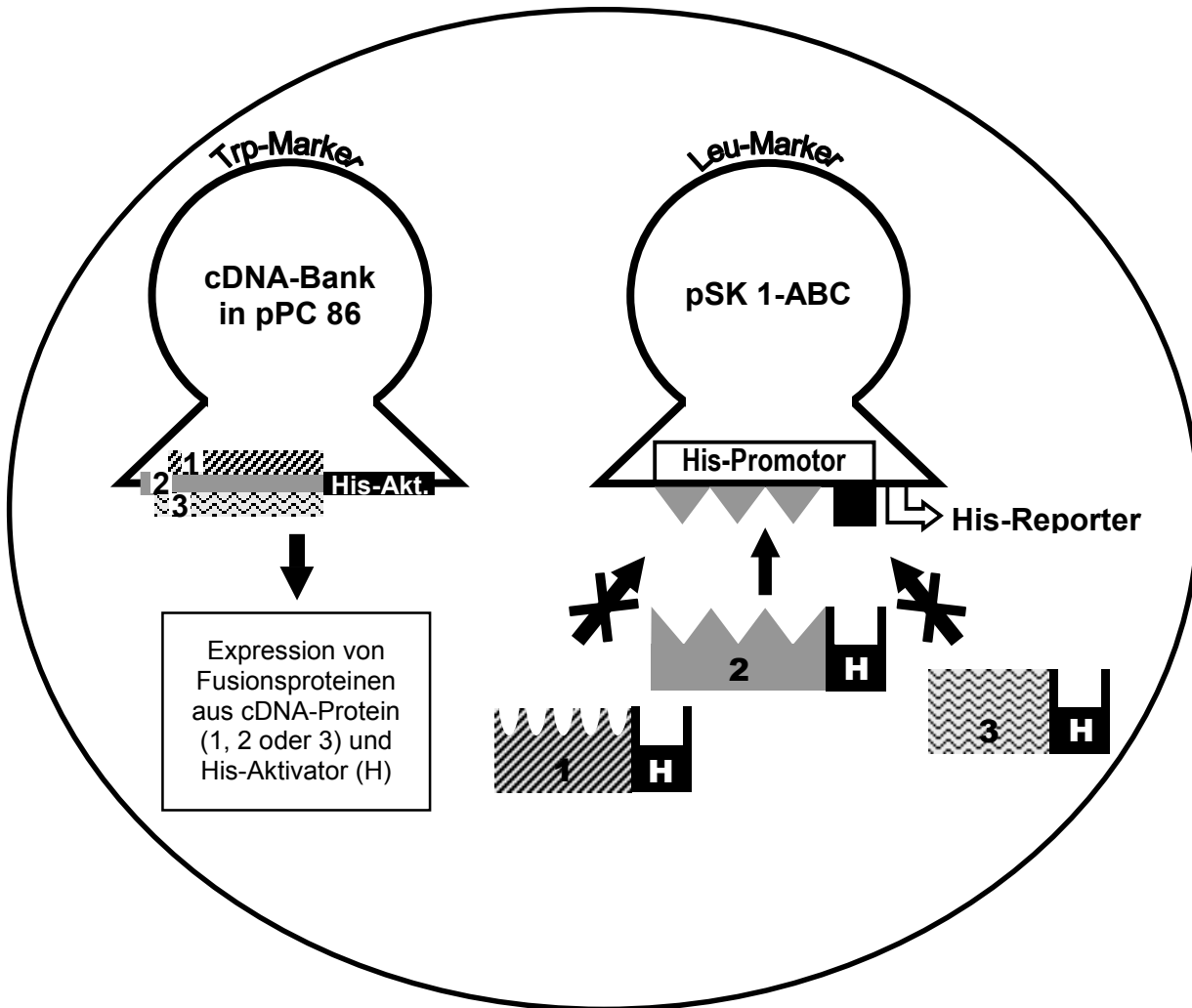
3.3. Ein Hefe-One Hybrid-Screening führt zur Isolierung von zwei C2-Promotor-Bindeproteinen aus einer cDNA-Bibliothek

Ein One Hybrid-Versuch bietet die Möglichkeit, aus einer cDNA-Bank die Sequenz für ein Protein zu isolieren, das an ein vorgegebenes DNA-Fragment bindet. Dieser Ansatz eignet sich besonders für die Suche nach Transkriptionsfaktoren, die mit bestimmten Promotorregionen interagieren müssen, um Genexpression zu induzieren.

Bei dem hier beschriebenen Versuchsansatz liegen in den Hefezellen jeweils zwei verschiedene Plasmide vor. Das erste Plasmid (pSK 1), das in allen Zellen gleich ist, trägt das His3-Reportergen, dessen Genprodukt es der Hefezelle ermöglicht, auf Histidin-freiem Medium zu wachsen. Der His3-Promotor besteht aus zwei Teilen, dem Gal-Minimalpromotor und der zu untersuchenden DNA-Sequenz. In diesem Versuchsansatz handelt es sich dabei um ein C2-Promotorfragment. Die His3-Expression wird induziert, wenn ein Fusionsprotein an seinen Promotor bindet. Für das aktivierende Fusionsprotein kodiert das zweite Plasmid (pPC 86) in der Zelle. pPC 86 variiert von Zelle zu Zelle, da alle pPC 86-Plasmide zusammen eine cDNA-Bank bilden. Unter einem konstitutiven Promotor wird ein Fusionsprotein aus Gal-Transaktivator-domäne und variablem Protein-Anteil exprimiert, in Abhängigkeit von der jeweils vorliegenden cDNA. Wenn das Fusionsprotein nun an den His3-Promotor binden kann, führt dies zum Wachstum der Zelle auf Medium ohne Histidin, so dass dieser Klon identifiziert und somit auch isoliert werden kann. Das Versuchsschema ist in Abb. 21 dargestellt.

Abb. 21 (auf Seite 102): Schema des Hefe-One Hybrid-Versuchs

In den YM954-Hefezellen liegen zwei Plasmide vor. pPC 86 mit Tryptophan-Marker exprimiert ein Fusionsprotein aus cDNA-Anteil (1, 2 oder 3) und konstantem His-Aktivator-Protein (H). Dabei variiert der cDNA-Anteil von Zelle zu Zelle in Abhängigkeit von der jeweils klonierten cDNA. pSK 1-ABC mit Leucin-Marker kodiert das Reportergen His3 unter der Kontrolle des His-Promotors. Dieser besteht aus drei Kopien (▼) eines C2-Promotor-Fragments und einem His3-spezifischen Promotoranteil. Wenn nun das pPC 86-Fusionsprotein an den His-Promotor passt (siehe Protein 2) und auch daran bindet, dann wird das His-Reportergen exprimiert. Dadurch erlangt die Hefezelle die Fähigkeit, auf Medium ohne Histidin zu wachsen. Dies ermöglicht die Selektion von Hefezellen, deren cDNA-Bank-Vektor eine cDNA enthält, die für ein C2-Promotor-Bindeprotein kodiert.



3.3.1. Für die Reporter-Hefe werden drei Kopien eines C2-Promotor-Fragments in den Vektor pSK 1 kloniert

Wie die vorangegangenen Experimente gezeigt haben, musste die etwa 85 bp lange C2-Promotorregion, die zwei ABRE und ein HDZip-Bindemotiv enthält, eine Rolle spielen bei der Trockenstress- und ABA-abhängigen Expression des C2-Gens. Daher wurde diese Region als Zielsequenz für einen One Hybrid-Screen ausgewählt. Weil jedoch die Konformation eines möglichen Bindeproteins nicht kalkulierbar war, wurden drei Kopien dieser Sequenz hintereinander stromaufwärts des Gal-Minimalpromotors in die Promotorregion des His3-Reportergens kloniert. So war die Wahrscheinlichkeit höher, dass zumindest eine der drei Kopien in der richtigen räumlichen Anordnung lag. Die drei Zielfragmente wurden mit Hilfe von PCR synthetisiert und dann, wie in Abbildung 22 beschrieben, in zwei aufeinander folgenden Schritten in den Vektor pSK 1 kloniert.

a)

Fragment	Primer 1	Primer 2	PCR-Fragment	Restriktionsenzyme	Fragment nach Verdau
A	C2-Hybrid1	C2-Hybrid2	107 bp	Sac I + Xba I	85 bp
B	C2-Hybrid3-nur Xba	C2-Hybrid4	107 bp	Xba I + Sph I	90 bp
C	C2-Fragment1-Hind	C2-Hybrid6	497 bp	Sph I + Bam HI	78 bp

b)

Sac I-----**Sph I**---ABRE 1-----HDZip-----**Fragment A**-----
 5' -GAGCTCG**CAT GCGTGGC**GTC T**CAATAATTG** TAAAGAAAGC AAATGCAATG 50
 -----ABRE 2-----**Xba I**-----ABRE 1--
 GATAAAAGAC ACATAAGAGG **CCCCGCTGGC** TTCTAGACTT G**CATGCGTGG** 100
 -----HDZip-----**Fragment B**-----
CGTCTCAATA ATTGTAAAGA AAGCAAATGC AATGGATAAA AGACACATAA 150
 -----ABRE 2-----**Sph I** / ABRE 1-----HDZip-----
 GAGG**CCCCGCG TGGC**TTCG**CA TCGGTGGC**GT CT**CAATAATT G**TAAAGAAAG 200
 -----**Fragment C**-----ABRE 2-----**Bam HI**
 CAAATGCAAT GGATAAAAGA CACATAAGAG G**CCCCGCTGG** **CGGATCC**-3' 250

Abb. 22: Konstruktion des One Hybrid-Vektors pSK 1-ABC

a) Herstellung der drei C2-Promotor-Fragmente A, B, und C

Mit Hilfe dreier PCRs wurden die Fragmente A, B und C synthetisiert. Die Bindestellen der Primer sind in Abb. 6 (im Methodenteil) aufgeführt. Dann wurden sie für die Ligation mit den angegebenen Enzymen geschnitten.

b) Sequenz des C2-Promotor-Inserts im One Hybrid-Vektor pSK 1-ABC

Die Konstruktion des Vektors pSK 1-ABC erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurde Fragment A über Sac I und Xba I in den Ausgangsvektor pSK 1 (Vektorkarte im Anhang) eingebaut. In einem zweiten Schritt wurden die beiden anderen Fragmente B und C über die Schnittstellen Xba I und Bam HI gleichzeitig in den Vektor pSK 1-A ligiert, so dass anschließend pSK 1-ABC vorlag. Die drei potentiell regulatorisch wirksamen Motive sind schwarz unterlegt.

3.3.2. Für den One Hybrid-Versuch wird eine cDNA-Bibliothek aus getrockneten Craterostigma-Pflanzen hergestellt

Da die Expression des C2-Gens bei Trockenstress stark ansteigt, wurden für die Konstruktion der cDNA-Bank angetrocknete intakte Craterostigma-Pflanzen verwendet, in denen die Expression regulatorisch wirksamer Trockenstressgene induziert worden sein sollte. Aus ursprünglich 5 µg Poly(A)⁺-RNA wurden zunächst 2,43 µg cDNA synthetisiert. Nach Modifikation der Enden wurde diese anschließend säulenchromatographisch aufgetrennt und fraktioniert. Danach waren noch 1,29 µg cDNA von ausreichender Länge in sechs Fraktionen für die Klonierung übrig. Die weiterverwendbaren Fraktionen wurden zu zwei Proben vereinigt und 30 bzw. 40 ng davon in den Vektor pPC 86 ligiert. Die beiden Ligationsansätze wurden gefällt und in jeweils 10 µl Aqua dest. resuspendiert. Davon wurden insgesamt vier mal 1,5 µl in elektrokompetente *E. coli DH10B* transformiert. Je 99,5 % der Transformationsansätze wurden in jeweils 200 ml LB_{amp}-Medium zur Präparation der Plasmide angeimpft. Die restlichen 0,5 % wurden zur Kontrolle ausplattiert und die gewachsenen Kolonien gezählt. Daraus ließ sich berechnen, dass insgesamt etwa $1 \cdot 10^5$ Bakterienzellen transformiert worden waren. Weiterhin wurden 20 zufällige Klone ausgewählt und ihre cDNA mit den Primern pPC86-16 bp und pPC86-18 bp durch PCR amplifiziert, was zeigte, dass die Größe der Fragmente von 0,5 bis 3 kb reichte.

3.3.3. Austesten der optimalen Konzentration des kompetitiven Inhibitors 3-AT

Um unspezifische schwache Bindungen des aktivierenden Fusionsproteins zu unterbinden, wurde dem Medium 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT) als Kompetitor zugesetzt. Dazu musste jedoch erst die optimale 3-AT-Konzentration ermittelt werden. Einerseits sollte sie möglichst gering sein, um echte aber schwache Interaktionen nicht zu unterdrücken. Andererseits sollte sie jedoch hoch genug sein, um unspezifische Wechselwirkungen und damit falsch-positive Klone zu verhindern. Zu diesem Zweck wurde die Reporterhefe YM954 mit pSK 1-ABC und dem Vektor pPC 86 transformiert. Die Zellen wurden dann in zwei Testreihen auf SC-Medium ohne Leucin, Tryptophan und Histidin und mit 3-AT-Konzentrationen von 0, 2,5, 5, 7,5, 10 und 20 mM, bzw. von 0, 0,5, 1, 1,5, 2 und 2,5 mM ausgestrichen. Nach fünf bzw. sieben Tagen war jeweils nur die Platte ohne 3-AT bewachsen. Aus diesem

Grund wurde für den One Hybrid-Screen eine 3-AT-Konzentration von 2,5 mM ausgewählt.

3.3.4. Das One Hybrid-Screening führt zur Isolierung von zehn unabhängigen positiven Klonen aus $1 \cdot 10^7$ transformierten Hefeklonen

Mit einer Effizienz von bis zu $1,4 \cdot 10^5$ transformierten Zellen pro Mikrogramm DNA wurden insgesamt $1 \cdot 10^7$ Zellen transformiert und auf SC-Medium ohne Leucin, Tryptophan und Histidin und mit 2,5 mM 3-AT ausplattiert. Nach sieben bis maximal zehn Tagen wurden etwa 200 gewachsene Kolonien gepickt und auf frisches Medium überimpft. Nur 13 voneinander unabhängige Klone sind erneut gewachsen, davon sind vier Klone exemplarisch in Abb. 23 gezeigt.

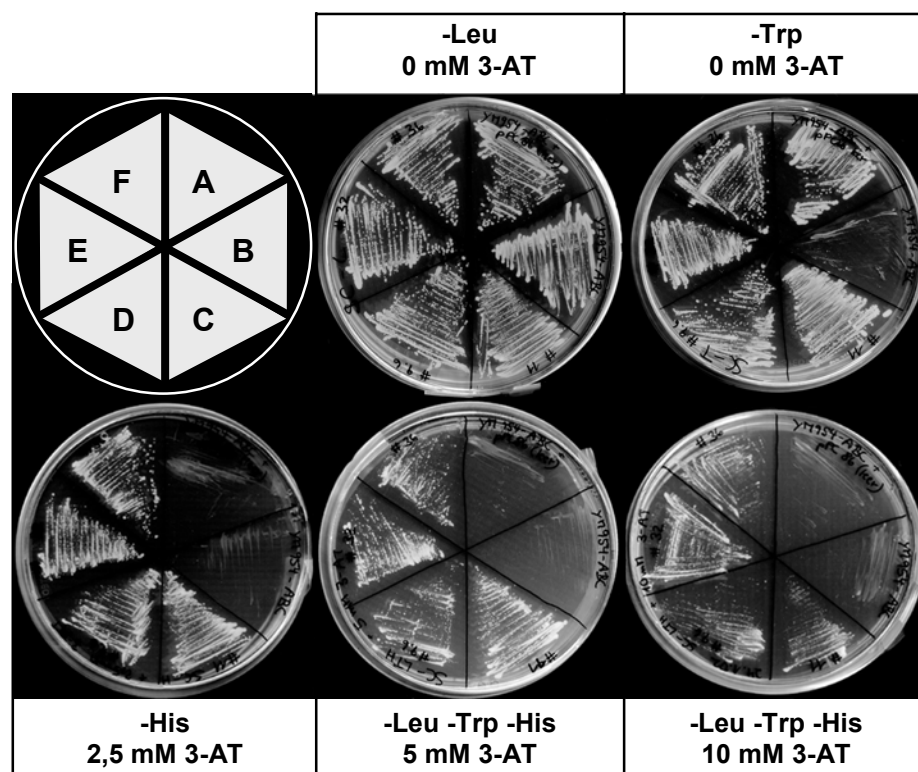


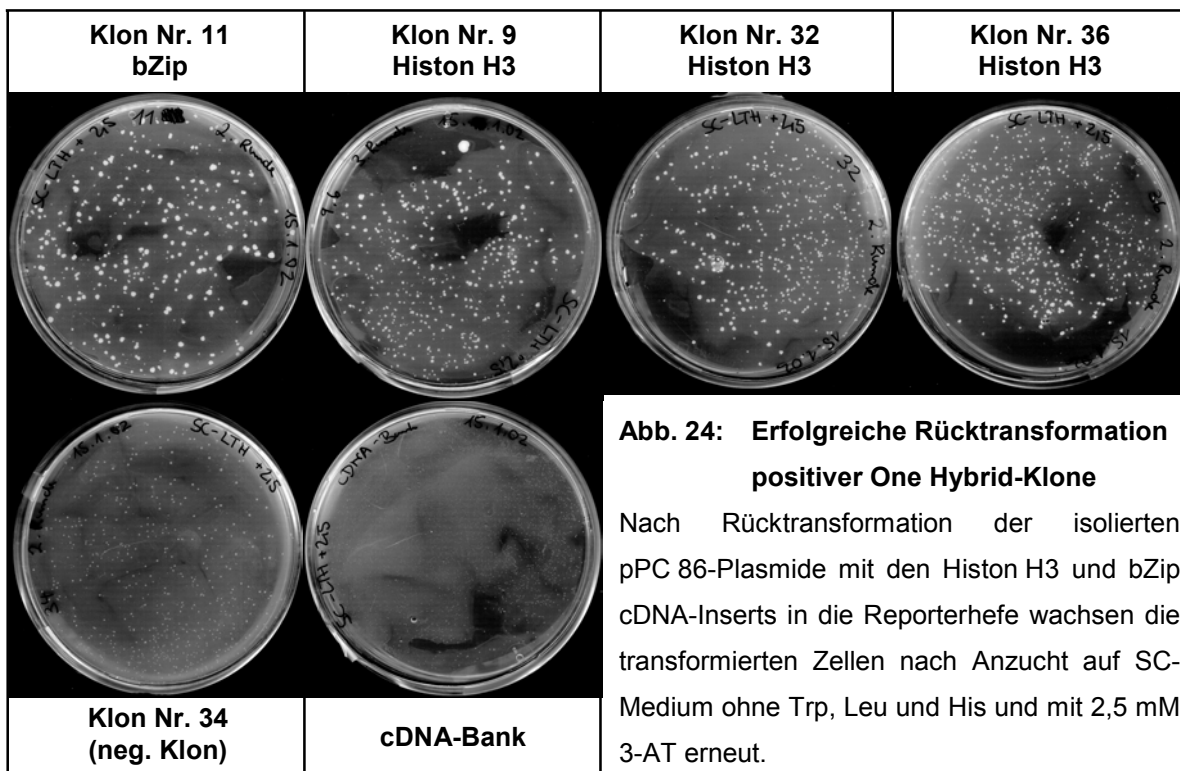
Abb: 23: Wachstum von vier verschiedenen positiven One Hybrid-Klonen auf selektivem SC-Medium

Die positiven One Hybrid-Klone Nr. 11, 9, 32 und 36 (C bis F) wachsen auf SC-Medium ohne Histidin, Leucin und Tryptophan und mit 3-AT in den angegebenen Konzentrationen. Die Buchstaben stehen für die folgenden Klone:

- A: Hefe mit pSK 1-ABC und pPC 86
- B: Hefe mit pSK 1-ABC
- C: Hefe-Klon Nr. 11 mit pSK 1-ABC und pPC 86-bZip (identisch mit Nr. 33)
- D: Hefe-Klon Nr. 9 mit pSK 1-ABC und pPC 86-Histon H3 (identisch mit Nr. 2)
- E: Hefe-Klon Nr. 32 mit pSK 1-ABC und pPC 86-Histon H3 (identisch mit Nr. 1, 12, 31)
- F: Hefe-Klon Nr: 36 mit pSK 1-ABC und pPC 86-Histon H3 (identisch mit Nr. 37)

Aus den 13 Hefen wurden die beiden One Hybrid-Plasmide als Gemisch präpariert. Die klonierten cDNAs wurden mit den Primern pPC86-16 bp und pPC86-18 bp in einer PCR amplifiziert und die aufgereinigten PCR-Produkte sequenziert. In acht von den 13 sequenzierten Klonen waren drei verschiedene Histon H3 cDNAs kloniert, zwei Klone enthielten die gleiche bZip-Transkriptionsfaktor-Sequenz, und von den cDNAs der restlichen drei Klone ließen sich Histon H4 und zwei Trockenstress-Proteine ableiten. Nur elf der 13 positiven Klone, nämlich die Histon- und die bZip-Klone, hatten die cDNA im Leseraster des Gal-Aktivators inseriert, ohne Stoppcodon in der Sequenz dazwischen.

Im nächsten Schritt wurde das Plasmid-Gemisch in elektrokompetente *E. coli DH10B* transformiert. Die Unterscheidung, ob pSK 1-ABC oder der cDNA-Vektor pPC 86 in der jeweiligen Bakterienkolonie vorlag, wurde ebenfalls mit Hilfe der PCR-Technik und den Primern pPC86-16 bp und pPC86-18 bp vorgenommen. Anschließend wurden die cDNA-Vektoren aus den PCR-positiven Klonen präpariert und wieder in die Reporterhefe YM-954-pSK 1-ABC zurück transformiert, mit 2,5 bzw. 5 mM 3-AT im Medium. Nach diesem Schritt wuchsen nur noch die Hefen, in denen entweder eine Histon H3 oder die bZip cDNA kloniert war (siehe Abb. 24). Der pPC 86-Vektor von Klon Nr. 9 wurde noch ein zweites Mal positiv rücktransformiert.



In Tab. 4 sind die Eigenschaften der isolierten Klone noch einmal zusammengefaßt. Die Sequenzen sind in Abb. 25 und 26 aufgeführt.

Tabelle 4: Charakterisierung der isolierten One Hybrid-Klone

Klon Nr.	Homologie	Gleiches Leseraster wie Gal-Aktivator?	Stoppcodon zwischen Gal-Aktivator und klonierter cDNA?	Identisch mit Klon Nr.	Wachstum nach Rücktransformation?
1	Histon H3	ja	nein	12, 31, 32	n. d.
2	Histon H3	ja	nein	9	n. d.
9	Histon H3	ja	nein	2	ja (2 mal)
11	bZip-Transkriptionsfaktor	ja	nein	33	ja
12	Histon H3	ja	nein	1, 31, 32	n. d.
31	Histon H3	ja	nein	1, 12, 32	ja
32	Histon H3	ja	nein	1, 12, 31	ja
33	bZip-Transkriptionsfaktor	ja	nein	11	ja
34	pcC 13-62 Trockenstress-Protein	nein	nein	-	nein
36	Histon H3	ja	nein	37	ja
37	Histon H3	ja	nein	36	ja
42	Histon H4	ja	nein	-	n. d.
187	pcC 27-04, Trockenstress-Protein	nein	ja	-	n. d.

Nach der Transformation der cDNA-Bank wuchsen 13 unabhängige Hefeklone auf SC-Medium ohne Leucin, Tryptophan und Histidin und mit 2,5 mM 3-AT.

n. d. = nicht durchgeführt

Gal-Aktivator: **AT** **GCTATATAAC** **TATCTATTTCG** **ATGATGAAGA**
 FP 1,12,31,32 und 36,37 und 2,9: **M** **L Y N** **Y L F** **D D E D**

Gal-Aktivator: **TACCCACCA** **AACCCAAAA** **AAGAGGGTGG**
 FP 1,12,31,32 und 36,37 und 2,9: **T P P** **N P K** **K E G G**

GST-Histon H3 (#1)-for
OH1-for

Kl. 1,12,31,32: **GTCGACCCAC** **GCGTCCGTT** TGACAAAATC TTATAGAAGA CTCAGCAATT 50
 Kl. 36 und 37: **GTCGACCCAC** **GCGTCCG**-----
 Kl. 2 und 9: **GTCGACCCAC** **GCGTCCG**-----
 FP 1,12,31,32: S T H A S G L T K S Y R R L S N
 FP 36 und 37: S T H A S - - - - -
 FP 2 und 9: S T H A S - - - - -

Histon-GFP-for

Kl. 1,12,31,32: TCAC**TTCTAA** **TAAGAAAATG** **GCTCGTACGA** **AGCAGACAGC** **TCGCAAATCA** 100
 Kl. 36 und 37: ----- **AGAAAATG** **GCTCGTACGA** **AGCAGACAGC** **TCGCAAATCA**
 Kl. 2 und 9: CTCG**TTTCAA** **T-----ATG** **GCTCGTACCA** **AGCAAACCGC** **CCGCAAGTCG**
 FP 1,12,31,32: F T S N K K M A R T K Q T A R K S
 FP 36 und 37: - - - - E K M A R T K Q T A R K S
 FP 2 und 9: A R F N - - M A R T K Q T A R K S

Kl. 1,12,31,32: **ACTGGTGGAA** **AGGCGCCGAG** **GAAGCAACTC** **GCCACCAAGG** **CGGCGAGGAA** 150
 Kl. 36 und 37: **ACTGGTGGAA** **AGGCGCCGAG** **GAAGCAACTC** **GCCACCAAGG** **CGGCGAGGAA**
 Kl. 2 und 9: **ACCGGAGGAA** **AGGCGCCGCG** **CAAGCAGCTC** **GCCACCAAAG** **CCGCTCGCAA**
 FP 1,12,31,32: T G G K A P R K Q L A T K A A R K
 FP 36 und 37: T G G K A P R K Q L A T K A A R K
 FP 2 und 9: T G G K A P R K Q L A T K A A R K

Kl. 1,12,31,32: **ATCGGCTCCG** **ACTACTGGCG** **GTGTTAAGAA** **GCCTCACCGT** **TACCGTCCCG** 200
 Kl. 36 und 37: **ATCGGCTCCG** **ACTACCGGCG** **GTGTGAAGAA** **GCCCCACCGT** **TACCGTCCCG**
 Kl. 2 und 9: **GTCGCTCCG** **TCGTCCGGAG** **GAGTCAAGAA** **GCCCCATCGC** **TATCGTCCCG**
 FP 1,12,31,32: S A P T T G G V K K P H R Y R P
 FP 36 und 37: S A P T T G G V K K P H R Y R P
 FP 2 und 9: S A P S S G G V K K P H R Y R P

OH 9-for

Kl. 1,12,31,32: **GAACCGTGCC** **TCTCCGTGAA** **ATCCGCAAGT** **ACCAAAAGAG** **CACGGAGCTG** 250
 Kl. 36 und 37: **GAACCGTGCC** **TCTCCGTGAA** **ATCCGCAAGT** **ACCAAAAGAG** **CACGGAGCTC**
 Kl. 2 und 9: **GAACCGTGCC** **GCTTCGTGAG** **ATCCGTCGCT** **ATCAGAAGTC** **GACCGAACTT**
 FP 1,12,31,32: G T V A L R E I R K Y Q K S T E L
 FP 36 und 37: G T V A L R E I R K Y Q K S T E L
 FP 2 und 9: G T V A L R E I R R Y Q K S T E L

Kl. 1,12,31,32: **CTCATACGCA** **AGCTTCCTTT** **CCAGCGATTG** **GTCCGAGAAA** **TAGCACAAGA** 300
 Kl. 36 und 37: **CTGATACGCA** **AGCTTCCTTT** **CCAGCGATTG** **GTACGAGAAA** **TAGCTCAAGA**
 Kl. 2 und 9: **CTGATCCGCA** **AACTCCCGTT** **CCAGCGTCTC** **GTCCGTGAAA** **TCGCGCAGGA**
 FP 1,12,31,32: L I R K L P F Q R L V R E I A Q D
 FP 36 und 37: L I R K L P F Q R L V R E I A Q D
 FP 2 und 9: L I R K L P F Q R L V R E I A Q D

Kl. 1,12,31,32: **TTTCAAGACC** **GATCTGAGGT** **TCCAAAGCCA** **CGCCGTGCTT** **GCCCTTCAAG** 350
 Kl. 36 und 37: **TTTCAAGACC** **GATCTGAGGT** **TCCAAAGCCA** **CGCCGTGCTT** **GCCCTTCAAG**
 Kl. 2 und 9: **CTTCAAGACC** **GATCTGCGCT** **TCCAGTCGGC** **CGCCGTGCGT** **GCTCTTCAAG**
 FP 1,12,31,32: F K T D L R F Q S H A V L A L Q
 FP 36 und 37: F K T D L R F Q S H A V L A L Q
 FP 2 und 9: F K T D L R F Q S A A V G A L Q

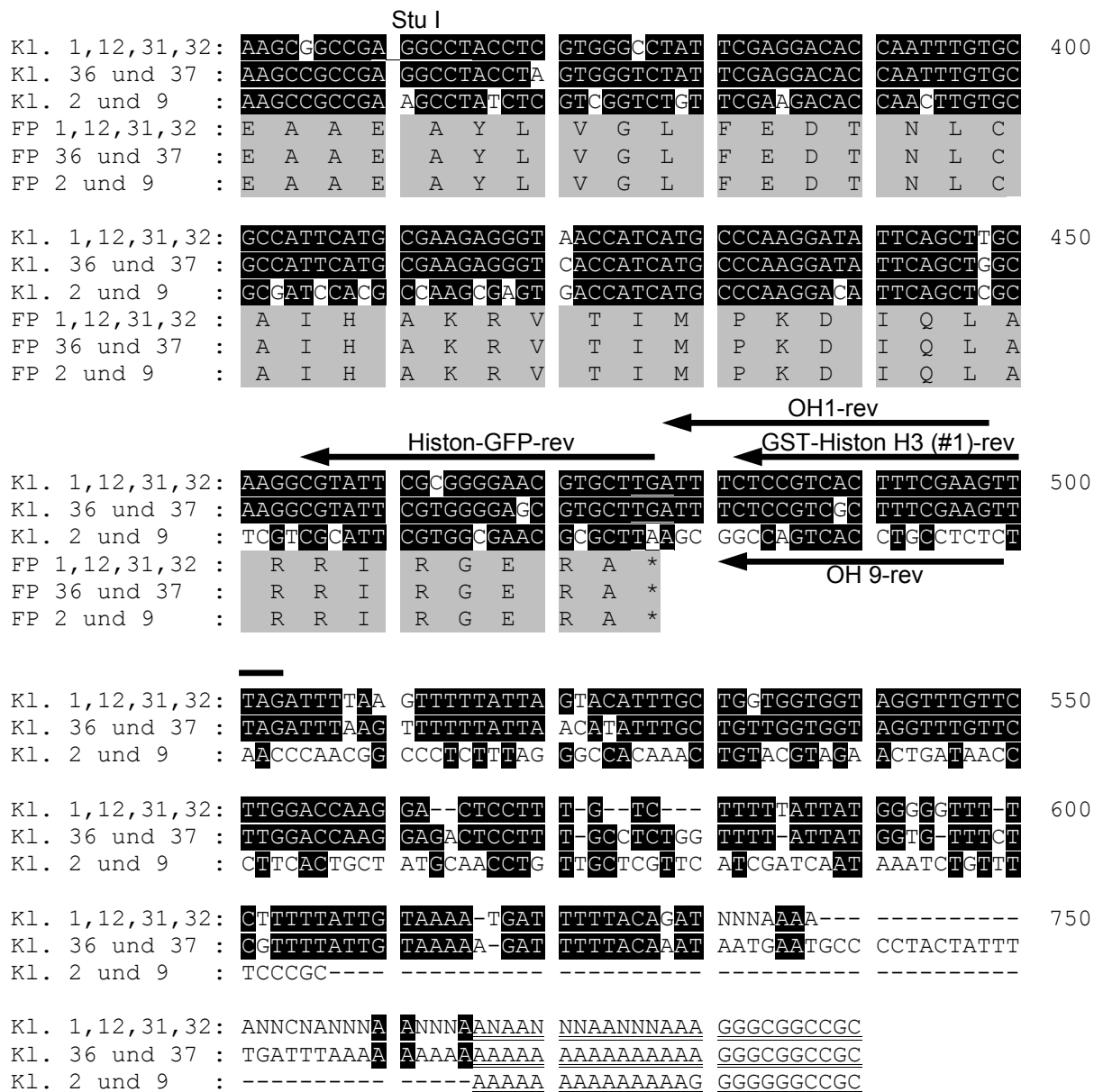


Abb. 25: Sequenzen der Histon H3 cDNA-Inserts und der daraus abgeleiteten Fusionsproteine (FP)

Im Verlauf des One Hybrid-Screens wurden acht unabhängige Klone (KI.) mit Histon H3 cDNA-Inserts isoliert. Je vier (KI. 1, 12, 31 und 32), zwei (KI. 36 und 37) und zwei (KI. 2 und 9) Klone besitzen identische Inserts. Von sechs dieser Klone (KI. 1, 12, 31, 32, 36 und 37) lässt sich auch das gleiche Histon H3-Protein ableiten. Die Histon H3-Leseraster aller Klone schließen sich ohne Stoppcodon und ohne Leserasterverschiebung an die Gal-Aktivator-Domäne an, die in Fettdruck dargestellt ist. Die Primer-Adapter mit den Sal I- und Not I-Klonierungsschnittstellen sind doppelt unterstrichen. Start- und Stoppcodons, sowie eine Stu I-Schnittstelle sind einfach unterstrichen. Übereinstimmende Nukleotide und Aminosäuren sind schwarz bzw. grau unterlegt. Primer, die an die Sequenzen der Klone 1 und 9 binden, sind als Pfeile dargestellt.

Gal-Aktivator:		<u>AT</u> <u>GCTATATAAC</u>	
FP	:	M L Y N	
Gal-Aktivator:	TATCTATTCG	ATGATGAAGA	TACCCACCA AACCCAAAAA AAGAGGGTGG
FP	:	Y L F D D E D T P P N P K K E G G	
Kl. 11 und 33:	<u>GTCGACCCAC</u>	<u>GCGTCCGCAA</u>	TAATTTCCACC AATCAGCCTT ACAGCTCCAG 50
FP	:	S T H A S A I I S P I S L T A P	
Kl. 11 und 33:	TAAATATCAC	TCAAACCCCA	CCCACCCCAA GAAATAATTT <u>CTCAAAGCCC</u> 100
FP	:	V N I T Q T P P T P R N N F S K P	
Kl. 11 und 33:	CAAAAAATCC	<u>GTCCTATGGC</u>	TACAAATCCA CGATCGACGA GCCCATTGTC 150
FP	:	Q K I R P M A T N P R S T S P L S	
Kl. 11 und 33:	AGACATCGAC	GGCGAGAGGC	AGAGGAAGCG <u>CAAGCTTTC</u> AACCGCGAAT 200
FP	:	D I D G E R Q R K R K L S N R E	
Kl. 11 und 33:	CAGCTCGAAG	GTCAAGGATG	AGGAAGCAGC AGCGCCTAGA CGAGCTCACA 250
FP	:	S A R R S R M R K Q Q R L D E L T	
Kl. 11 und 33:	GCGCAAGCGA	CTCAACTGAA	GGAAGAGAAC AAAAAGCTAA GGGAAATGAT 300
FP	:	A Q A T Q L K E E N K K L R E M I	
Kl. 11 und 33:	AGACGGGTCG	AACCAATTGT	ACCTCAGCGT TGCCTCCGAA AACAGCGTGC 350
FP	:	D G S N Q L Y L S V A S E N S V	
Kl. 11 und 33:	TTAGGGCGCA	GGCCACCGAG	CTCGCCGACC GCCTCAAGTC TTTGAACGCC 400
FP	:	L R A Q A T E L A D R L K S L N A	
Kl. 11 und 33:	CTCCTTCGAG	TTGCTTCTGA	TGTGAGCGGC CTGGCTTTTG <u>ATATCCCTGA</u> 450
FP	:	L L R V A S D V S G L A F D I P D	
Kl. 11 und 33:	TGTGCCCGAT	GCTTTGGCCG	AGCCGTTGCA GATGCCTTGC TCTGTTCTGC 500
FP	:	V P D A L A E P L Q M P C S V L	
Kl. 11 und 33:	CTATCACGGC	TTCTGCTGAC	ATGTTTCAGT <u>ATTGAAAAGA</u> GTCGGAGGGG 550
FP	:	P I T A S A D M F Q Y *	
Kl. 11 und 33:	GGAAAATGTG	AGAAAGGTAC	GATTTTGTGT TTGCTTGAGT TTTTCATGGTT 600
Kl. 11 und 33:	CGTGTAGACT	CTTATGGTTG	TGGTTTTATT TAGGTGTTTG CTTCTTGGA 650
Kl. 11 und 33:	AGTTTGTGGG	GAGCTCGTTT	TCTTACATTA ANGGTATGTT TGTGCTGTGT 700
Kl. 11 und 33:	CTGAAAGTGT	TGGAATGGGG	ATTGTAATGT AATAAGTTCG CTTATGAATC 800
Kl. 11 und 33:	GANTGTCAAAA		

Abb. 26: Sequenz des cDNA-Inserts der Klone 11 und 33 und des daraus abgeleiteten Fusionsproteins (FP)

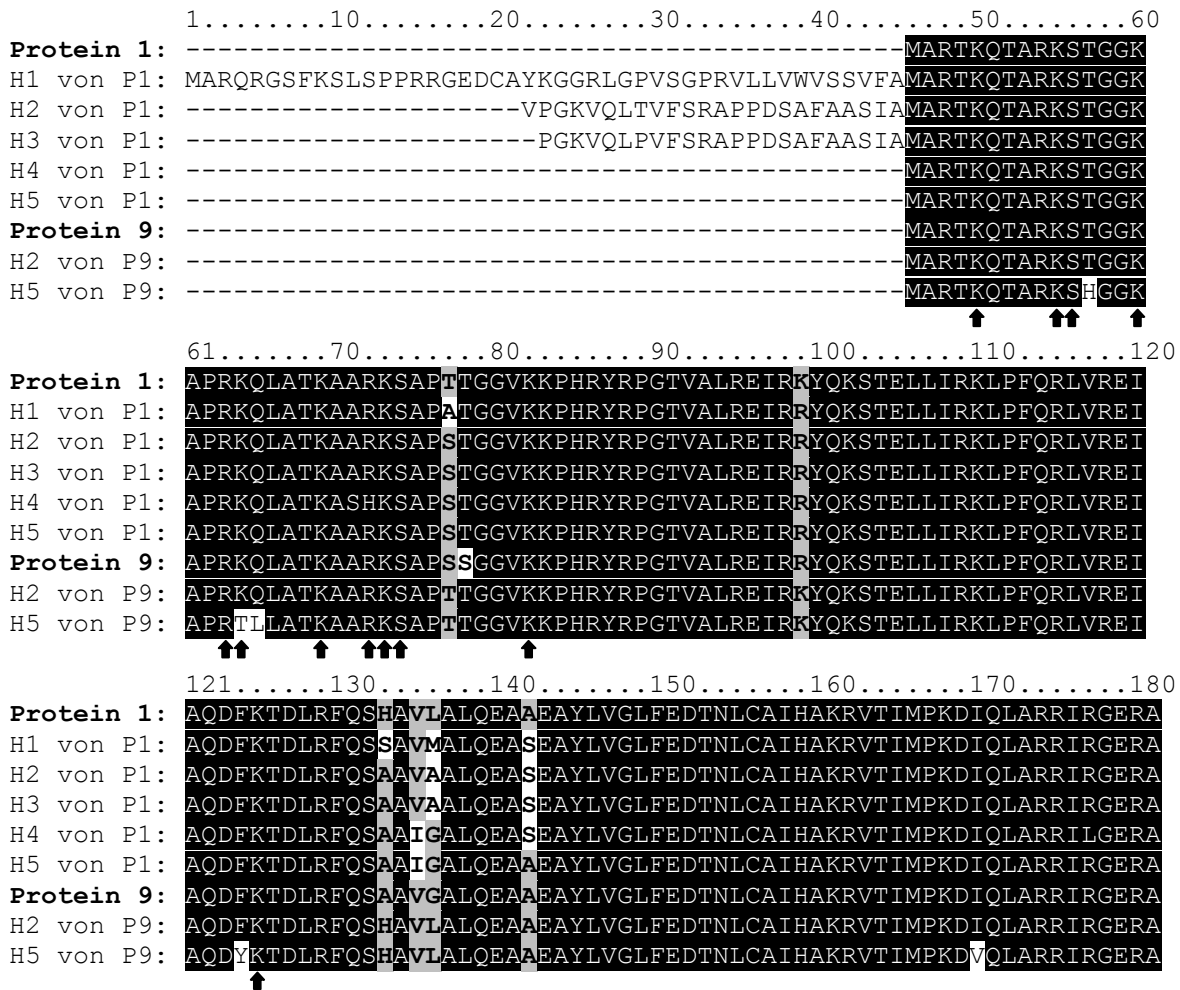
Im Verlauf des One Hybrid-Screens wurden zwei unabhängige identische Klone (Kl. 11 und 33) mit bZip-Transkriptionsfaktor-Inserts isoliert. Das bZip-Leseraster schließt sich ohne Stoppcodon und ohne Leserasterverschiebung an die Gal-Aktivator-Domäne an, die in Fettdruck dargestellt ist. Der Sal I-Primer-Adapter mit der Sal I-Klonierungsstelle ist doppelt unterstrichen, die Start- und Stoppcodons sowie zwei Restriktionsschnittstellen nur einfach. Die Pfeile markieren Primer-Bindungsstellen.

3.3.4.1. Acht der zehn Klone sind homolog zu Histon H3-Proteinen, die evolutionär stark konserviert sind

Aus den acht unabhängigen Histon One Hybrid-Klonen konnten drei verschiedene cDNAs isoliert werden (siehe Tab. 4). Aus den drei cDNA-Sequenzen wiederum lassen sich zwei unterschiedliche Proteine ableiten. Die beiden Proteine sind 136 Aminosäuren lang und stimmen nur an fünf Aminosäuren nicht überein. Ihr zu erwartendes Molekulargewicht liegt bei 15,6 kDa. PSI-BLAST-Analysen ergeben für Protein 1, abgeleitet aus den Klonen Nr. 1, Nr. 12, Nr. 31, Nr. 32, Nr. 36, und Nr. 37, größte Übereinstimmungen mit Histon 2H3C1 aus der Maus, zwei Proteinen aus der Anopheles-Mücke (agCP9426 und agCP10831), einem Histon H3B-ähnlichen Protein aus der Ratte und einem Hitze-induzierten Protein aus *Trichinella*. Das andere Craterostigma-Protein, Protein 9, das sich aus den Klonen Nr. 9 und Nr. 2 ableiten lässt, stimmt ebenfalls am besten mit dem Maus-Histon 2H3C1 überein. An zweiter Stelle steht ein Transkriptionsfaktor aus Reis, der mit einem Krankheitsresistenz-Protein verwandt ist. Anschließend folgen wieder die Proteine agCP9426 und agCP10831 aus der Anopheles-Mücke. Innerhalb der Sequenzen der beiden Craterostigma-Proteine stimmen die Sequenzen aller homologer Proteine zu mindestens 95 % mit beiden Craterostigma-Sequenzen überein. Diese Sequenzvergleiche sind in Abb. 27 dargestellt. Ein homologes Histon H3-Protein aus *Arabidopsis thaliana* folgt erst an fünfter Stelle der Protein Nr. 9-Homologe. Auf den nachfolgenden Rängen beider Craterostigma-Proteine liegen zahlreiche weitere homologe Histon H3-Proteine. Die Accession-Nummern der angegebenen Proteine sind im Anhang (siehe 6.3.) aufgelistet.

3.3.4.2. Zwei der zehn Klone weisen Homologien zu bZip-Transkriptionsfaktoren der Gruppe S auf

Von zwei der zehn One Hybrid-Klone (Nr. 11 und Nr. 33) lässt sich ein 139 Aminosäuren großes Protein ableiten, mit einem zu erwartenden Molekulargewicht von etwa 16 kDa. Die PSI-BLAST-Analyse dieses Proteins (Abb. 28) ergibt die größte Homologie zu zwei bZip-Proteinen aus dem Löwenmäulchen, bZIP-1 und bZIP-2. Mit ihnen ist das Craterostigma-Protein zu 65 % bzw. zu 64 % identisch. Dann folgt der bZip-Transkriptionsfaktor TBZF aus Tabak mit einer Übereinstimmung von 58 %. An vierter Stelle steht CPRF 6 aus Petersilie, mit dem das Craterostigma-Protein 54 % identische Aminosäuren besitzt.

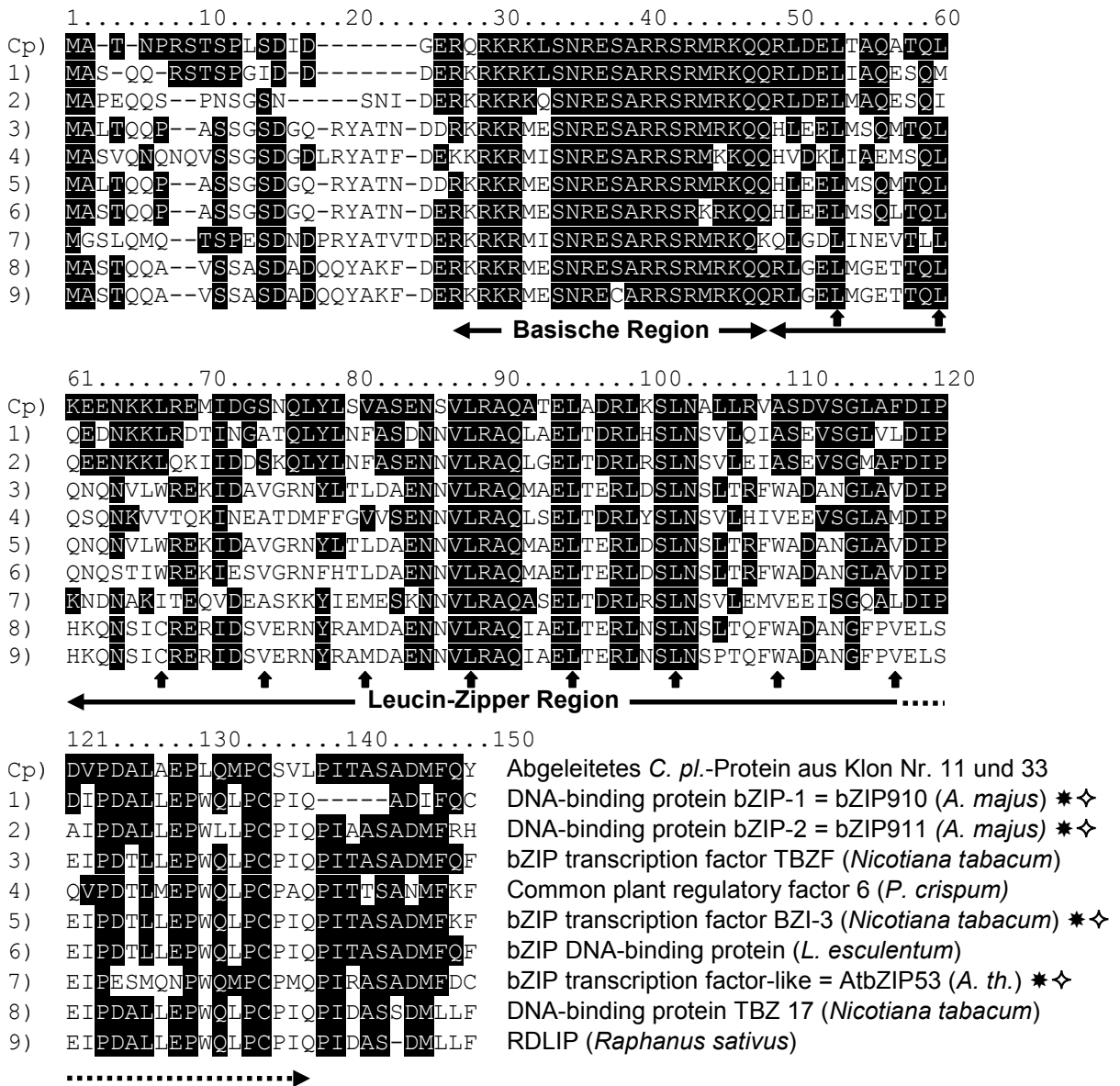


H1 von P1: Histon 2H3C1 (<i>Mus musculus</i>)	H1 von P9 = H1 von P1
H2 von P1: agCP9426 (<i>Anopheles gambiae</i>)	H2 von P9: Protein, das mit Krankheitsresistenz-Protein verwandt ist ¹
H3 von P1: agCP10831 (<i>Anopheles gambiae</i>)	(<i>Oryza sativa</i>)
H4 von P1: Histon H3B-ähnlich (<i>Rattus norvegicus</i>)	H3 von P9 = H2 von P1
H5 von P1: Histon H3.3, Hitze-induziert (<i>Trichinella pseudospiralis</i>)	H4 von P9 = H3 von P1
	H5 von P9: Putatives Histon H3 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)

Abb. 27: Alignment der homologen Histon-Proteine

Aus den drei verschiedenen Histon H3 cDNA-Sequenzen lassen sich zwei unterschiedliche Proteine ableiten. Die Klone 1, 12, 31, 32, 36, und 37 kodieren das Protein 1 (P1), während Protein 9 (P9) aus den Sequenzen der Klone 9 und 12 hervorgeht. Diese beiden abgeleiteten Histon-Proteine sind jeweils mit den fünf Proteinen, zu denen sie die größte Homologie aufweisen (H1 bis H5), aufgeführt. Die Accession-Nummern der aufgelisteten Proteine sind im Anhang angegeben. Die kleinen schwarzen Pfeile markieren potentielle N-terminale Modifizierungsstellen. Serin 10 und Serin 28 können einen Phosphatrest tragen. Lysin 9, Lysin 14, Lysin 18 und Lysin 23 können acetyliert werden, und an Lysin 4, Lysin 9, Arginin 17, Arginin 26, Lysin 27, Lysin 36 und Lysin 79 kann ein Methylrest angehängt werden (Strahl and Allis, 2000; Felsenfeld and Groudine, 2003).

¹ A. Xiong, Q. Yao, R. Peng, X. Li and H. Fan, Shanghai Academy of Agriculture Science, China, nicht publiziert



Alle weiteren homologen Proteine aus *A. thaliana* innerhalb der ersten 48:

- 10) bZIP transcription factor AtbZIP44 *◇, 11) bZIP family transcription fact. = AtbZIP2 *◇
- 17) bZIP transcription factor ATB2 = AtbZIP11 *◇, 33) bZIP family transcription factor = AtbZIP43 *
- 37) bZIP protein = ATbZIP48 *, 40) bZIP family transcription factor = AtbZIP42 *
- 41) bZIP family transcription factor = AtbZIP8 *, 46) bZIP family transcription factor = AtbZIP3 *
- 48) bZIP family transcription factor = AtbZIP1 *◇

Abb. 28: Alignment der homologen bZip-Proteine

Die kleinen Pfeile unterhalb der Sequenzen zeigen auf die hydrophoben Reste in der putativen Leucin-Zipper-Struktur des Löwenmäulchen-Proteins bZIP910. Die großen Pfeile zeigen die basische Region und die Leucin-Zipper Region an. Alle mit * markierten Proteine sind Mitglieder der Gruppe S der bZip-Proteine (Jakoby et al., 2002). Von den mit ◇ markierten Proteinen ist bekannt, dass sie eine lange 5'-Leadersequenz mit kleinen offenen Leserastern (ORFs) darin besitzen (Jakoby et al., 2002, Martinez-Garcia et al., 1998, Strathmann et al., 2001).

Auf Rang fünf folgt der bZip-Transkriptionsfaktor BZI-3 aus Tabak mit 58 % identischen Aminosäuren. Daran schließt sich ein bZip-DNA-Bindeprotein aus der Tomate an (55 % identische Aminosäuren), gefolgt von einem Arabidopsis-bZip-Protein (53 % identische Aminosäuren) und dem DNA-Bindeprotein TBZ17 aus Tabak (52 % identische Aminosäuren). An neunter Stelle steht das Rettich-Protein RDLIP, mit dem das Craterostigma-Protein zu 50 % übereinstimmt. Auf den Rängen 10, 11, 17, 33, 37, 40, 41, 46 und 48 folgen weitere homologe bZip-Proteine aus Arabidopsis. Die Accession-Nummern der aufgelisteten Proteine sind im Anhang (siehe 6.3.) angegeben. Alle in Abb. 28 aufgeführten Proteine stimmen in der basischen Domäne zu fast 100 % überein. In der putativen Leucin-Zipper-Region sind immer nur einzelne Aminosäuren oder kleinere Aminosäuregruppen hoch konserviert, darunter befinden sich mehrere Leucinreste. Wenn man die putative Leucin-Zipper-Region des Craterostigma-Proteins wie in Abb. 29 als α -Helix mit 3,6 Aminosäuren pro Umdrehung zeichnet, so beobachtet man, dass sich die Leucin-Reste auf einer Seite der Helix anhäufen.

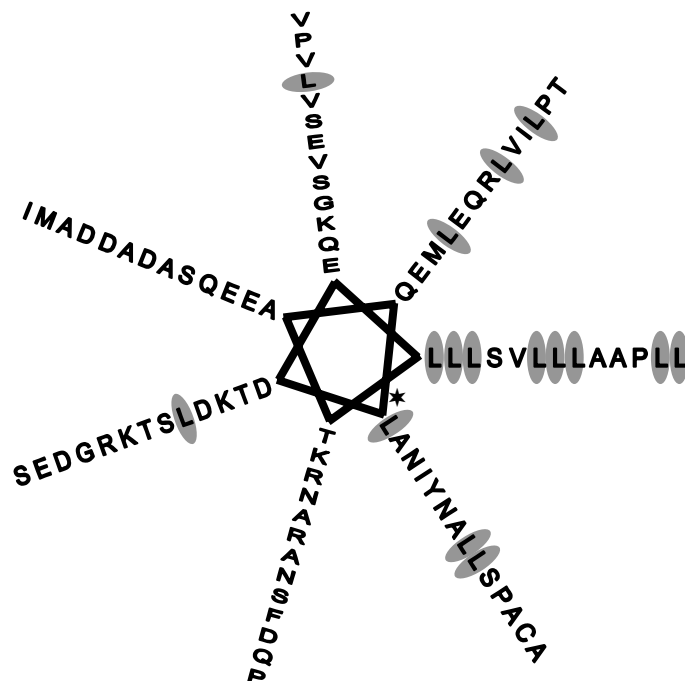


Abb. 29: 2-Dimensionale Darstellung der Leucin-Zipper-Region des Craterostigma-bZip-Proteins

Die Aminosäuren der Leucin-Zipper-Region (AS 41 bis 132) des Craterostigma-bZip-Proteins sind schematisch von innen nach außen im Uhrzeigersinn als 2-dimensionale Alpha-Helix mit 3,6 Aminosäuren pro Windung dargestellt, wobei das *-Zeichen Leucin41 markiert. Die Leucin-Reste sind grau unterlegt.

3.4. bZip und Histon H3 sind Mitglieder von Genfamilien

Zur Untersuchung, ob es sich bei den gefundenen bZip- und Histon H3-Genen um Einzelgene handelt, oder ob sie im Genom mehrfach auftreten, wurde eine genomische Southern-Analyse durchgeführt. Dazu wurde genomische DNA aus frischen *Craterostigma*-Blättern isoliert, mit zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen, die nicht innerhalb der Sondensequenz schneiden, verdaut, im großporigen Agarosegel aufgetrennt und geblottet. Die fixierte DNA wurde dann mit bZip- und Histon H3-Sonden hybridisiert, die das gesamte jeweilige Leseraster umfassten. Als bZip-Sonde diente ein 500 bp langes PCR-Fragment, das mit den Primern GST-bZIP(#11)-for und GST-bZIP(#11)-rev aus dem One Hybrid-Vektor Nr. 11 amplifiziert und mit Eco RI und Xho I an den Enden verdaut worden war. Als Histon-Sonde wurde ebenfalls ein PCR-Produkt verwendet. Hierzu wurde mit den Primern GST-Histon H3(#1)-for und GST-Histon H3(#1)-rev ein etwa 450 bp langes Fragment aus dem One Hybrid-Vektor Nr. 31 amplifiziert und an den Enden ebenfalls mit Eco RI und Xho I geschnitten¹. Die Bindungsstellen der Primer sind in Abb. 25 und 26 aufgeführt.

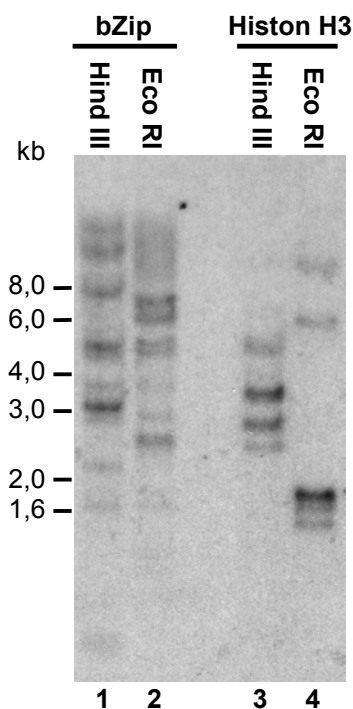


Abb. 30: Autoradiogramm eines genomischen Southern-Blots

Je 14,4 µg genomische DNA aus *Craterostigma plantagineum* wurden mit Hind III (Proben Nr. 1 und 3) bzw. Eco RI (Proben Nr. 2 und 4) restringiert, im 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Membran geblottet. Der Filter wurde anschließend zerschnitten und jeweils zur Hälfte mit einer bZip- und einer Histon H3-Sonde hybridisiert.

¹ Aliquots der Sonden-Fragmente waren vorher zur Konstruktion neuer Plasmide verwendet worden. Deshalb waren die Sonden-DNAs an den Enden verdaut.

Auf dem Autoradiogramm in Abb. 30 sieht man nach der Hybridisierung der Probe Nr. 1 mit der bZip-Sonde mehrere Banden mit einer Größe von 1,6 kb, 2,2 kb, 2,9 kb, 3,1 kb, 3,7 kb, 4,7 kb, 5,1 kb, 8,0 kb und 10,5 kb. Dabei erscheinen drei der Banden, nämlich die bei 3,1 kb, 5,1 kb und 8,0 kb, dunkler als die anderen, so dass es sich hierbei vermutlich um Doppelbanden handelt. Die mit Eco RI geschnittene zweite bZip-Probe liefert ebenfalls zwölf Hybridisierungssignale, und zwar bei 1,6 kb, 2,6 kb, 2,9 kb, 3,7 kb, 4,8 kb, 5,3 kb, 6,0 kb, 7,0 kb und 9,0 kb. Auch hier handelt es sich vermutlich bei drei dunkleren Banden mit der Größe von 2,6 kb, 6,0 kb und 7,0 kb um Doppelsignale. Aus diesem Hybridisierungsmuster lässt sich ableiten, dass es sich um eine kleine Genfamilie mit etwa 12 Mitgliedern handelt.

Nach der Detektion mit der Histon H3-Sonde lassen sich bei der Probe Nr. 3 vier Banden erkennen mit Größen von 2,5 kb, 2,8 kb, 3,5 kb und 5,0 kb. Dabei erscheinen die beiden mittleren Banden deutlich dunkler als die äußeren, so dass hier sehr wahrscheinlich wiederum Doppelbanden vorliegen. Auch die Probe Nr. 4 liefert sechs Banden (1,5 kb, 1,6 kb, 6,0 kb, 10 kb und eine Doppelbande bei 1,8 kb). Insgesamt betrachtet gehört Histon H3 somit einer kleinen Genfamilie mit sechs Mitgliedern an.

3.5. Untersuchungen zur Expression

3.5.1. Northern-Analysen

Um die Eigenschaften der isolierten One Hybrid-Proteine zu charakterisieren und dadurch Hinweise auf ihre Funktion zu erlangen, wurden zuerst Transkript-Analysen durchgeführt.

Dazu wurden verschiedene *Craterostigma*-Proben ausgetrocknet oder mit ABA bzw. NaCl behandelt. Aus diesen Proben wurde anschließend Poly(A)⁺- oder Gesamt-RNA extrahiert und für Northernblots verwendet. Die Blots wurden nacheinander mit mehreren Sonden hybridisiert. Als bZip- und Histon H3-Sonden wurden die gleichen PCR-Fragmente verwendet, die auch schon bei der genomischen Southern-Analyse (siehe 3.4.) benutzt worden waren. Ein 330 bp langes PCR-Fragment, das mit den Primern C2-for und C2-rev aus der im Anhang aufgeführten C2 cDNA-Sequenz amplifiziert wurde, diente als C2-Sonde. Neben den C2-Transkripten wurde auch nach CDeT27-45-Transkripten gesucht. CDeT27-45 (Piatkowski et al., 1990) ist wie C2 ein durch Trockenstress- und ABA-induzierbares LEA-Gen. Der Poly(A)⁺-RNA-Blot wurde außerdem mit einer R18-Sonde hybridisiert. Bei R18 handelt es sich um

einen Transkriptionsfaktor, der an den 27-45-Promotor bindet und für die ABA-abhängige Aktivierung der CDeT27-45-Transkription essentiell ist (Hilbricht et al., 2002). Zur Abschätzung der aufgetragenen RNA-Mengen wurde zuletzt das PTA-71-Fragment verwendet, das mit ribosomaler RNA hybridisiert (Gerlach and Bedbrook, 1979).

Die Hybridisierungen der Northern-Blots in Abb. 31 mit den beiden LEA-Gen-Sonden C2 und 27-45 zeigen, dass das Pflanzenmaterial durch die Vorbehandlung tatsächlich gestresst worden ist. Erwartungsgemäß lassen sich C2-Transkripte in hoher Konzentration in den mit ABA behandelten Proben nachweisen. Etwas weniger stark, aber immer noch deutlich, sind die C2-Signale in den ausgetrockneten und mit NaCl vorbehandelten Proben. Das 27-45-Transkript wird ebenfalls am stärksten nach ABA-Behandlung und Austrocknung in allen untersuchten Geweben, d. h. im Blatt, in der Wurzel und etwas schwächer im Kallus, exprimiert. Zum weiteren Vergleich ist das Transkript von CpR18 aufgeführt. Auch die R18-Transkripte werden nach ABA-Behandlung in Blatt und Kallus und in der ausgetrockneten Wurzel verstärkt synthetisiert.

Das bZip-Transkript ist insgesamt nur in sehr geringer Konzentration vorhanden. Im Gesamt-RNA-Northern erscheinen nach sechs Tagen Exposition nur sehr schwache Schatten, die aber bei allen Proben gleichmäßig schwach sind. Bei dem Poly(A)⁺-RNA-Northern sind nach fünf Tagen Exposition bei den Wurzel- und den Blatt-Proben schwache Signale zu sehen. Die Intensität dieser Banden schwankt etwas von Probe zu Probe. Aber wenn man die Intensität der bZip-Banden mit der Intensität der rRNA-Banden (Sonde PTA-71) vergleicht, dann stellt man auch beim Poly(A)⁺-RNA-Blot fest, dass das bZip-Transkript auf sehr schwachem Niveau konstitutiv in Blatt und Wurzel exprimiert wird. Im Kallus ist es nicht nachweisbar.

Im Gegensatz zum bZip-Transkript lässt sich die Histon H3-RNA sehr leicht nachweisen. Sie ist in allen untersuchten Geweben vertreten, auch im Kallus. Durch die gleichzeitige Betrachtung mit den ribosomalen RNA-Proben wird deutlich, dass Histon H3, ebenso wie bZip, konstitutiv exprimiert wird.

Ein Vergleich der Transkriptgrößen in Abb. 32 zeigt, dass das 1,7 kb lange CpR18-Transkript (Hilbricht et al., 2002) größer ist als das bZip-Transkript. Das bZip-Transkript wiederum ist größer als die fast gleich großen Transkripte von CDeT27-45 (0,9 kb Länge, Piatkowski et al., 1990) und Histon H3. Von allen untersuchten Transkripten ist das C2-Transkript das kleinste.

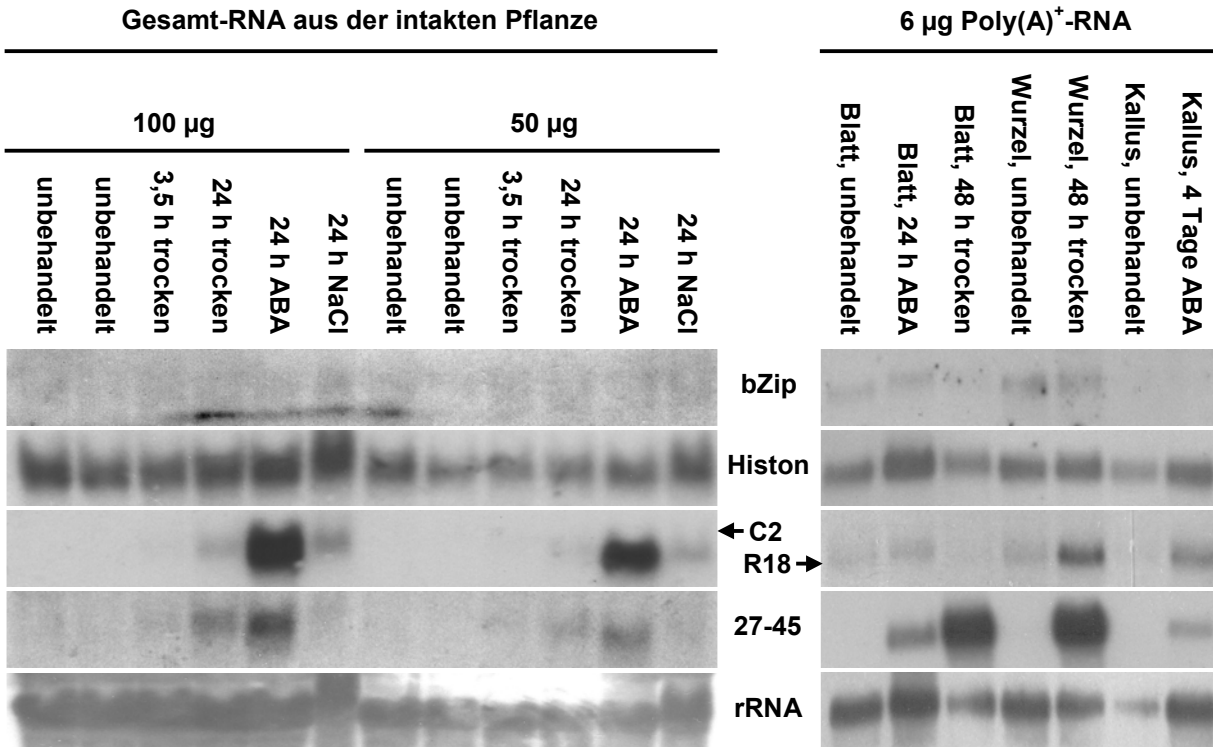


Abb. 31: Northernblots zur Charakterisierung der Expression von bZip und Histon H3

Mit verschiedenen RNA-Proben aus *Craterostigma* wurden Northernblots hergestellt, mit den folgenden Sonden hybridisiert und unterschiedlich lange exponiert.

Gesamt-RNA-Blot:

bZip:	6 Tage
Histon H3:	6 Tage
C2 (LEA-Gen):	o/n
27-45 (LEA-Gen):	5 Tage
rRNA:	o/n

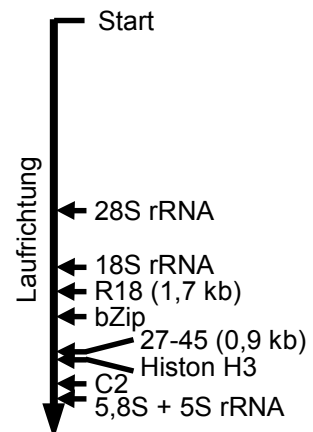
Poly(A)⁺-RNA-Blot:

bZip:	5 Tage
Histon H3:	18 Stunden
R18 (TF)	6 Tage
27-45 (LEA-Gen):	o/n
rRNA:	o/n

Die Ergebnisse des Poly(A)⁺-RNA-Blots wurden freundlicherweise von Barbara Eilts zur Verfügung gestellt. TF = Transkriptionsfaktor

Abb. 32: Transkriptgrößen

Durch Übereinanderlegen der Einzel-Autoradiogramme der beiden RNA-Blots in Abb. 31 konnten die nachgewiesenen Transkripte in Abhängigkeit von ihrer Größe relativ zueinander angeordnet werden.



3.5.2. RT-PCR

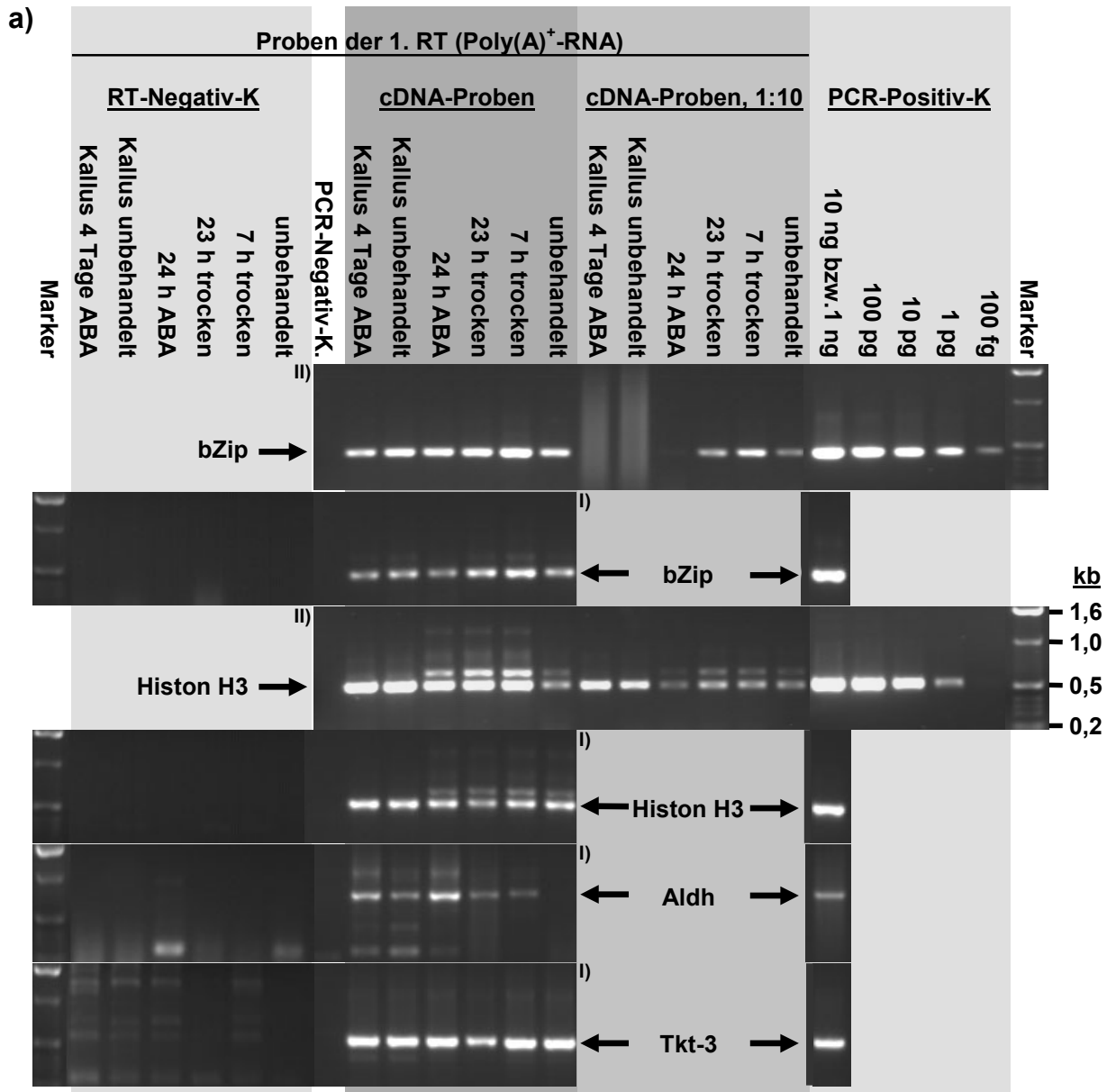
Da das bZip-Transkript anhand von Northern-Analysen nur sehr schwach nachweisbar war, wurden zusätzlich RT-PCRs durchgeführt. Mit dieser semi-quantitativen Methode können auch kleinste Mengen eines gesuchten Transkripts in einem RNA-Pool sichtbar gemacht werden. Als Ausgangsmaterial dienten Poly(A)⁺- und Gesamt-RNAs aus verschiedenen *Craterostigma*-Gewebeproben, nämlich aus Kallus (unbehandelt oder mit ABA behandelt) und aus intakten Pflanzen (frisch, mit ABA-behandelt oder getrocknet). Nach Abbau von DNA-Verunreinigungen in den Proben und nach Reverser Transkription der RNAs in cDNAs wurden die gesuchten cDNAs während einer anschließenden Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert. Als bZip-Primer dienten OH 11-for und OH 11-rev. Histon-cDNAs wurden mit den Primern OH 1-for und OH 1-rev, bzw. OH 9-for und OH 9-rev amplifiziert. Die Positionen der sechs One Hybrid-Primer sind in den Abb. 25 und 26 angegeben. Als Positivkontrolle der bZip- und der Histon-PCRs wurden die etwa 280 bp, 440 bp bzw. 520 bp langen Sequenzen auch aus den One-Hybrid-Plasmiden Nr. 9, Nr. 11 und Nr. 31 amplifiziert. Als Kontrolle für die Qualität der cDNA und als Maßstab für die spätere Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden außerdem drei weitere Gene herangezogen. Mit Hilfe der Primer Aldh-for und Aldh-rev wurde ein Trockenstress- und ABA-induziertes Aldehyd-Dehydrogenase-Transkript nachgewiesen (Kirch et al., 2001). Weiterhin amplifizierte das Primerpaar Tkt-3-for und Tkt-3-rev die cDNA der konstitutiv exprimierten Transketolase-3. Die Aldh- und Tkt-3-Primer, sowie die DNA-Vorlagen für die Positiv-Kontrollen dieser PCR-Reaktionen wurden freundlicherweise von Hans-Hubert Kirch zur Verfügung gestellt. Als Aldh-Matrize diente das Plasmid pBS-2A/2, aus dem ein 830 bp langes Fragment amplifiziert wurde. Für die Tkt-3-Positiv-Kontrolle wurde ein 600 bp langes Produkt aus einem linearen DNA-Fragment amplifiziert. Als drittes Kontroll-Transkript wurde C2 mit den Primern C2-for und C2-rev amplifiziert. Die Bindungsstellen der C2-Primer sind im Anhang (6.2.1.) zu finden. Als Positiv-Kontrolle für die C2-Amplifikation wurde ein genomischer Klon verwendet, pC2X5, so dass das zu erwartende Kontroll-PCR-Produkt, aufgrund der enthaltenen Intronsequenz (siehe Abb. 10) etwa 100 bp größer ausfällt als das amplifizierte C2-Transkript.

An die Reverse Transkription schlossen sich mehrere PCRs an (Abb. 33, Teile a und c). Der Versuch, mit den sechs Primerpaaren aus den RT-Negativ-Kontrollen PCR-

Produkte zu amplifizieren, schlug bei allen Proben erwartungsgemäß fehl, was beweist, dass in den RT-Proben keine genomische DNA mehr enthalten ist.

Die Amplifikation der Tkt-3 cDNA zeigt, dass in allen positiven RT-Proben etwa gleich viel cDNA vorhanden ist. Das Intensitätsniveau der ALDH-Signale fällt insgesamt deutlich geringer aus als bei den Tkt-3-Proben, dennoch lässt sich ein differentielles ALDH-Bandenmuster beobachten. Während die Probe, die aus unbehandelten Pflanzen stammt, erwartungsgemäß überhaupt kein Signal liefert, ist in dem getrockneten oder mit ABA behandelten Material ALDH-cDNA vorhanden. Vergleicht man die Signalstärken der beiden ausgetrockneten ALDH-Proben miteinander, so enthält die Probe, die vom länger ausgetrockneten Ausgangsmaterial abstammt, durchweg mehr Transkripte als die Probe, der nur 7 h ausgetrocknete Pflanzen zugrunde lagen (Abb. 33, Teile b und d). Das letzte Kontrollgen, C2, wird zum Teil ähnlich stark exprimiert wie Tkt-3. Auch bei dieser Testreihe ist in den Proben, die aus unbehandeltem Pflanzenmaterial extrahiert worden sind, durchweg deutlich weniger oder gar keine C2 cDNA vorhanden, während ABA-Behandlung und Austrocknung zu starken Signalen führen. Insgesamt betrachtet liefern somit die ALDH- und die C2-Kontrollen das erwartete differentielle Bandenmuster, wodurch deutlich wird, dass sich die cDNA-Pools je nach Vorbehandlung des verwendeten Pflanzenmaterials voneinander unterscheiden.

Im Gegensatz zu allen anderen Testreihen und der Positiv-Kontrolle lässt sich Histon H3 Nr. 9 cDNA reproduzierbar in keiner Probe nachweisen. Bei Betrachtung der Histon H3 Nr. 1-Ergebnisse beobachtet man bei allen Proben recht einheitliche Signale. Dies bedeutet, dass dieses Transkript konstitutiv exprimiert wird. bZip-Transkripte lassen sich ebenfalls in allen untersuchten Proben amplifizieren. Dabei fällt bei allen bZip-Testreihen auf, dass sich aus der Probe, die aus 3,5 h oder 7 h getrockneten Pflanzen hergestellt wurde, tendenziell etwas mehr bZip cDNA amplifizieren lässt als aus der unbehandelten Kontrolle. Somit zeigt die RT-PCR, dass bZip auf einem gewissen Grundniveau konstitutiv exprimiert wird. Möglicherweise jedoch bewirkt Trockenstress eine leichte zusätzliche Induktion der bZip-Transkription.



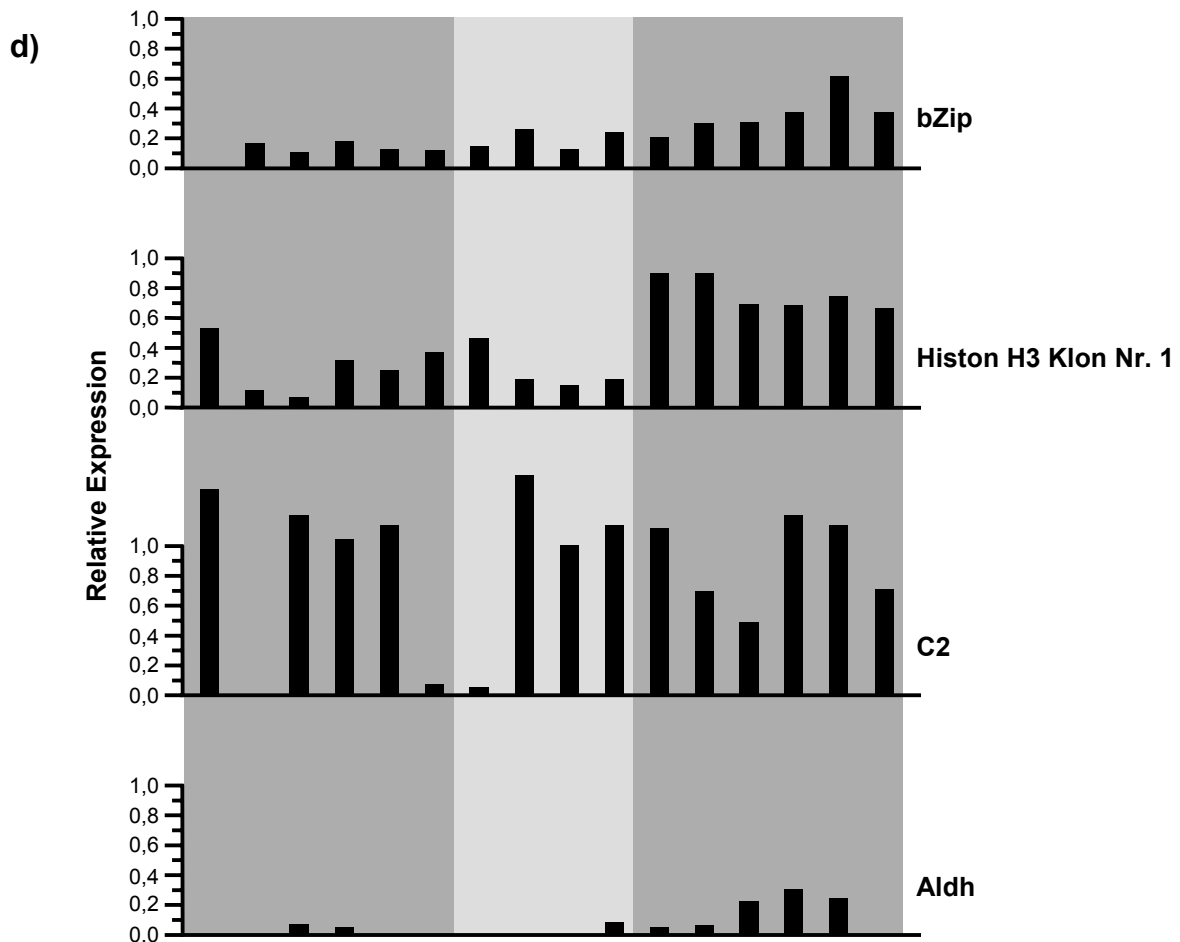
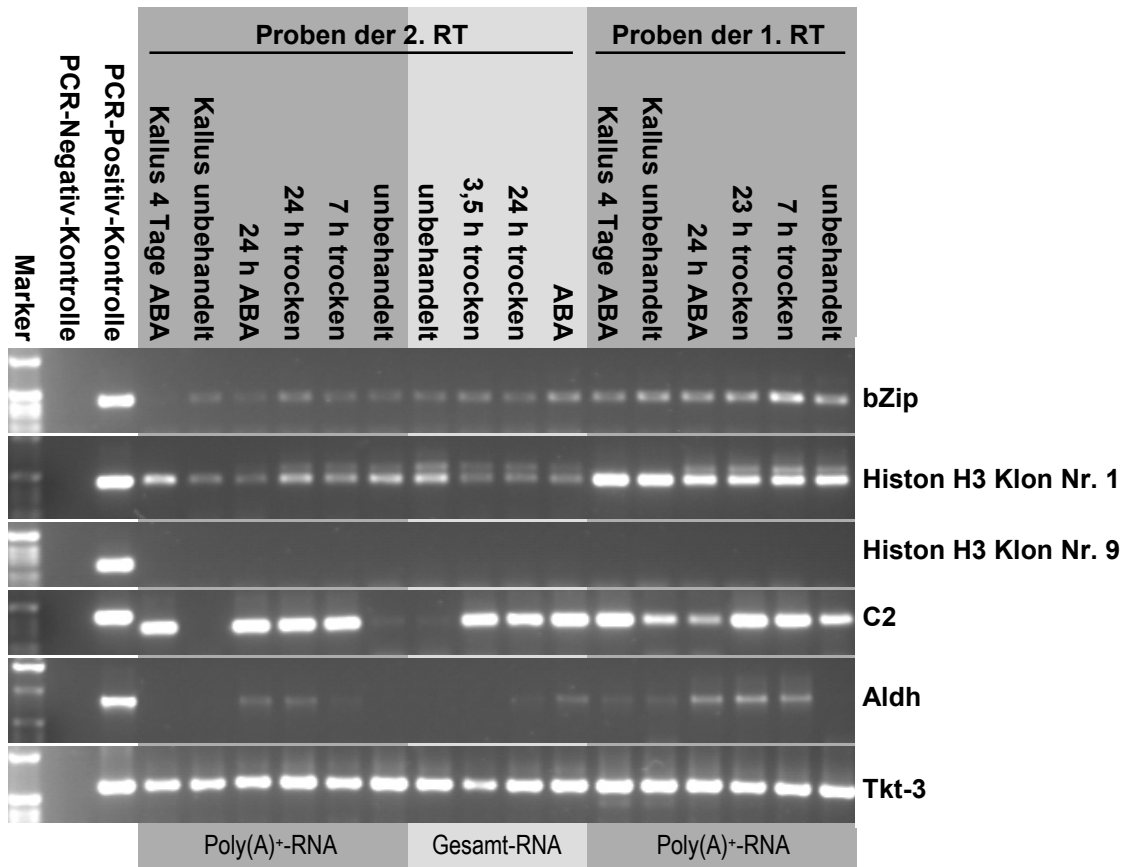


Abb. 33: RT-PCR von bZip und Histon H3

Aus verschiedenen Craterostigma-Proben (Kallus und ganze Pflanzen) wurde Poly(A)⁺- und Gesamt-RNA extrahiert und in zwei voneinander unabhängigen Versuchen in cDNA umgeschrieben (1. RT und 2. RT). Mittels PCR wurden aus den verschiedenen Pools die cDNAs von bZip und Histon H3 (Klone Nr. 1 und Nr. 9) amplifiziert, sowie zum Vergleich die cDNAs der Stress-induzierten Aldehyd-Dehydrogenase (Aldh), der konstitutiv exprimierten Transketolase-3 (Tkt-3) und des LEA-Gens C2.

Das Agarosegel **a)** zeigt die Ergebnisse zweier PCR-Versuche (I und II) mit gleichen Versuchsansätzen aber leicht abgeänderten PCR-Programmen (Programm I: $T_a = 56\text{ }^\circ\text{C}$, 37 Schleifen, Programm II: $T_a = 56\text{ }^\circ\text{C}$, 35 Schleifen). Für die PCR-Positiv-Kontrollen von PCR I wurden von den Tkt-3- und Aldh-Matrizen je 10 ng eingesetzt, von bZip und Histon H3 je 1 ng. Die folgenden PCR-Proben-Volumina wurden auf das Agarosegel aufgetragen:

- RT-Negativ-Kontrolle: 20 μl
- PCR-Negativ-Kontrolle, cDNA-Proben und PCR-Positiv-Kontrolle (PCR I): 4,5 μl
- cDNA-Proben und PCR-Kontrollen (PCR II): 10 μl

Teilabbildung **c)** zeigt die Agarosegele des PCR-Versuchs III, der analog zu PCR II durchgeführt worden ist. Je 4,5 μl des PCR-Ansatzes wurden auf das Gel aufgetragen

Für die Diagramme **b)** und **d)** wurden die Intensitäten der RT-PCR-Banden aus den PCR-Versuchen I und III mit dem Programm ImageJ 1.29x (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) über die Flächeninhalte miteinander verglichen und in Relation zur jeweiligen konstitutiv exprimierten Tkt-3-Kontrolle dargestellt.

3.6. Histon H3 und bZip werden im Nukleus exprimiert

Um zu untersuchen, in welchem Zellkompartiment die beiden One Hybrid-Proteine bZip und Histon H3 exprimiert werden, wurden ihre Leseraster in den pflanzlichen Expressionsvektor pCK-GFP-S65C kloniert (Abb. 34). Dazu wurde das bZip-Fragment mit den Primern bZIP-GFP-for und bZIP-GFP-rev aus dem One Hybrid-Plasmid Nr. 11 und das Histon H3-Fragment mit den Primern Histon-GFP-for und Histon-GFP-rev aus dem One Hybrid-Plasmid Nr. 31 amplifiziert. Bei der Konstruktion der Reverse-Primer wurde darauf geachtet, dass das ATG in der Nco I-Schnittstelle im bZip- bzw. Histon-Leseraster und stromaufwärts des jeweiligen Stoppcodons lag. Die Bindungsstellen der Primer sind in Abb. 25 und 26 angegeben. Anschließend wurden die PCR-Produkte mit Nco I verdaut und ungerichtet in die Nco I-Restriktionsschnittstelle des linearisierten und dephosphorylierten pCK-GFP-S65C-Vektors kloniert. Mit Hilfe asymmetrischer Doppelverdau wurden Plasmide identifiziert, die das jeweilige Fragment in der richtigen Orientierung beinhalteten. Zusätzlich wurde das korrekte Leseraster in beiden Konstrukten durch Sequenzierung bestätigt.

Mit diesen Konstrukten wurden *Craterostigma*-Blätter beschossen und in Leitungswasser inkubiert. Während dieser Zeit wurden die bZip-GFP- bzw. Histon H3-GFP-Fusionsproteine unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors exprimiert. Grün-fluoreszierende Zellen wurden fotografiert (siehe Material und Methoden).

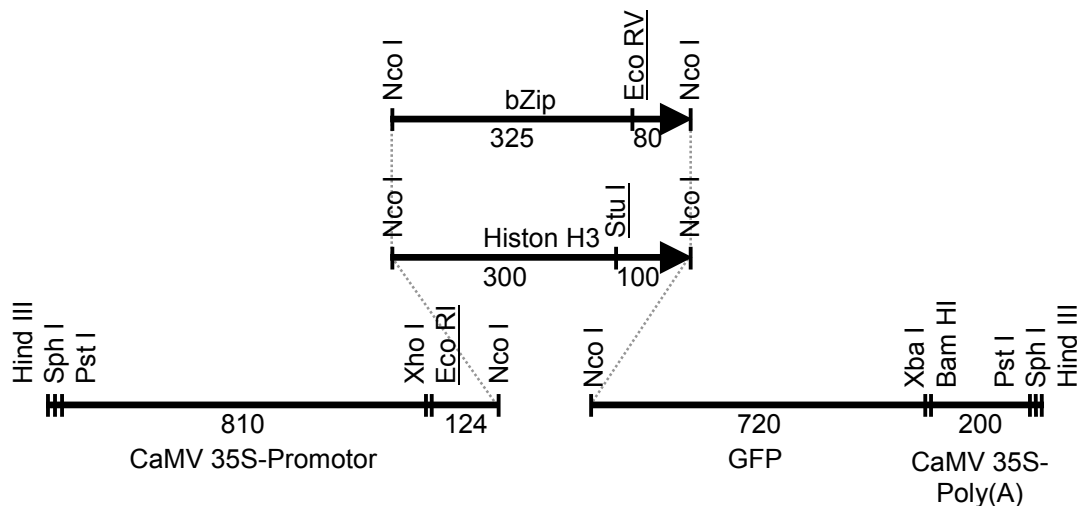
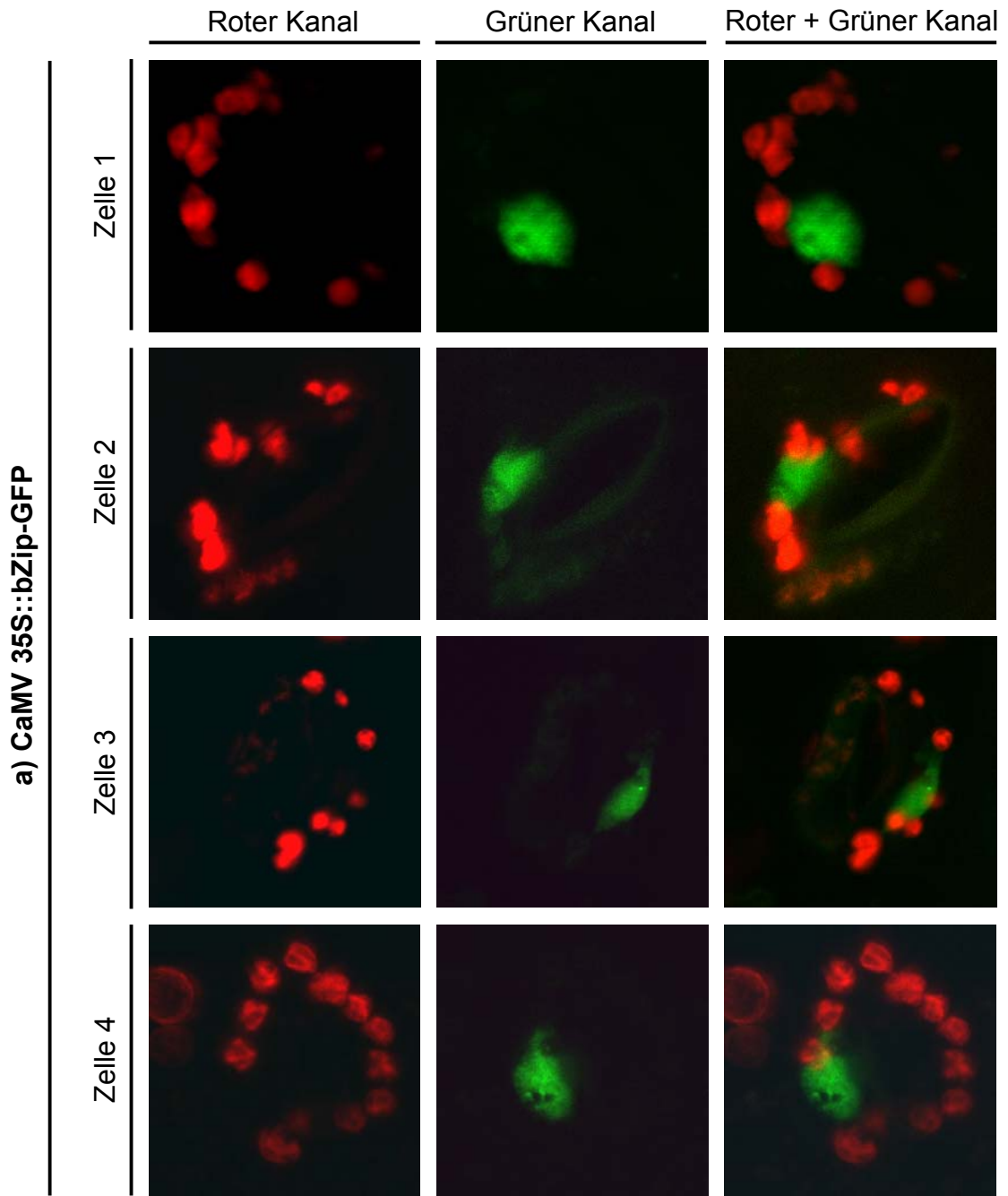


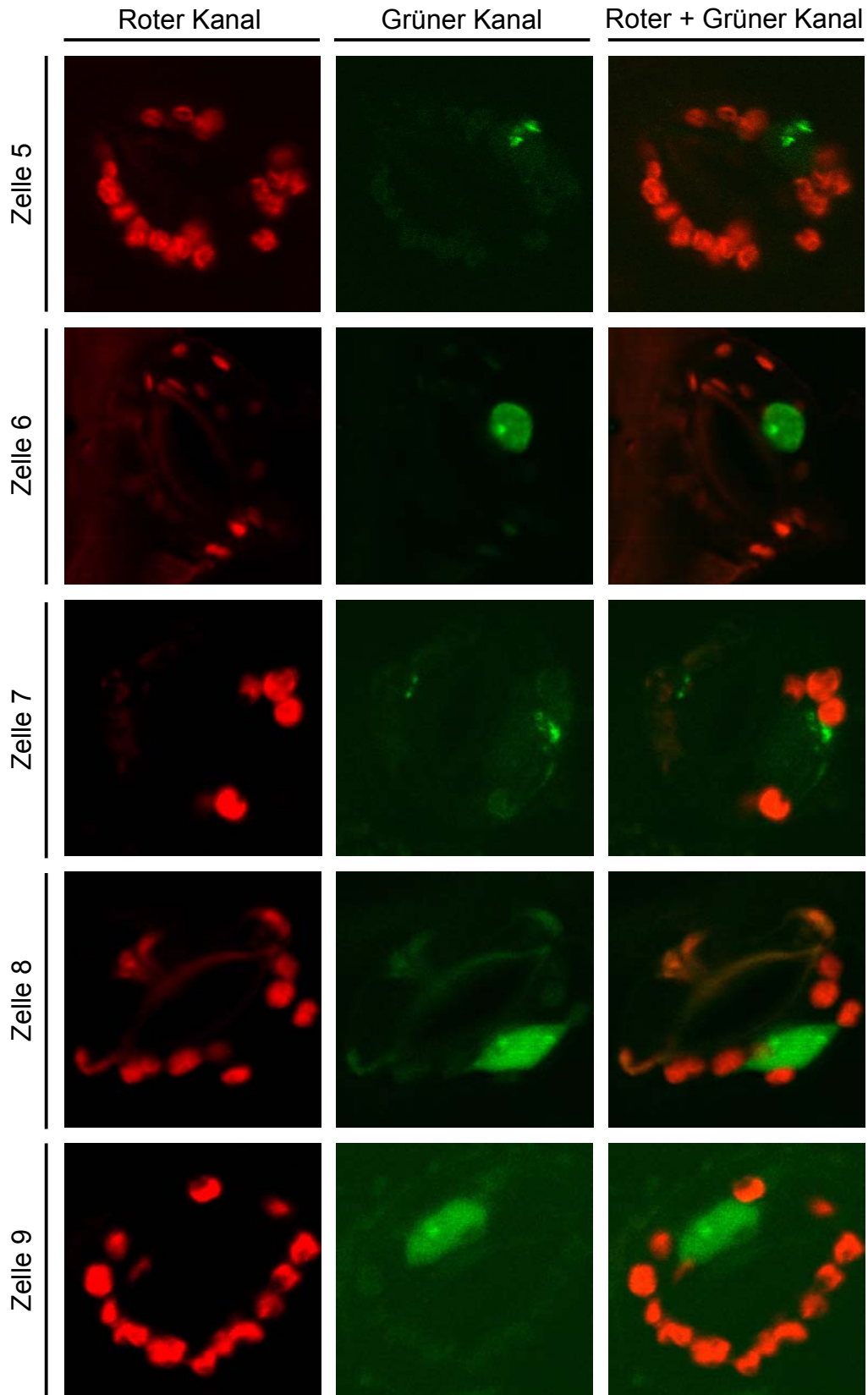
Abb. 34: Klonierung des bZip- und des Histon H3-Leserasters in den pflanzlichen Expressionsvektor pCK-GFP-S65C

Ein bZip- bzw. ein Histon H3-PCR-Fragment wurde jeweils ungerichtet in die *Nco* I-Schnittstelle des Vektors pCK-GFP-S65C ligiert. Die Pfeile zeigen die richtige Orientierung an. Durch Doppelverdau mit den unterstrichenen Restriktionsenzymen konnte die Orientierung der inserierten Fragmente ermittelt werden. Die Zahlen geben an, wie viele Basenpaare zwischen den eingezeichneten Schnittstellen liegen.

Die Aufnahmen der CaMV 35S::GFP-Kontrolle (Abb. 35, Teil c) zeigen, dass das Grün-Fluoreszierende-Protein (GFP) kein Signalpeptid trägt und somit im Cytosol akkumuliert. Im Gegensatz dazu werden sowohl das bZip-GFP-Konstrukt (Abb. 35, Teil a) als auch das Histon-GFP-Konstrukt (Abb. 35, Teil b) im Kern der Zelle exprimiert, so dass diese beiden Proteine nukleäre Signalsequenzen besitzen müssen. Dabei sieht es in einigen Zellen (Nr. 3, Nr. 5, Nr. 6, Nr. 7, Nr. 8 und Nr. 9) danach aus, als seien die Fusionsproteine nicht gleichmäßig im Nukleus verteilt, sondern in bestimmten Bereichen angehäuft.



b) CaMV 35S::Histon H3-GFP



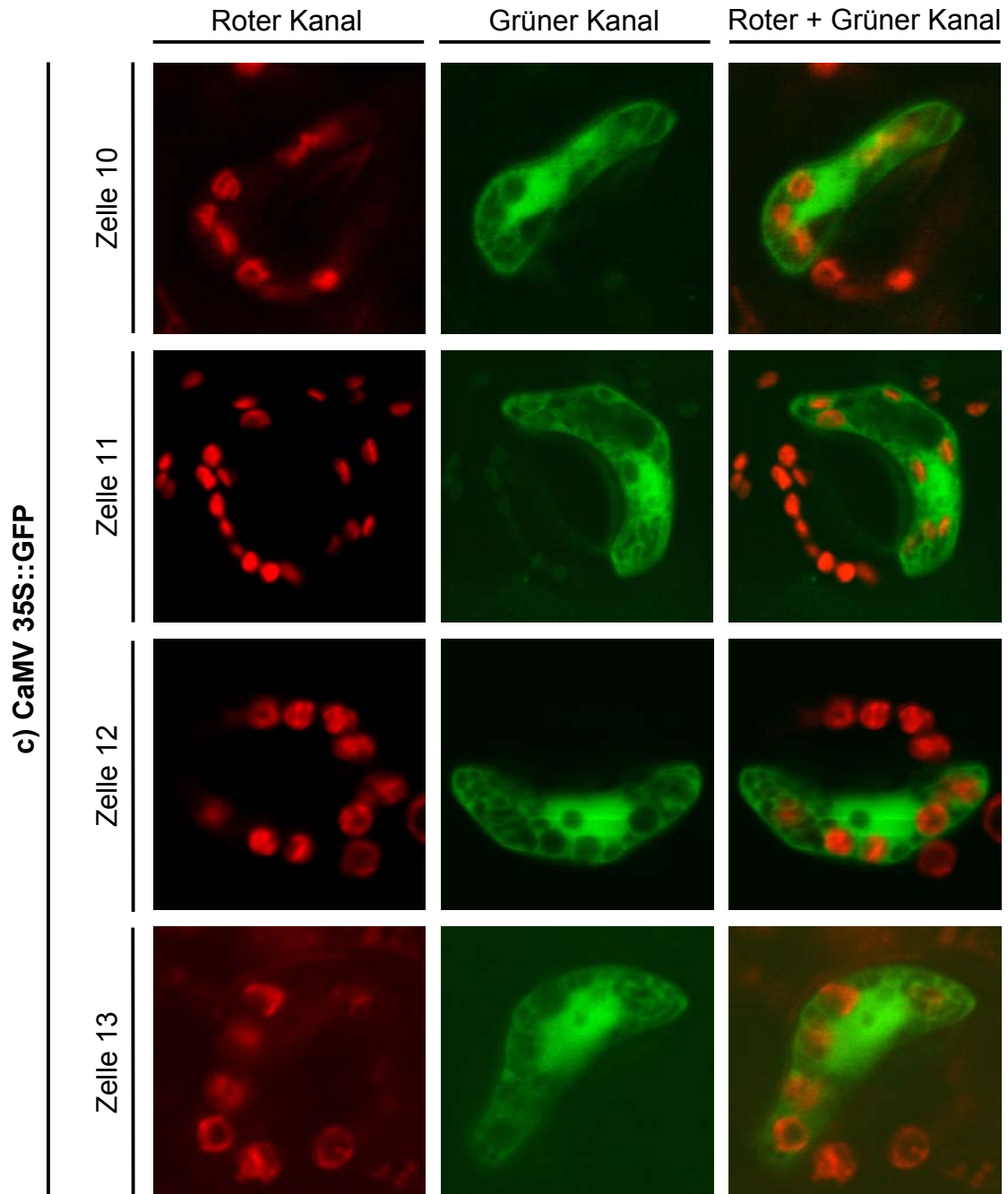


Abb. 35: Subzelluläre Lokalisation von bZip und Histon H3 im Nukleus

Schließzellen der oberen Blattepidermis wurden mit

- a) CaMV 35S::bZip-GFP-Konstrukten,
- b) CaMV 35S::Histon H3-GFP-Konstrukten oder
- c) CaMV 35S::GFP-Konstrukten

beschossen. Nach 14-20 Stunden Inkubation in Wasser wurden sie mit einem konfokalen Lasermikroskop betrachtet. Das Autofluoreszenz-Licht der Chloroplasten und das grüne GFP-Fluoreszenz-Licht wurden in zwei getrennten Kanälen gespeichert, die hier einzeln und in Kombination gezeigt sind. Pro Zelle ist immer nur eine Ebene dargestellt.

3.7. Das bZip-Protein lässt sich in *E. coli* nicht exprimieren

Um mehr über die Eigenschaften der beiden One Hybrid-Proteine zu erfahren und um in EMSA-Experimenten zu zeigen, dass bZip und Histon H3 auch tatsächlich an den C2-Promotor binden, sollten bZip- und Histon H3-GST-Fusionsproteine aufgereinigt werden. Dazu wurden die beiden Leseraster mit den Primern GST-bZIP(#11)-for und GST-bZIP(#11)-rev bzw. GST-Histon H3(#1)-for und GST-Histon H3(#1)-rev aus den beiden One Hybrid-Plasmiden Nr. 11 und Nr. 31 amplifiziert. Bei der Konstruktion der Forward-Primer musste darauf geachtet werden, dass in den PCR-Produkten das jeweilige ATG-Startcodon in demselben Leseraster vorlag wie das GST-Protein im Expressionsvektor pGEX 5X-1. Außerdem durfte kein Stoppcodon zwischen dem GST- und dem bZip- bzw. Histon H3-Leseraster eingefügt werden. Die PCR-Produkte wurden an den Enden verdaut und über Eco RI und Xho I gerichtet in die multiple Klonierungsstelle des pGEX 5X-1-Vektors ligiert und in *E. coli* BL-21 und TG-2 elektroporiert. Zur Kontrolle, ob in den pGEX-Plasmiden der gepickten Kolonien ein bZip- oder Histon-Leseraster inseriert war, wurden DNA-Minipräparationen durchgeführt. Schon hierbei fiel auf, dass sich aus den positiven bZip-Klonen nur sehr wenig DNA isolieren ließ. Im nächsten Schritt wurde die Expression der GST-Fusionsproteine in den positiven Klonen induziert. Das Histon-Fusionsprotein ließ sich ohne Probleme überexprimieren. Dabei lag das gesuchte Protein überwiegend in Einschlusskörpern vor (Abb. 36). Bei bZip-Zellen war es nicht möglich, das gesuchte GST-bZip-Fusionsprotein zu erhalten. Obwohl die Bedingungen mehrfach variiert wurden, wuchsen die Klone entweder nicht, oder sie exprimierten nicht das gewünschte Protein. Die Vorkultur wurde bei 37 °C oder 32 °C angezogen. Als Anzuchttemperatur der 1:10 verdünnten Hauptkultur wurden alternativ 37 °C, 30 °C oder 27 °C ausprobiert. Die IPTG-Induktion wurde mit 1 mM und 0,1 mM Lösung versucht. Zuletzt wurden frisch transformierte Kolonien von der Platte gepickt und nach kurzer Anzucht ohne Vorkultur direkt induziert. Keine Kombination der oben genannten Parameter führte zur Überexpression von GST-bZip-Fusionsprotein.

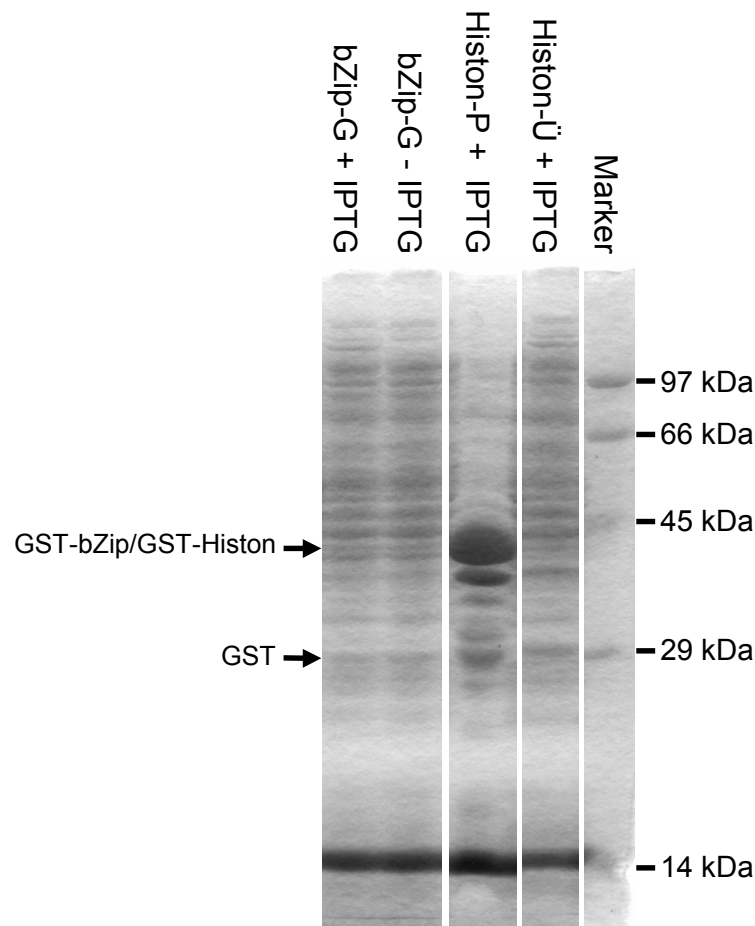


Abb. 36: IPTG-Induktion von *E. coli* BL-21 zur Überexpression von GST-bZip- und GST-Histon H3-Fusionsproteine

Mit pGEX 5X-1-bZip und pGEX 5X-1-Histon transformierte *BL-21*-Zellen wurden mit 1 mM IPTG induziert und angezogen (GST-bZip: 30 °C, 2 h Anzucht, GST-Histon: 37 °C, 2 h). Protein-Extrakte dieser Proben wurden im 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen (G = Gesamtprotein, Ü = lösliches Protein im Überstand, P = in Einschlusskörpern gebundenes Protein im Pellet).

Die Pfeile markieren die Stellen, an denen die gesuchten Proteine zu erwarten sind (GST: 28 kDa, GST-Histon und GST-bZip: je 43 kDa).

3.8. Bindungsstudien mit Proteinextrakten aus der Hefe

Um zu untersuchen, ob die positiven One Hybrid-Proteine spezifisch an das DNA-Fragment binden, mit dem sie aus der Genbank isoliert worden sind, wurden EMSAs durchgeführt. Da es jedoch nicht möglich war, das bZip-Protein in *E. coli* zu exprimieren, wurden einheitlich Gesamt-Proteinextrakte aus den positiven Hefe-Klonen Nr. 11 (bZip) und Nr. 9 (Histon H3) verwendet. Zum Nachweis, dass mögliche Signale spezifisch von den Craterostigma-Proteinen herrührten, wurden parallel Protein-Extrakte aus einem Kontroll-Hefe-Klon untersucht, der sich nur dadurch von

den Klonen Nr. 11 und 9 unterschied, dass in seinem pPC 86-Plasmid keine cDNA inseriert war. Als Sonden wurden vier C2-Promotorfragmente verwendet. Die knapp 90 bp langen Fragmente 86-1 und 86-4 wurden mit Hind III und Sal I aus den Plasmiden p86-1 und p86-4 isoliert, während die beiden etwa 250 bp langen Fragmente A17-Sal und H mit Sal I und Eco RI aus den Plasmiden pA17-Sal und pH geschnitten wurden (siehe Abb. 14). Bei 86-1 und A17-Sal handelt es sich um verschieden lange Fragmente des originalen C2-Promotors. Dagegen sind bei 86-4 und dem H-Fragment die beiden Non-ACGT-ABRE und das HDZip-Bindemotiv mutagenisiert.

Für die Bindungsstudien wurden entweder 25 µg bZip- oder Histon H3-Hefe-Extrakt oder je 25 µg von beiden Extrakten zusammen mit einem der vier DNA-Fragmente inkubiert und im Gel aufgetrennt. Die Autoradiographien sind in Abb. 37 dargestellt.

Bei der Betrachtung der Filme fällt auf, dass die freie Probe und die Proteine der Kontroll-Hefe keine retardierten Banden verursachen, so dass sich verzögerte Banden auf die beiden Craterostigma-Proteine in den bZip- und Histon-Hefe-Extrakten zurückführen lassen. Bei den EMSAs mit den kurzen Promotor-Fragmenten 86-1 und 86-4 sieht man, dass bZip und Histon H3 alleine und in Kombination an beide Fragmente binden. Auf diesem Röntgenfilm sind bei jeder der bZip- und Histon-Proben zwei nahe beieinander liegende retardierte Banden zu sehen. Dabei scheint es keinen Unterschied zu machen, ob die drei mutmaßlichen regulatorischen Promotor-Motive intakt oder mutagenisiert vorliegen. Die Konkurrenz mit unmarkierter DNA ist nicht eindeutig. Im Parallelansatz mit im Überschuss zugegebener unmarkierter 86-1- und 86-4-DNA erscheinen die verzögerten Banden heller. Hier könnten die unmarkierten DNA-Fragmente der radioaktiv markierten Probe einen Teil der Bindeproteine entzogen haben, so dass weniger des sichtbaren Protein-DNA-Komplexes vorhanden ist. Trotz 300-facher Konkurrenz gelingt es nicht, die Signale völlig zu eliminieren.

Die beiden 250 bp langen Fragmente A17-Sal und H scheinen ebenfalls von den Craterostigma-Proteinen gebunden zu werden. Hier lässt sich das stärkste Signal beobachten, wenn bZip- und Histon-Extrakte in Kombination zugegeben werden. Bei diesen beiden Ansätzen lassen sich die Signale durch Zugabe von unmarkierter DNA abschwächen aber nicht völlig kompetitieren.

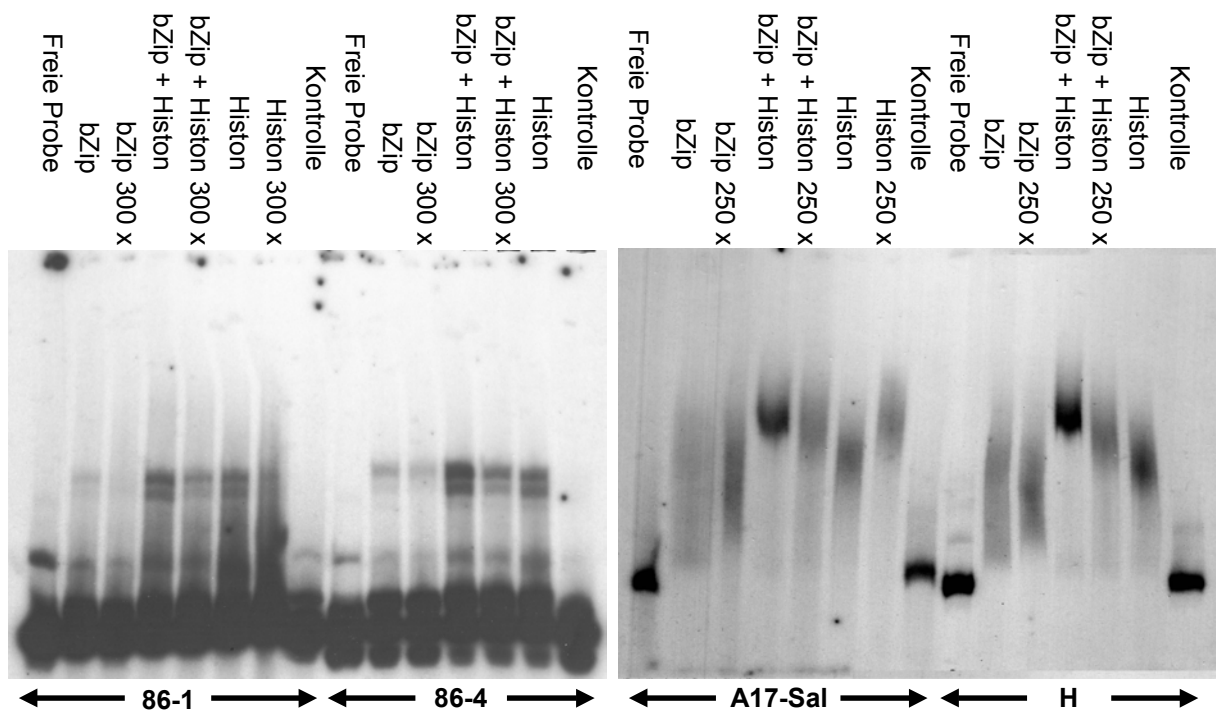


Abb. 37: Autoradiographien von Bindungsstudien mit Gesamtproteinextrakten aus One Hybrid-Hefe-Klonen

Aus den beiden positiven One Hybrid-Klonen Nr. 11 (bZip) und Nr. 9 (Histon H3) sowie aus einem Kontroll-Klon, dessen pPC 86-Vektor keine cDNA enthielt, wurde Gesamtprotein extrahiert. Je 25 µg der angegebenen Proteinextrakte wurden zusammen mit vier radioaktiv markierten C2-Promotor-Fragmenten (86-1, 86-4, A17-Sal und H2) inkubiert und im Gel aufgetragen. Alle Ansätze enthielten jeweils 1 µg unspezifischen Kompetitor. Ein Teil der Proben ist zusätzlich mit unmarkierter Proben-DNA in 250-fachem bzw. 300-fachem Überschuss versetzt worden.

3.9. Die Co-Transformation von Craterostigma-Blättern mit CaMV 35S::bZip und C2-Promotor::GUS zeigt keinen Einfluss des bZip-Proteins auf die C2-Expression

Zur Untersuchung, ob das bZip-Protein die C2-Expression beeinflusst, wurden Co-Bombardments durchgeführt. Um sicherzustellen, dass auch beide Test-Komponenten in den beschossenen Zellen zur Verfügung stehen, wurden das mutmaßliche Regulator-Gen bZip unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors, und das Zielgen, C2-Promotor::GUS, bzw. zwei mutagenisierte Versionen, auf denselben Vektor kloniert (Abb. 38).

Im ersten Schritt wurde das bZip-Leseraster mit den Primern GST-bZIP(#11)-for und GST-bZIP(#11)-rev aus dem One Hybrid-Vektor Nr. 11 amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde an den Enden mit Eco RI und Xho I restringiert und dann gerichtet in die multiple Klonierungsstelle (MCS) des pRT105-Vektors zwischen den CaMV 35S-Promotor und das CaMV 35S-Poly(A)-Signal kloniert. Die korrekte Klonierung wurde durch Sequenzierung bestätigt.

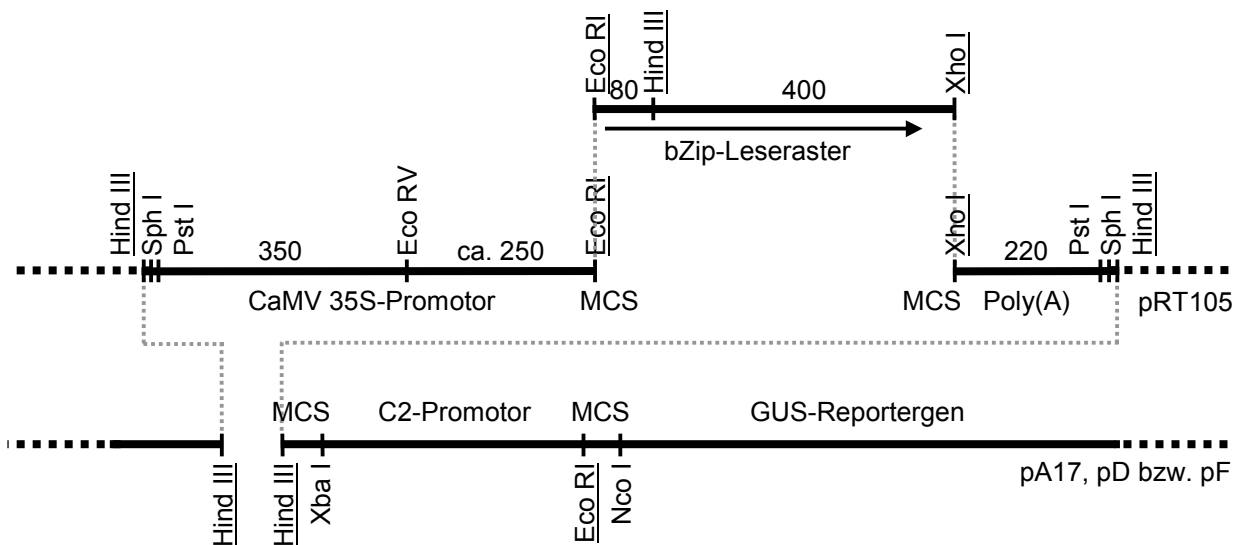


Abb. 38: Konstruktion der Plasmide pA17-bZip, pD-bZip und pF-bZip

Zunächst wurde das bZip-Leseraster durch PCR aus dem One Hybrid-Vektor Nr. 11 amplifiziert und über Eco RI und Xho I in die multiple Klonierungsstelle (MCS) des Vektors pRT105 kloniert. Mit Hilfe eines partiellen Hind III-Verdau wurde das etwa 1,3 kb große bZip-Fragment inklusive dem CaMV 35S-Promotor und dem Poly(A)-Signal aus diesem Vektor wieder ausgeschnitten und ungerichtet in die Hind III-Schnittstelle der Plasmide pA17, pD bzw. pF kloniert. Die Orientierung des inserierten Fragments wurde durch einen Testverdau mit Eco RI ermittelt. Die Zahlen geben die ungefähren Abstände zwischen den Schnittstellen in Basenpaaren an. Zur besseren Übersicht sind nicht alle Restriktionsschnittstellen eingezeichnet.

Im zweiten Schritt wurde der pRT105-bZip-Vektor partiell mit Hind III verdaut und das gesamte chimäre Gen wieder ausgeschnitten. Das 1,3 kb große DNA-Fragment wurde dann ungerichtet in die Hind III-Klonierungstelle der linearisierten und dephosphorylierten Plasmide pA17, pD bzw. pF ligiert. Testverdaus mit Eco RI zeigten, dass das CaMV 35S::bZip-Fragment im Vektor pA17-bZip in derselben Orientierung vorlag wie das C2-Promotor::GUS-Fragment. In den Plasmiden pD-bZip und pF-bZip war die Orientierung entgegengesetzt.

Die fertigen Plasmide pA17-bZip, pD-bZip und pF-bZip unterscheiden sich außer durch die bZip-Orientierung nur durch wenige mutagenisierte Basenpaare im C2-Promotor. Im Gegensatz zum Wildtyp-C2-Promotor in pA17-bZip ist bei pD-bZip das HDZip-Motiv verändert, und bei pF-bZip sind die beiden Non-ACGT-ABRE mutagenisiert (siehe Abb. 14 und Tab. 3).

Auf Abb. 39 sieht man, dass das bZip-Protein unter den vorgegebenen Bedingungen keinen Einfluss auf die Aktivität des C2-Promotors und der mutagenisierten Versionen pD und pF ausübt.

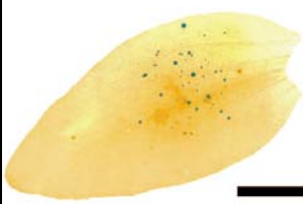
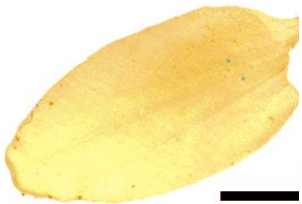

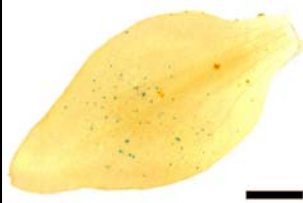
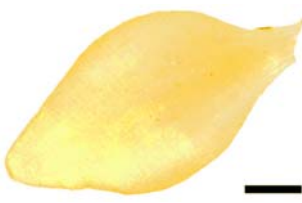

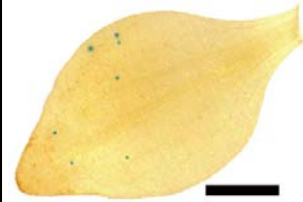



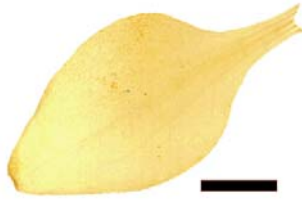

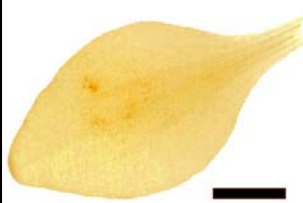





	Austrocknung	ABA	H ₂ O	1	2	3
pA17				+	(+)	-
pA17-bZip				+	-	-
pD				+	+	-
pD-bZip				+	(+)	(+)
pF				-	-	-
pF-bZip				-	-	-

Abb. 39: Co-Bombardments von *Craterostigma*-Blättern mit C2-Promotor::GUS-Konstrukten der Mutagenese-Reihe und CaMV 35S::bZip

Blätter von *Craterostigma plantagineum* wurden mit den Vektoren pA17, pA17-bZip, pD, pD-bZip, pF und pF-bZip beschossen. Anschließend wurden die Blätter ausgetrocknet bzw. in ABA-Lösung oder in Leitungswasser inkubiert. Anhand einer GUS-Färbung wurde die Expression des GUS-Reportergens nachgewiesen. Die angegebenen Größenbalken stehen jeweils für 5 mm. In der Tabelle rechts ist eine Abschätzung der relativen Expressionsstärken aufgelistet. Die Zahlen darüber bedeuten:

- 1) Austrocknung,
- 2) ABA-Behandlung und
- 3) H₂O-Kontrolle.

4. Diskussion

Bisher sind bei *Craterostigma plantagineum* zahlreiche Gene bekannt, deren Produkte unmittelbar strukturell oder enzymatisch an der Antwort auf Trockenstress beteiligt sind. Man weiß sehr viel weniger über regulatorisch wirksame Proteine, welche die Brücke bilden zwischen der Wahrnehmung des Trockenstress-Signals und der Antwort darauf. Diese Arbeit soll einen Beitrag zum besseren Verständnis der Regulation von Antwortgenen leisten. Die Suche nach den regulatorischen Molekülen geht vom LEA-Gen C2 aus, das in hohem Maße bei Trockenstress und nach ABA-Induktion exprimiert wird.

4.1. Identifizierung regulatorischer Motive im C2-Promotor

4.1.1. Vergleich der C2-Promotorsequenz mit bekannten regulatorischen Motiven

Insgesamt wurden 840 bp der C2-Promotorsequenz analysiert. Dass 840 bp ausreichen, um die Trockenstress- und ABA-abhängige Regulation des C2-Gens zu untersuchen, zeigt die starke Expression der Wildtyp-C2-Promotor::GUS-Konstrukte in *Craterostigma*-Blättern und in transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen (Abb. 12, 15 und 13). Ebenso haben Untersuchungen anderer *Craterostigma*-Promotoren (Michel et al., 1993; Nelson et al., 1994; Velasco et al., 1998; Kleines et al. 1999; Chatterjee, 2002) gezeigt, dass regulatorisch wichtige Motive maximal 1000 bp stromaufwärts des Startcodons liegen.

Innerhalb der 840 bp langen C2-Promotor-Region befinden sich verschiedene potentiell regulatorisch wirksame Motive (Abb. 10 und Tab. 2). Ein Teil dieser Motive fällt durch wiederholtes Auftreten oder eine unausgewogene Nukleotid-Sequenz auf. Andere Motive sind zuvor in der Literatur im Zusammenhang mit Trockenstress- und ABA-abhängiger Genexpression beschrieben worden (siehe Tab. 2). Dazu gehören insbesondere das HDZip-Bindemotiv CAATNATTG (Sessa et al., 1997; Johannesson et al., 2001; Deng et al., 2002) und die ABA-Response Elemente (ABRE) (Martinez-Garcia et al., 1998; Hobo et al., 1999a; Hattori et al., 1995). Erste Hinweise darauf, dass ein HDZip-Bindemotiv bei der Regulation Trockenstress- und ABA-induzierbarer *Craterostigma*-Gene eine Rolle spielen könnte, ergaben sich durch die Arbeit von Frank et al. (1998). Darin wurde gezeigt, dass CpHB-1, ein Trockenstress-

induzierbarer Homeodomänen-Leucin-Zipper-Transkriptionsfaktor aus *Craterostigma*, an das Motiv CAAT(C/G)ATTG binden kann. In einer anschließenden Arbeit gelang es Deng et al. (2002), mit Hilfe der Zielsequenz CAAT(A/T)ATTG weitere HDZip-Proteine zu isolieren. Bei *Arabidopsis* wurde das HDZip-Motiv ebenfalls als Zielsequenz für Homeodomänen-Leucin-Zipper-Proteine identifiziert (Sessa et al., 1997; Johannesson et al., 2001).

Aufgrund dieser Resultate ist es wahrscheinlich, dass es sich beim C2-Gen um ein mögliches Zielgen von HDZip-Transkriptionsfaktoren handelt.

Zusätzlich zu der HDZip-Bindestelle fielen besonders fünf potentielle ABA-Response Elemente (ABRE) auf, die in Nachbarschaft zu dem HDZip-Motiv angeordnet sind. Die ABRE und das HDZip-Motiv liegen alle innerhalb eines Bereichs von 185 bp, der 136 bp vom Translationsstart entfernt liegt. Ein gehäuftes Auftreten regulatorisch wirksamer Motive ist auch in anderen Trockenstress-induzierbaren LEA-Genen beobachtet worden. Zum Beispiel setzt sich der ABA-Antwort-Komplex im Promotor des Gruppe 3 LEA-Gens HVA1 aus Gerste aus mehreren Komponenten zusammen, wobei eine repetitive Anordnung die Genexpression verstärkt (Shen et al., 1996). Auch im Promotor des LEA-Gens rab28 aus Mais sind mehrere ABRE nahe beieinander angeordnet (Busk and Pagès, 1997).

Der Aufbau solcher ABRE wurde von Hobo et al. (1999a) untersucht. Sie stellen in ihrer Arbeit mehrere ACGT-haltige und nicht ACGT-haltige ABRE zusammen, von denen ein Teil aus unterschiedlichen Organismen stammt, während der andere Teil artifizuell ist. Alle diese als G-ABRE bezeichneten Sequenzen haben zwei Gemeinsamkeiten. Sie besitzen mindestens eine Hälfte der palindromischen G-Box ($\overleftarrow{\text{GCCAC}} \overrightarrow{\text{GTGGC}}$ bzw. $\overleftarrow{\text{GACAC}} \overrightarrow{\text{GTGTC}}$), und sie enthalten als zentrales Element ACGT, wobei das A auch durch ein anderes Nukleotid ersetzt sein kann (Hobo et al., 1999a). Die Consensus-Sequenz der G-ABRE ist in Abb. 40 aufgeführt.

Vergleicht man diese Consensus-Sequenz mit den C2-Motiven, so fällt insbesondere bei den beiden Non-ACGT-ABRE eine große Übereinstimmung auf. Weiterhin erfüllen beide C2-Non-ACGT-ABRE die Bedingungen für G-ABRE. Die drei anderen ACGT-ABRE stimmen zumindest in der zentralen ACGT-Sequenz überein.

In einer Veröffentlichung von Martinez-Garcia et al. (1998) wurden die potentiellen Bindestellen für zwei bZip-Proteine aus *Antirrhinum majus*, bZip910 und bZip911, untersucht. Auch hier stimmt die ermittelte Consensus-Sequenz sehr gut mit den Sequenzen der beiden C2-Non-ACGT-ABRE überein (Abb. 40). Die Bindemotive der

beiden Löwenmäulchen-Proteine sind angegeben, weil bZip910 und bZip911 an oberster Stelle auf der Liste der Proteine stehen, die homolog zu dem isolierten bZip-Protein aus *Craterostigma* sind (Abb. 28).

Da ABRE von bZip-Proteinen erkannt werden, lassen die Ergebnisse der Sequenzvergleiche erwarten, dass bZip-Proteine an der Regulation des C2-Promotors beteiligt sind.

G-ABRE-Consensus-Sequenz:	G A/C C/T A/G - C G T G G/T C
C2-ACGT-ABRE (372-362):	A A C A - C G T A T G C
C2-ACGT-ABRE (322-311):	G T C A - C G T A T T T
C2-Non-ACGT-ABRE (255-245):	C A T G - C G T G G C G
C2-Non-ACGT-ABRE (192-182):	C C C G - C G T G G C T
C2-ACGT-ABRE (143-133):	C A C A - C G T A C A T
bZip910-Bindestelle:	G A/G T G A C G T G G C A/C
bZip911-Bindestelle:	G A/G T G A C G T G G C C

Abb. 40: Vergleich von C2-ABRE mit einer G-ABRE-Consensus-Sequenz (Hobo et al., 1999a) und zwei Consensus-Bindestellen von bZip-Transkriptionsfaktoren aus Löwenmäulchen (*Antirrhinum majus*) (Martinez-Garcia et al., 1998)

Übereinstimmende Nukleotide sind schwarz unterlegt.

4.1.2. Untersuchungen zur Expression: Identifizierung und mögliche Funktion regulatorischer Motive im C2-Promotor

Um herauszufinden, welche C2-Promotor-Motive regulatorisch wirksam sind, wurden zahlreiche C2-Promotor::GUS-Fusionen konstruiert und ihre Expression sowohl im homologen System *Craterostigma plantagineum* als auch im heterologen System *Arabidopsis thaliana* getestet. Es ist grundsätzlich möglich, *Craterostigma plantagineum* stabil zu transformieren (Furini et al., 1994; Toldi et al., 2002). Da diese Methode jedoch langwierig und aufgrund des polyploiden Genoms nur bei dominanten Genen sinnvoll ist, wurde die transiente Transformation mit Hilfe von Particle Gun Bombardments bevorzugt. Sie hat den Vorteil, viele verschiedene Konstrukte innerhalb kurzer Zeit testen zu können. Somit konnten auch die Resultate, die mit den ersten Konstrukten gemacht wurden, für die Planung der nachfolgenden Konstrukte verwendet werden. Die entwicklungsabhängige Charakterisierung eines Promotors ist jedoch nur in stabil transformierten Pflanzen möglich. Aus diesem Grund wurde als zweites System *Arabidopsis thaliana*

verwendet. Frühere Versuche hatten gezeigt, dass Promotoren von LEA-Genen aus *C. plantagineum* auch in homologen Systemen wie Arabidopsis oder Tabak erkannt werden und stressabhängig reguliert sind (Michel et al., 1994; Furini et al., 1996).

4.1.2.1. Transiente Transformation von Craterostigma-Blättern

Nachdem die Methode des Particle Gun Bombardments von Craterostigma-Blättern etabliert worden war und Vorversuche bestätigt hatten, dass sich die Expression des C2-Promotors mit dieser Methode charakterisieren lässt, wurde zur Lokalisierung regulatorisch wichtiger C2-Promotor-Regionen zunächst eine Serie von 5'-Deletionskonstrukten getestet. Danach wurden isolierte Motive untersucht und schließlich punktmutierte Mutagenese-Versionen des Wildtyp-Promotors. Bei der Mutagenese der HDZip-Bindestelle und des palindromischen Motivs wurde besonders darauf geachtet, die palindromische Struktur zu zerstören, da diese ein verbreitetes Merkmal cis-regulatorischer Elemente ist. Zum Beispiel sind auch die Opaque-2-Bindestelle aus Mais und die HDZip-Bindestelle palindromisch aufgebaut (Tab. 2 auf Seite 73). Bei der Mutagenese der Non-ACGT-ABRE wurde insbesondere die Sequenz GTGGC verändert.

Die Ergebnisse der 5'-Deletionsreihe (Abb. 15) und der Mutagenese-Reihe (Abb. 16) zeigen eindeutig, dass die beiden Non-ACGT-ABRE und die dazwischen liegende HDZip-Bindestelle notwendige cis-aktive Elemente des C2-Promotors sind. Immer dann, wenn diese Promotorregion deletiert oder durch Mutagenese ausgeschaltet ist, beobachtet man entweder keine oder nur noch eine sehr geringe Induzierbarkeit des Promotors nach Trockenstress und ABA-Behandlung.

Beim Vergleich der tendenziellen Unterschiede zwischen den Expressionsstärken der einzelnen 5'-Deletionskonstrukte fällt auf, dass die Induzierbarkeit durch ABA immer schwächer ist als die durch Trockenstress. Weiterhin bewirkt ABA bei den Konstrukten pA17, p648C2, p517C2 und p352C2 ein etwa gleichbleibendes Expressionsniveau, das nur bei pA17-Sph etwas schwächer wird und beim pA17-Pst-Konstrukt ganz verschwindet. Nach Trockenstress-Behandlung dagegen fällt das Expressionsniveau kontinuierlich ab, je kürzer das klonierte Promotorfragment wird. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass der C2-Promotor das Ziel von mindestens zwei Signaltransduktionswegen ist (Abb. 41).

Der eine ist ABA-induzierbar und steuert die ABRE an. Dabei haben die beiden Non-ACGT-ABRE eine zentrale Rolle, denn, wenn sie ausgeschaltet sind, ist der

Promotor nicht mehr ABA-induzierbar. Aber auch die ACGT-haltigen ABRE könnten beteiligt sein und somit die nachlassende durch ABA induzierbare Aktivierbarkeit des C2-Promotors nach Deletion der p352C2- und pA17-Sph-Differenzregion erklären, in der zwei der drei ACGT-ABRE enthalten sind.

Hinsichtlich der Komplexität der Elemente zeigt der C2-Promotor Ähnlichkeiten mit dem HVA1-Promotor aus Gerste. Der ABA-Antwort-Komplex (= ABRC3) im Promotor dieses LEA-Gens besteht aus zwei ABA-responsiven Modulen, die als A2 und CE3 (= Coupling Element 3) bezeichnet werden. In einem anderen LEA-Gen-Promotor aus diesem Organismus, HVA22, tritt eine ähnliche Kombination von funktionellen Elementen (A3 und CE1) auf. Versuche, bei denen die Module der beiden Promotoren miteinander kombiniert wurden, haben gezeigt, dass die vier Motive teilweise gegeneinander austauschbar sind. Weiterhin wurde beobachtet, dass ein Minimalpromotor umso stärker ABA-induzierbar ist, je mehr ABRC3-Kopien vor ihm kloniert werden (Shen et al., 1996).

Möglicherweise beruht auch die ABA-Induzierbarkeit des C2-Promotors auf einer synergistischen Wirkung, die die fünf ABRE aufeinander ausüben.

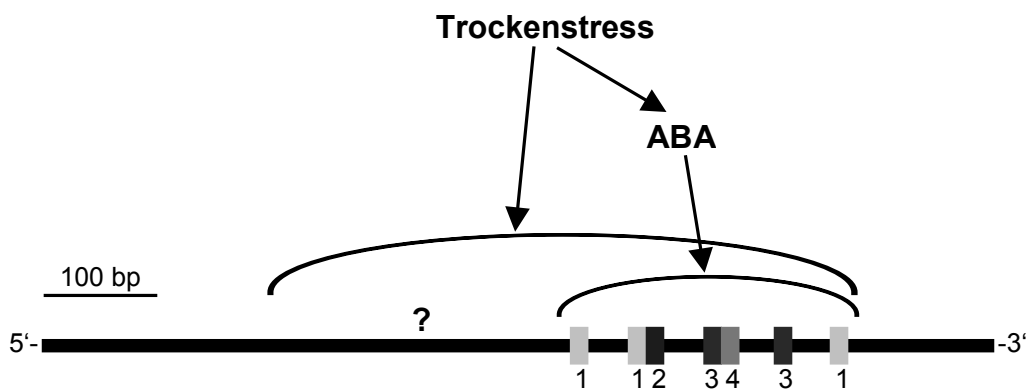


Abb. 41: Schema zur Regulation des C2-Promotors

Das Fragezeichen weist auf bisher noch nicht identifizierte ABA-unabhängige cis-aktive Elemente hin.

Die Zahlen markieren die folgenden Promotor-Motive: 1: ACGT-ABRE

2: Palindromische Sequenz

3: Non-ACGT-ABRE

4: HDZip-Bindemotiv

Auch die palindromische Region, die beim pA17-Sal-Konstrukt zerstört worden ist, könnte bei der ABA-abhängigen Regulation des C2-Promotors beteiligt sein. Von allen untersuchten Konstrukten ließ sich der Promotor des pA17-Sal-Konstrukts nach ABA-Behandlung am stärksten induzieren, so dass der palindromischen Region eine Silencer-Funktion zugeordnet werden könnte.

Der stromaufwärts der ABRE gelegene C2-Promotorbereich muss auch durch ABA-unabhängige Signaltransduktionswege angesteuert werden, denn Trockenstress bewirkt bei den längeren Promotor::GUS-Konstrukten eine stärkere Expression als die Applikation von externem ABA allein. Da jedoch auch internes ABA an der Signaltransduktion bei Trockenstress beteiligt sein kann, kann man nicht feststellen, ob die größere Aktivität der längeren Promotor-Konstrukte nur auf zusätzlichen ABA-unabhängigen Regulationsmechanismen beruht oder ob synergistische Effekte zwischen ABA-abhängigen und ABA-unabhängigen Signalwegen eine Rolle spielen. Welche DNA-Zielmotive für eine ABA-unabhängige Regulation in Frage kommen, ist noch unklar. Im Promotor des Arabidopsis-Gens rd29A ist ein cis-aktives DRE-Motiv (= Drought Responsive Element) identifiziert worden, das Salz- und Trockenstress- sowie Kälte-induzierte Genaktivierung vermittelt, aber ABA-unabhängig wirkt (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1994). Die Sequenz des DRE-Motivs aus Arabidopsis (TACCGACAT) ist jedoch im C2-Promotor nicht vorhanden, so dass hier andere regulatorische Elemente vorliegen müssen.

Das HDZip-Bindemotiv könnte an beiden Regulationskaskaden beteiligt sein. Wenn es mutagenisiert ist, beobachtet man sowohl nach Trockenstress als auch nach ABA-Behandlung eine zwar stark reduzierte, aber immer noch nachweisbare Aktivität des C2-Promotors. Da es in Craterostigma mindestens sieben zum Teil unterschiedlich regulierte HDZip-Proteine gibt, die in der Lage sind, miteinander zu heterodimerisieren (Frank et al., 1998; Deng et al., 2002), könnten verschiedene Signaltransduktionswege jeweils unterschiedliche HDZip-Kombinationen nutzen und somit das C2-Gen spezifisch reguliert werden.

Bombardments mit isolierten C2-Promotorfragmenten (siehe 3.2.2.2. im Ergebnisteil) haben nur zu unerwartet schwacher C2-Expression geführt. Dies könnte darauf hindeuten, dass die vorhandenen Promotor-Elemente, wie die ABRE und das HDZip-Motiv, zwar wichtig für die C2-Expression sind, aber für eine vollständige Funktionalität trotzdem eine größere Sequenzumgebung benötigt wird. Möglicherweise wirken sie nur in Kombination mit anderen cis-aktiven Elementen, die

bei diesen kürzeren Konstrukten fehlten. Somit liefert diese Beobachtung einen weiteren Hinweis darauf, dass es bisher noch unidentifizierte regulatorische Elemente stromaufwärts der ABRE gibt.

Insgesamt wurden sehr viele verschiedene Konstrukte in mehreren Versuchsreihen getestet. Dabei traten zum Teil erhebliche Schwankungen zwischen den einzelnen Reihen auf. Mögliche Ursachen dafür könnten im Alter der Versuchspflanzen und im Zeitpunkt der letzten Umsetzung auf frisches Medium gelegen haben. Mit zu jungen und zu alten Pflanzen und zu alten Blättern wurden keine guten Bombardment-Ergebnisse erzielt. Möglicherweise waren die Bombardment-Parameter für dieses Pflanzenmaterial nicht mehr optimal.

Eine weitere Quelle für Variationen innerhalb der Ergebnisse eines Konstrukts war das Alter des Spermidins, das für das Beladen der Goldpartikel benötigt wird. Mit frischem Spermidin ließen sich bessere Ergebnisse erzielen als mit älterem. Um die Vergleichbarkeit der Versuchsreihen zu gewährleisten, wurde zunächst versucht, ein 35S::GFP-Konstrukt als internen Standard bei jeder Probe mitzuschießen. Dieser Ansatz erwies sich jedoch als ungeeignet, da das GFP-Signal durch die Autofluoreszenz der Chlorophylls unter dem Binokular nicht mehr zu erkennen war. Bis zur Chlorophyll-Extraktion verging dann zu viel Zeit, so dass das GFP schon wieder abgebaut war. Um möglichst aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, wurden die Bombardments mehrfach wiederholt. Dabei wurde immer das Wildtyp-Promotor-Konstrukt pA17::GUS als Standard mitgeschossen, um die einzelnen Bombardment-Serien miteinander vergleichen zu können. Außerdem wurde die Aktivität ausgesuchter Promotor::GUS-Konstrukte zusätzlich in stabil transformierten Arabidopsis-Pflanzen untersucht. Diese Ergebnisse werden im nächsten Abschnitt diskutiert.

4.1.2.2. Stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Im heterologen Test-Organismus *Arabidopsis thaliana* ist der C2-Promotor ebenfalls aktiv (Abb. 13). Dabei verändert sich die Promotoraktivität im Verlauf der Entwicklung. Während das Reporter-gen in Keimlingen und jungen Pflanzen konstitutiv exprimiert wird, findet in älteren Pflanzen nur noch eine ABA- und Trockenstress-abhängige Expression statt. In Keimlingen und jungen Pflanzen wird das Reporter-gen in der gesamten Pflanze stark exprimiert. Dieses Expressionsmuster unterscheidet sich somit von dem anderer Craterostigma-

Promotor::GUS-Konstrukte, wie CDeT11-24::GUS, CDeT27-45::GUS und CDeT6-19::GUS (siehe dazu Tab. 5). Beim CDeT11-24- und CDeT27-45-Konstrukt nimmt die konstitutive Expression in Arabidopsis-Keimlingen schon wenige Tage nach der Keimung deutlich ab (Velasco et al., 1998; Furini et al., 1996), wohingegen sie beim CDeT6-19-Gen bis zum Alter von sechs Wochen kontinuierlich ansteigt. Die ABA-Induzierbarkeit des CDeT11-24- und des CDeT27-45-Promotors nimmt bereits zwei Wochen nach der Keimung ebenfalls ab. Im Gegensatz dazu reagiert der CDeT6-19-Promotor (Furini et al., 1996) wie der C2-Promotor am stärksten nach der Keimung auf ABA. Aber auch in sechs Wochen alten transgenen CDeT6-19::GUS-Pflanzen ist eine deutliche ABA-Induzierbarkeit erkennbar. Ebenso wie der CDeT11-24-Promotor ist auch der CDeT27-45-Promotor nur in Teilen der Pflanze aktiv, u. a. in bestimmten Sprossabschnitten. Dies alles macht deutlich, dass die untersuchten LEA-Gene aus *Craterostigma* trotz vieler Gemeinsamkeiten, wie zum Beispiel der Induzierbarkeit nach ABA-Applikation und der konstitutiven Expression in sehr jungen Arabidopsis-Keimlingen, individuelle Expressionsmuster besitzen.

Beim Vergleich der Konstrukte der C2-Promotor::GUS-Deletionsreihe (Abb. 18) miteinander fällt auf, dass auch in Arabidopsis die Induzierbarkeit der Expression nach ABA-Behandlung und Trockenstress abnimmt, je kürzer das C2-Promotor-Fragment ist. Bei den pA17-Pst- und pF-Konstrukten ist keine Expression mehr nachweisbar. Somit bestätigen die Arabidopsis-Expressionsdaten die *Craterostigma*-Ergebnisse. Dies zeigt, dass sich die durch Trockenstress und ABA induzierte Signaltransduktionskette, durch die der C2-Promotor reguliert wird, nicht auf *Craterostigma* beschränkt, sondern auch in anderen Organismen des Pflanzenreichs bekannt ist. Die cis-aktiven Elemente des *Craterostigma*-Promotors werden auch von Arabidopsis-Proteinen gebunden.

Bei der Untersuchung der ausgetrockneten Arabidopsis-Keimlinge ist es bei einigen pA17::GUS-Keimlingen zu unerwartet geringer Expression gekommen (Abb. 13 und Abb. 19, Teil a). Da von diesen Linien weniger Pflanzen getrocknet wurden als von den anderen, wurde auch weniger Wasser aus dem Medium, das an den Wurzeln haftete, mit in das Trocknungsgefäß überführt. Auf diese Weise wurden die pA17::GUS-Pflanzen unbeabsichtigt stärker ausgetrocknet als erwünscht. Als Folge davon sind vermutlich in einigen Zellen der empfindlichen Keimlinge irreparable Schäden eingetreten, so dass die GUS-Expression hier schwächer ausgefallen ist als eigentlich zu erwarten gewesen wäre.

4.1.2.3. EMSA-Experimente: Bindung von HDZip-Fusionsprotein und Kernproteinen aus Craterostigma an die C2-Promotor-Region, in der zwei ABRE und ein HDZip-Bindemotiv enthalten sind

Mit Hilfe von DNA-Bindungsstudien (Abb. 20) wurde in einem dritten Ansatz speziell die Bedeutung der DNA-Region untersucht, in der die HDZip-Bindestelle und die beiden ABRE enthalten sind. Dass diese Motive für die Regulation des C2-Promotors wichtig sind, konnte zuvor durch Bombardment-Versuche und in transgenen Arabidopsis-Pflanzen gezeigt werden.

Erwartungsgemäß beobachtet man in den Protein-haltigen Ansätzen reproduzierbare retardierte Banden, die jeweils bei der freien Probe fehlen, und somit durch Bindung der Proteine an die DNA verursacht worden sein müssen. Dabei ergeben Kernproteinextrakte ein anderes Bandenmuster als das HDZip-Fusionsprotein, was zeigt, dass die Komplexe verschiedene Proteine enthalten. Da das Fusionsprotein noch einen zusätzlichen GST-Anteil beinhaltet, ist es größer als das entsprechende natürliche HDZip-Protein. Somit müssten Komplexe, die nur aus natürlichem HDZip-Protein und gebundener DNA bestehen, schneller als der HDZip-Fusionsprotein-DNA-Komplex durch das Gel laufen und die zugehörigen Banden demzufolge auch tiefer liegen. Dass jedoch die retardierten Banden, die gebundene Kernproteine enthalten, höher liegen, spricht dafür, dass das untersuchte DNA-Fragment von anderen nukleären Proteinen gebunden wird, möglicherweise zusätzlich zu einem HDZip-Protein.

Ein anderer Grund für die unterschiedliche Bandenhöhe, die HDZip-Fusionsprotein und Kernproteine verursachen, könnte sein, dass das Fusionsprotein nur als Monomer an die DNA bindet, wohingegen sich in den Kernprotein-Ansätzen Komplexe mit HDZip-Dimeren formiert haben könnten. Möglicherweise verhindert der zusätzliche Proteinanteil im HDZip-Fusionsprotein die Ausbildung von Dimeren, die aufgrund ihrer Größe erwartungsgemäß langsamer durch das Gel laufen würden.

Bei weiterer Betrachtung der Ergebnisse fallen einige ungewöhnliche Aspekte auf. Entgegen der Erwartung beobachtet man die verzögert durch das Gel laufende Bande auch bei den Kontrollansätzen mit mutagenisiertem DNA-Fragment. Eigentlich war erwartet worden, dass durch die Punktmutationen in den ABRE und dem HDZip-Bindemotiv keine Bande mehr erscheinen würde, da die Bindestelle zerstört ist. Die Proteine binden aber trotzdem. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Mutagenesen der Promotor-Motive noch weiter verändert.

Es konnte nicht geklärt werden, warum durch spezifische Konkurrenz mit im Überschuss zugegebener unmarkierter Ziel-DNA keine Abschwächung der Banden bewirkt wurde. Laut Theorie unterscheiden die Proteine nicht zwischen markierter und unmarkierter DNA, so dass anteilmäßig immer gleich viel gebunden wird. Steigt nun der Anteil unmarkierter Konkurrenz-DNA an, dann geht gleichzeitig auch der Anteil gebundener markierter DNA zurück, was eine Abschwächung der retardierten Bande zur Folge hätte. Die einzige Erklärung für dieses Phänomen könnte darin liegen, dass die DNA-Fragmente in beiden Ansätzen im Überschuss vorlagen, so dass immer alles gebunden wurde, was im Ansatz vorhanden war. Dagegen spricht aber, dass die Intensität der retardierten Bande im HDZip-EMSA proportional zur eingesetzten Proteinmenge zunimmt. Wäre die DNA der limitierende Faktor, müssten bei allen Ansätzen retardierte Banden gleicher Intensität zu beobachten sein.

4.2. Die Suche nach übergeordneten Regulationsmechanismen in Promotoren von *Craterostigma plantagineum*

Da viele Gene, die an der Trockenstress-Antwort beteiligt sind, ein ähnliches Expressionsmuster aufweisen, könnte es sein, dass sie auch gleichartige Regulationsmechanismen besitzen. Aus diesem Grund wurden die Sequenzen der bisher isolierten *Craterostigma*-Promotoren (Tab. 5) nach verschiedenen an der Antwort auf Trockenstress beteiligten Promotor-Motiven durchsucht (Tab. 6).

Die untersuchten Motive treten fast alle gleichmäßig in den bisher bekannten *Craterostigma*-Promotoren auf. Statistisch gesehen findet man eine fünfstellige Nukleotidsequenz wie das R18-Bindemotiv einmal in 1024 bp. Demnach kann das Vorkommen der R18-Bindestelle in den Promotoren von CDeT11-24, CpSS2 und cpm-10 reiner Zufall sein. Im Promotor des konstitutiv exprimierten PLD-1-Gens ist das Motiv zwar zweifach vorhanden, aber die beiden Kopien sind viel weiter voneinander entfernt als im CDeT27-45-Promotor, wo ihre regulatorische Funktion möglicherweise auch durch die räumliche Nähe der beiden Kopien bedingt ist.

Mit der Bindestelle des MYC-Transkriptionsfaktors verhält es sich ähnlich. Die Sequenz, nach der gesucht wurde, ist so variabel, dass sie mit einer hohen Wahrscheinlichkeit mehrfach innerhalb der untersuchten Promotor-Sequenzen auftritt.

Die Sequenz der Bindestelle eines MYB-Transkriptionsfaktors ist etwas länger und ihr Auftreten somit statistisch unwahrscheinlicher. Sie tritt nur im CpSS1-Promotor auf.

In allen anderen Promotoren sind nur ähnliche Motive enthalten, von denen nicht bekannt ist, ob sie dieselbe Funktion erfüllen können.

Die HDZip-Bindestelle und die ABRE-Sequenz kommen beide statistisch selten vor, nämlich nur einmal pro 65.500 bp. Die exakte HDZip-Erkennungssequenz lässt sich ausschließlich im C2-Promotor wiederfinden. Andere Promotoren, wie zum Beispiel der CDeT6-19-Promotor, enthalten nur abgewandelte Versionen. Auch hier lässt sich nicht abschätzen, ob diese eine äquivalente Funktion besitzen.

Die genaue ABRE-Consensus-Sequenz tritt bei keinem der untersuchten Promotoren auf. Jedoch lassen sich in allen Promotoren leicht variierte Versionen identifizieren, auch in den Promotoren konstitutiv exprimierter Gene, wie CpPLD-1.

Die in der Literatur in *Arabidopsis* definierte DRE-Sequenz findet sich nur im CpPLD-2- und im CDeT6-19-Promotor. In einem Teil der restlichen Promotoren, wie CDeT27-45 und CDeTEdi-9, sind aber ähnliche Motive vorhanden, während DRE in anderen, wie C2, überhaupt nicht vorkommt.

Insgesamt ist es nicht möglich, ein durchgängiges Schema zu identifizieren, bei dem ein bestimmtes Motiv durchweg in allen LEA-Promotoren vorhanden ist und gleichzeitig in den Promotoren konstitutiv exprimierter Gene fehlt. Hinzu kommt, dass nicht klar ist, ob die gefundenen Motive und möglicherweise auch die Motiv-Variationen in den jeweiligen Promotoren eine regulatorische Funktion erfüllen. Williams et al. (1992) haben gezeigt, dass schon geringe Unterschiede in der Sequenzumgebung von G-Box-ABRE einen gravierenden Effekt auf die Bindeeigenschaften von Proteinen haben können. Zum Beispiel wird das Motiv GACACGTGTC sehr gut von Kernproteinen aus Blumenkohl gebunden, während das ähnliche Motiv CACACGTGTG nicht erkannt wird (Williams et al., 1992). Somit lassen sich anhand der wenigen bisher bekannten Promotor-Sequenzen keine eindeutigen Muster bezüglich regulatorischer Elemente identifizieren.

Tabelle 5: Untersuchte Promotoren aus *Craterostigma plantagineum*

Promotor	Genprodukte und Funktion	Induktion durch		Literatur	Access.-Nr.
		TS	ABA		
CpPLD-1 CpPLD-2	Phospholipasen D, Signaltransduktion	nein ja	nein ja	Lohse, 2001 Lohse, 2001	- -
Cpm-10	Myb-verwandter Transkriptionsfaktor	nein ¹	ja ¹	Iturriaga et al., 1996	U33915
CpSS1 CpSS2	Saccharose-Synthasen Kohlenhydratstoffwechsel	ja ja/nein ²	ja ² nein ²	Kleines et al., 1999 Kleines et al., 1999	AJ132001 AJ132002
CDeTEdi-9	LEA-Protein	k. A.	k. A.	Rodrigo et al., unveröffentlicht	-
CDeT11-24	dsp 68, LEA-ähnliches Protein	ja	ja	Velasco et al., 1998	AJ002974
CDeT6-19	Dsp16, Gr. 2 LEA-Protein/Dehydrin	ja	ja	Michel et al., 1994	X74067
CDeT27-45	dsp15, Gr. 5 LEA-Protein	ja	ja	Michel et al., 1994	X69883
C2	Gruppe 4 LEA-Protein	ja	ja	diese Arbeit	-

1 in Kallus

2 in transgenen Tabak-Pflanzen

TS = Trockenstress

k. A. = keine Angaben

Untersucht wurden jeweils etwa 1 kb Promotorsequenz. Da der Transkriptionsstart nicht von allen Genen bekannt ist, geben die Zahlen die Entfernung zum Translationsstart an. Übereinstimmende Sequenzen sind schwarz unterlegt. Ähnliche Sequenzen sind an den Übereinstimmungen grau unterlegt. Die Sequenzen, nach denen gesucht wurde, stammen aus den folgenden Veröffentlichungen: DRE-Sequenz: Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1994; Chen et al., 2002; ABRE-Sequenz: Hobo et al., 1999a; HDZip-Bindestelle: Frank et al., 1998; Johannesson et al., 2001; MYB-Bindestelle: Abe et al., 1997 und 2003; MYC-Bindestelle: Abe et al., 1997 und 2003; R18-Bindestelle: Nelson et al., 1994; Hilbricht et al., 2002.

n. v. = nicht vorhanden

Tabelle 6: Potentielle regulatorische Motive in Promotoren aus *Craterostigma plantagineum*

Promotor	DRE (A/G/T)(A/G)C CGACN(A/T)	ABRE G(A/C)(C/T)(A/ G)CGTG(G/T)C	HDZip- Bindestelle CAATNATTG	MYB- Bindestelle TAACTG	MYC- Bindestelle CANNTG	CpR18- Bindest. AGCCC
CpPLD-1	n. v.	912: CCCACGTATA 746: AACACGTAAC 685: TGAACGTGAC	1005: CAATAATTT 711: AAATAATTA 467: CAAT-ATTG	523: TAACTA 375: TAAATG 160: CAACTG	946: CATTG 827: CATATG 765: CATGTG 735: CACATG 405: CAAATG 160: CAACTG	888: AGCCCAA 577: AGCCCAT
CpPLD-2	922: GGCCGACTC 765: TACCGACTA	744: TGCACGTATG 321: AACACGTAAG 134: TAAACGTTTC	871: TAATTATTC 726: CAATTATTC 375: TAAT-ATTG 295: CAATTATTA	805: TAAATG 531: TACCTG 459: TAACTA	660: CAATTG	n. v.
Edi-9	926: TACCCACAT 676: AACCGACAC 134: AACCAACAA	200: TCCACGTTAT 171: CTTACGTGTC 92: TCCACGTAAC	894: CAAATTATTA 372: CAA-ATTG	848: TAACTC 841: TAAATG 813: TAAGTG	920: CATCTG 835: CAACTG 805: CATTG 702: CAGATG 620: CATTG 504: CACATG	n. v.
Cpm-10	546: CACCAACAC	933: ATGACGTTAT 569: AGAACGTATA 542: AACACGTCCC	993: TAATGATTG	779: TAATTG	840: CAACTG 533: CAAATG	157: AGCCCA
CpSS1	n. v.	682: GTTACGTGGG 384: ACTACGTGTT 337: TACACGTGCG 35: ACTACGTTGG	810: AAATG-TTG 470: CAATGTTTG	749: TAACTG 481: TAGCTG 208: TAAGTG 168: CAACTG 71: AAAGTG	328: CATTG 170: CAACTG 91: CATTG	n. v.
CpSS2	n. v.	696: ACGACGTGTT 369: TCAACGTCAT 337: TTCACGTGCG 35: ACTACGTAGG	n. v.	762: TAACTC 453: GAAGTG	969: CATATG 349: CAGTTG 326: CATTG 166: CATCTG	803: AGCCCTA
11-24	n. v.	860: CTTACGTTGA 752: GCTACGTATG 584: TCCACGTGCG 576: CGAACGTCTA 551: AACACGTGCT 525: AATACGTATG 374: GTGACGTCAG 260: GCCACGTCCC 187: CTGACGTGTC	899: CAATCTTTC 14: GAAT-ATTG	819: TAACCG 507: TAAATG 356: TAAGTG	881: CACTTG 581: CACGTG 549: CACGTG 207: CACGTG 129: CACTTG	556: AGCCCAA
6-19	242: TGCCGACAT	438: CATACTGTG 394: CACACGTAAA 221: AGCACGTGGC 182: GAAACGTGTC	726: CAAATTTG 669: TAAT-ATTA 338: GAATTATTA	685: TAACTC	960: CAACTG 948: CAATTG 286: CAACTG 219: CACGTG 130: CAGCTG 71: CATCTG 40: CACTTG	n. v.
27-45	214: CACCGACTT	336: TACACGTTTC 291: GGCACGTATG 165: AACACGTACG 152: TACACGTGTG	793: CAATTATTC	556: TCACTG 434: TAACCG	889: CATATG 830: CAACTG 633: CAGCTG 532: CATTG	455: AGCCCAA 414: AGCCCGA
C2	n. v.	372: AACACGTATG 322: GTCACGTATT 255: CATGCGTGGC 192: CCCGCGTGGC 143: CACACGTACA	811: CAATTGTTG 241: CAATAATTG	670: TAATTG 168: TAACCG	801: CAATTG 536: CAGTTG 498: CAATTG 359: CATATG 223: CAAATG	n. v.

4.3. Isolierung von C2-Promotor-Bindeproteinen mit Hilfe eines Hefe-One Hybrid-Screens

Da die Bombardment-Ergebnisse und die Expressionsanalysen der transgenen Arabidopsis-Pflanzen mit den Erwartungen übereinstimmten, die Vergleiche der C2-Promotorsequenz mit bereits bekannten cis-Elementen hervorgerufen hatten, wurde die C2-Promotor-Region als Ziel-DNA für einen One Hybrid-Screen (Abb. 21 und Abb. 22) ausgewählt, in der die beiden Non-ACGT-ABRE und das HDZip-Bindemotiv enthalten sind. Das Ziel des One Hybrid-Versuchs war die Isolierung von Proteinen, die mit dieser Promotorregion interagieren. Um zu verhindern, dass potentielle Bindeproteine aufgrund sterischer Hindernisse nicht binden können, wurden drei Kopien der Ziel-DNA hintereinander kloniert.

Bei der Konstruktion der cDNA-Bank war die Orientierung der cDNAs durch den Poly(T)-Primer vorgegeben. Dennoch konnten die cDNAs in allen drei möglichen Leserastern kloniert worden sein. Da Pflanzengenome etwa 20.000 bis 30.000 verschiedene Gene besitzen (Taiz and Zeiger, 2000; Rounsley et al., 1996), müssen mindestens 90.000 Hefeklone untersucht werden, damit jede cDNA statistisch einmal im korrekten Leseraster vertreten ist. Diese Berechnung gilt jedoch nur für die Annahme, dass alle cDNAs gleich häufig vertreten sind. In der Realität ist dies nicht der Fall, weil Gene unterschiedliche Expressionsmuster besitzen. Zur Egalisierung dieses Ungleichgewichts besteht die Möglichkeit, cDNA-Banken zu normalisieren (Soares et al., 1994) und dadurch den Anteil seltener cDNAs zu erhöhen. Eine andere Möglichkeit ist, wesentlich mehr Klone zu screenen als die statistisch erforderliche Mindestmenge. Bei dem One Hybrid-Screen, der in dieser Arbeit beschrieben wird, wurden insgesamt 10.000.000 Hefeklone untersucht. Damit war die Anzahl der untersuchten Klone um den Faktor 111 höher als die statistische Mindestmenge. Hinzu kommt, dass als Ausgangsmaterial angetrocknete Pflanzen verwendet worden sind, bei denen gerade die gesuchten Trockenstress-induzierten Transkripte häufiger vertreten sein sollten. In einem vergleichbaren Screen haben Hilbricht et al. (2002) 27.000.000 Hefeklone untersucht, was zur Isolierung von anfänglich 309 positiven Klonen führte. Nach insgesamt drei Selektionsrunden blieb nur ein einziger positiver Klon übrig.

Bei dem One Hybrid-Screen der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt elf Klone isoliert, die auf selektivem Medium erneut gewachsen sind und bei denen sich das Leseraster ohne Unterbrechung an das des Gal-Aktivators anschloss (Tab. 4). Diese

Klone enthielten entweder eine Histon- oder eine bZip-cDNA. Bis auf einen einzelnen Histon H4-Klon wurden alle Klone mindestens zweimal unabhängig voneinander isoliert. Darunter befanden sich zwei bZip-cDNAs, und drei verschiedene Histon H3-cDNAs, die je zweimal, zweimal und viermal vertreten waren. Dass letztendlich aus 10 Millionen Hefeklonen nur fünf verschiedene positive Klone isoliert worden sind, vier davon jeweils mindestens zweimal unabhängig voneinander, spricht für eine hohe Spezifität dieses One Hybrid-Screens. Hinzu kommt noch, dass sich von zwei der fünf verschiedenen cDNAs das gleiche Protein ableiten lässt, während eine weitere cDNA ein zu 96 % identisches Protein codiert. Die wiederholte Isolierung eines identischen cDNA-Klons hätte möglicherweise durch vorherige Normalisierung der cDNA-Bank unterbunden werden können. Aber die mehrfache Isolierung von unterschiedlichen Klonen, aus deren cDNA sich das gleiche Protein ableiten lässt, spricht für eine sehr hohe Spezifität des Screens.

Erstaunlicherweise wurden keine HDZip-Proteine gefunden. Ein Grund dafür könnte sein, dass HDZip-Proteine nur als Heterodimere an den C2-Promotor binden. Wäre dies der Fall, ist es unmöglich, mit diesem Versuchsansatz solche Proteine zu isolieren.

4.4. Charakterisierung der isolierten Proteine

4.4.1. Die Charakterisierung der zwei bZip-Klone

4.4.1.1. One Hybrid-Screen

Aufgrund der beiden ABRE innerhalb des C2-Promotorabschnitts, der als Zielsequenz für den One Hybrid-Screen diente, war die Isolierung eines bZip-Proteins erwartet worden.

Im Verlauf des One Hybrid-Screens wurde dann zweimal unabhängig voneinander der gleiche cDNA-Klon isoliert, dessen abgeleitete Proteinsequenz Homologien zu bZip-Transkriptionsfaktoren aufweist. Interessanterweise liegen auf der Liste der homologen Proteine (Abb. 28) genau die beiden bZip-Proteine aus *Antirrhinum majus* (Martinez-Garcia et al., 1998) ganz oben, deren DNA-Bindestellen nahezu identisch mit der Sequenz des ersten Non-ACGT-ABRE im C2-Promotor sind (Abb. 40). Somit entspricht das isolierte One Hybrid-Protein voll und ganz den Erwartungen, welche die Analyse der cis-aktiven Elemente im C2-Promotor geweckt haben. Die Isolierung ausgerechnet dieses Proteins kann kein Zufall sein, sondern spricht für eine spezifische Interaktion mit dem C2-Promotorfragment.

Auf der Liste der homologen Proteine folgen weitere bZip-Proteine. Darunter befinden sich auf den Plätzen 7, 10, 11, 17, 33, 37, 40, 41, 46 und 48 auch Proteine aus *Arabidopsis thaliana*. Jakoby et al. (2002) haben versucht, die 75 identifizierten bZip-Gene des Arabidopsis-Genoms zu klassifizieren. Danach werden die bZip-Gene in zehn Gruppen eingeteilt, nämlich A, B, C, D, E, F, G, H, I und S. Alle oben aufgezählten homologen bZip-Proteine aus Arabidopsis sind Mitglieder der Gruppe S, ebenso die beiden Antirrhinum-bZip-Proteine (Jakoby et al., 2002). Somit lässt sich auch das Craterostigma bZip-Protein in diese Gruppe einordnen. Einige Mitglieder dieser Gruppe S sind an der Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels beteiligt. Andere spielen eine Rolle bei der Reaktion auf Kälte-, Trocken- und Salzstress sowie Verwundung (Jakoby et al., 2002).

Die Gruppe S (= small) ist die größte Gruppe der Arabidopsis-bZip-Proteine, die strukturell kleine bZip-Proteine beinhaltet. Außer der basischen Domäne, die zur Bindung an die DNA dient, und der Leucin-Zipper-Domäne enthalten bZip-Proteine der Gruppe S keine weiteren funktionellen Domänen. Mit Hilfe ihrer Leucin-Zipper Region können bZip-Proteine mit anderen Proteinen interagieren. Wie Abb. 28 und Abb. 29 zeigen, sind diese beiden Regionen auch im Craterostigma-Protein vorhanden.

4.4.1.2. Genomische Organisation

Bei Arabidopsis sind 17 der 75 bZip-Gene in der Gruppe S zusammengefasst. Vergleicht man diese Zahl mit den Ergebnissen der genomischen Southern-Analyse (Abb. 30), so findet man bei Craterostigma eine ähnlich hohe Anzahl von Mitgliedern. Da sich von den untersuchten Genen nur kleine Proteine ableiten lassen, ist es wahrscheinlich, dass innerhalb der codierenden Region keine Introns mit potentiellen Schnittstellen enthalten sind. Dies wurde für die beiden Arabidopsis-Proteine mit der größten Homologie, AtbZIP53 und AtbZIP43, bestätigt.

Innerhalb der 500 bp langen bZip-Sondensequenz (Abb. 26) befindet sich, etwa 90 bp vom 5'-Ende entfernt, eine Hind III-Restriktionschnittstelle. Wenn nun bei einer genomischen Southern-Analyse mit Hind III verdaut DNA untersucht wird, dann könnte die Sonde, zumindest in der genomischen Sequenz des hier isolierten bZip-Gens, theoretisch zweimal binden. Andererseits sind 90 bp übereinstimmende Sondensequenz möglicherweise nicht ausreichend, damit eine insgesamt 500 bp lange Sonde bindet. Da bei beiden Ansätzen gleich viele Banden auf dem

Autoradiogramm zu sehen sind, unabhängig davon, ob die DNA vorher mit Hind III oder mit Eco RI verdaut worden ist, scheint diese Schnittstelle praktisch keine Rolle zu spielen. Somit entsprechen die zwölf Banden auf dem Autoradiogramm der genomischen Southern-Analyse auch tatsächlich der Mitgliederanzahl der bZip-Genfamilie bei *Craterostigma*.

4.4.1.3. Expressionsanalysen

Sowohl die Ergebnisse der Northern-Analyse (Abb. 31) als auch die RT-PCR-Resultat (Abb. 33) zeigen, dass das bZip-Protein konstitutiv exprimiert wird. Dabei lässt sich ein sehr geringes Expressionsniveau beobachten, das für regulatorisch wirksame Proteine typisch ist. Selbst die Hybridisierung von 100 µg Gesamt-RNA oder 6 µg Poly(A)⁺-RNA führt nach sechs bzw. fünf Tagen Exposition nur zu extrem schwachen Signalen. Bei Hybridisierung mit einer C2-Sonde reicht dagegen schon ein Zwölftel der bZip-Expositionszeit aus, um ein sehr starkes Signale zu erhalten. Bei der Northern-Analyse wurde ein bZip-Transkript mit einer Größe von ungefähr 1,4 kb (Abb. 32) detektiert.

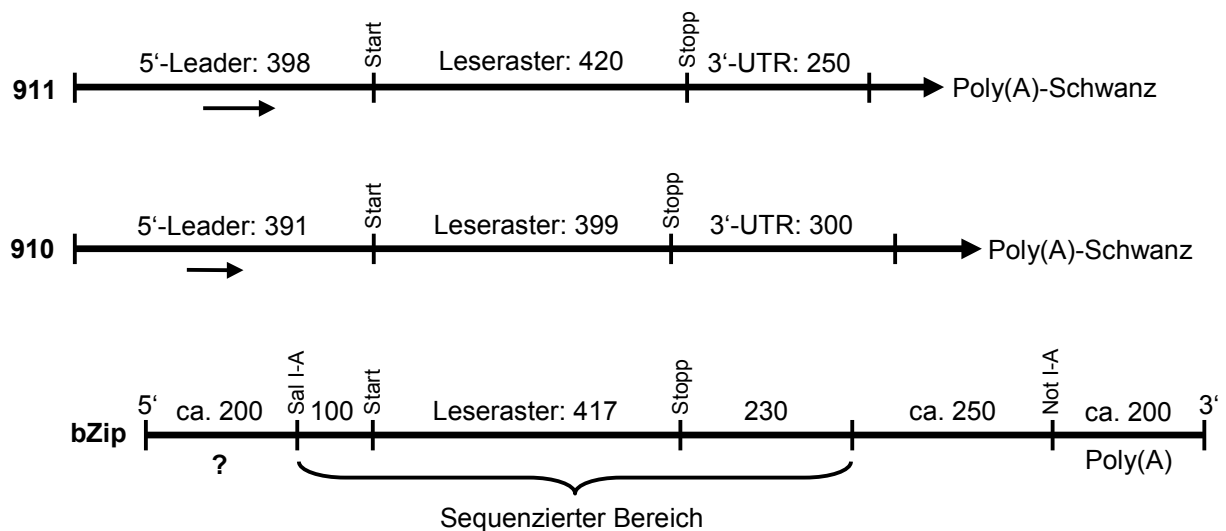


Abb. 42: Übersicht über den Aufbau des bZip-Transkripts aus *Craterostigma plantagineum* und Vergleich mit den Transkripten der homologen Gene bZIP910 und bZIP911 aus *Antirrhinum majus*

Die Zahlen geben die abgeschätzten Distanzen in Basenpaaren zwischen den Bezeichnungen an.

Die Pfeile markieren die 5'-Leaderregion, in der sich ein kleines konservierte offenes Leseraster (ORF) befindet. Das Fragezeichen markiert die Position, an der ein kleines konserviertes ORF in der 5'-Leadersequenz des bZip-Transkripts zu erwarten ist.

Sal I-A = Sal I-Adapter, Not I-A = Not I-Adapter, 3'-UTR = 3'-untranslatierte Region

Das Leseraster des bZip-Proteins (Abb. 26 und Abb. 42) umfasst allein knapp 420 bp. Im 5'-untranslatierten Bereich schließen sich weitere 100 bp bis zum Sal I-Adapter an. Von der 3'-untranslatierten Region wurden bislang 230 bp sequenziert. Da das cDNA-Insert des bZip-Klons jedoch etwa 1 kb groß ist, hat die 3'-untranslatierte Region vermutlich eine Länge von insgesamt etwa 480 bp bis zum Not I-Adapter, der am Übergang zum Poly(A)-Schwanz liegt.

Von den Transkripten der beiden bZip-Proteine aus *Antirrhinum majus* und weiterer bZip-Proteine der Gruppe S ist bekannt, dass sie lange 5'-Leadersequenzen besitzen. Bei Löwenmäulchen sind diese 5'-untranslatierten Bereiche etwa 400 bp lang und enthalten mehrere kleine offene Leseraster. Martinez-Garcia et al. (1998) haben in Tabak-Protoplasten den Einfluss der 5'-Leadersequenzen auf die Transkriptlevel der beiden *Antirrhinum*-bZip-Gene nach konstitutiver Expression (CaMV 35S-Promotor) untersucht. Das Vorhandensein der 5'-Leadersequenz führte dabei zu einer Reduktion der Transkriptlevel um durchschnittlich mehr als 60 %. Eines der kleinen offenen Leseraster in den *Antirrhinum*-Leadersequenzen ist auch in anderen bZip-Proteinen aus *Arabidopsis*, Reis und Mais stark konserviert und ist vermutlich für die post-transkriptionelle Regulation zuständig (Martinez-Garcia et al., 1998; Jakoby et al., 2002).

Da das bZip-cDNA-Insert kleiner ist als das im Northern detektierte Transkript, ist davon auszugehen, dass die 5'-untranslatierte Region nicht in voller Länge isoliert worden ist. Vermutlich fehlen am 5'-Ende noch etwa 200-400 bp, je nach Länge des Poly(A)-Schwanzes, der am 3'-Ende noch hinzugerechnet werden muss. Diese Differenz lässt vermuten, dass auch das bZip-Transkript aus *Craterostigma* eine ähnlich lange 5'-Leadersequenz besitzt, in der ebenfalls ein kleines konserviertes offenes Leseraster enthalten sein könnte (Abb. 42). Das bZip-Transkript aus *Craterostigma* könnte, genauso wie die Löwenmäulchen-Transkripte, einer post-transkriptionellen Regulation unterworfen sein. Es existieren aber auch Beispiele für die regulatorische Wirksamkeit kleiner offener Leseraster zu einem späteren Zeitpunkt der Proteinsynthese. In Hefen wurden zwei Proteine charakterisiert, deren Synthese auf Translationsebene durch kleine stromaufwärts gelegene offene Leseraster reguliert wird (Mueller and Hinnebusch, 1986; Werner et al., 1987).

Falls ähnliche Regulationsmechanismen auch auf das *Craterostigma*-Gen zutreffen, könnte das bZip-Protein, obwohl die Transkription konstitutiv abläuft, trotzdem Stress-abhängig synthetisiert werden.

4.4.1.4. Subzelluläre Lokalisationssignale bei bZip

Wie Abb. 35 zeigt, wird das bZip-Protein im Nukleus exprimiert. Dies ist ein weiterer Aspekt, der dafür spricht, dass bZip als Transkriptionsfaktor wirksam wird.

Für den Transport in den Zellkern benötigt das Protein eine Signalsequenz, die es ihm ermöglicht, die Kernporen zu passieren. Bei einigen Proteinen wird dieses Signalpeptid nach dem Transport abgespalten. Bei anderen sind die beteiligten Aminosäuren über das gesamte Molekül verteilt und bleiben erhalten. Erst durch die Konformation des fertigen Proteins rücken sie in nachbarschaftliche Nähe und bilden zusammen den Signalbereich aus. Die Strukturen solcher nukleärer Lokalisationssignale (NLS) sind nicht einheitlich. Häufig bestehen NLS aus mehreren positiv geladenen Lysin- oder Arginin-Resten. Allerdings ist es ohne weitere Untersuchungen nicht möglich vorherzusagen, welche Aminosäuren eines Proteins für den Transport in den Zellkern wichtig sind.

4.4.2. Die Charakterisierung der acht Histon H3-Klone

4.4.2.1. One Hybrid-Screen und genomische Organisation

Insgesamt wurden drei verschiedene Histon H3-cDNAs gefunden, von denen eine viermal (Klone Nr. 1, 12, 31 und 32) und zwei andere cDNAs jeweils zweimal (Klone Nr. 36 und 37 bzw. Klone Nr. 2 und 9) unabhängig voneinander isoliert worden sind. Die Sequenzvergleiche zeigen, dass die unterschiedlichen Klone auch tatsächlich drei verschiedene Histon H3-cDNAs enthalten (Abb. 25). Die Klone Nr. 1 und Nr. 36 unterscheiden sich nur in der Länge der 5'-nicht translatierten Region sowie durch 14 Basen innerhalb des Leserasters, die alle an dritter Stelle im Codon stehen. Dies führt jedoch aufgrund der Degeneration des genetischen Codes zu keiner Abweichung in der Aminosäuresequenz. Die Sequenz der dritten cDNA (Klon Nr. 2 und Nr. 9) differiert stärker, so dass sich aus dieser cDNA ein Protein ableiten lässt, das sich durch 5 Aminosäuren von den anderen beiden unterscheidet. Die große Ähnlichkeit der beiden cDNAs aus den Klonen Nr. 1 und 36, insbesondere im 3'-nicht translatierten Bereich, legt die Vermutung nahe, dass das eine der beiden Gene durch Duplikation des anderen Gens entstanden sein könnte.

Der genomische Southernblot (Abb. 30) bestätigt, dass im Craterostigma-Genom mehrere Histon H3-Gene enthalten sind. Die Anzahl der Banden auf dem Autoradiogramm muss jedoch nicht zwangsläufig mit der tatsächlichen Anzahl der Histon-Gene im Genom übereinstimmen. Da Zellzyklus-abhängige Histone keine

Introns besitzen und keine Hind III- bzw. Eco RI-Schnittstellen in den drei bekannten Sequenzen enthalten sind, ist davon auszugehen, dass ein Zellzyklus-abhängiges Histon H3 auch nur einmal detektiert wird. Allerdings sind bei verschiedenen Pflanzen wie Alfalfa, Saubohne, Arabidopsis, Karotte und Tabak auch je zwei Zellzyklus-unabhängige Histon H3-Varianten gefunden worden (Waterborg, 1992), die Introns innerhalb ihrer codierenden Region besitzen können (Chaubet-Gigot et al., 2001). Daher ist es denkbar, dass auch einige der Craterostigma-Histone Introns beinhalten. Falls darin Eco RI- oder Hind III-Schnittstellen enthalten sind, könnte ein Gen mehrfach detektiert worden sein, so dass die Anzahl der Histon H3-Gene im Genom möglicherweise kleiner als sechs ist.

Vergleicht man diese Zahl mit Arabidopsis, so findet man in diesem Genom 13 Histon H3-Gene mit den Loci At1g01370, At1g13370, At1g19890, At1g75600, At1g75610, At3g27360, At4g40030, At4g40040, At5g10390, At5g10980, At5g65350, At5g65360 und At5g12910.1. Bis auf eines (At1g01370), bei dem es sich um eine centromerische Variante handelt (Talbert et al., 2002), sind die abgeleiteten Proteine, ebenso wie die Craterostigma-Histone, sehr stark konserviert. Auf den Genloci At4g40030 und At4g40040 (Accession-Nr. X60429) liegen die beiden Zellzyklus-unabhängigen H3.3-Varianten. Im Gegensatz zu den replikationsabhängigen Histonen H3 enthalten diese Gene Introns, die innerhalb der codierenden Region und im 5'-nicht translatierten Bereich liegen. Außerdem besitzen die Transkripte ein Polyadenylierungssignal (Chaubet-Gigot et al., 2001). Die abgeleiteten Proteine sind mit der Proteinsequenz der Craterostigma Histone Nr. 1 und 36 identisch.

4.4.2.2. Expressionsanalysen

Bei Northern-Analysen (Abb. 32) wurde durch Vergleich mit dem CDeT27-45-Transkript eine Transkriptgröße von etwas weniger als 0,9 kb ermittelt. Dies stimmt ungefähr mit den Längen der drei bekannten Histon H3-Sequenzen überein, so dass hier keine zusätzlichen langen untranslatierten Bereiche zu erwarten sind.

Die Northernblots (Abb. 31) zeigen ein konstitutives Expressionsmuster. Bei Arabidopsis werden die Histon H3.3-Varianten ebenfalls konstitutiv exprimiert (Chaubet-Gigot et al., 2001). Dagegen werden Zellzyklus-abhängige Histone nur in der S-Phase synthetisiert. Da aber die verschiedenen Zellen im untersuchten Gewebe nicht Phasen-synchronisiert gewesen sein können, erwartet man auch bei

diesen Replikations-abhängigen Transkripten eine konstitutives Expressionsmuster. Somit entsprechen die Transkript-Analysen den Erwartungen.

Aufgrund der großen Ähnlichkeit der drei Histon H3-cDNA-Sequenzen (Abb. 25) bindet die Northern-Sonde, deren Sequenz das Leseraster von Klon Nr. 1 umfasst, mit hoher Wahrscheinlichkeit auch an andere Histon H3-Transkripte. Deshalb ermöglicht dieser Versuchsansatz keine Unterscheidung zwischen den Expressionsmustern der verschiedenen Histon H3-Gene.

Da die Sequenz der Klone Nr. 2 und 9 zumindest in einigen Bereichen deutlich von der der Klone Nr. 1 und Nr. 36 abweicht, konnten Gen-spezifische PCR-Primer hergestellt werden. Sie dienten bei einer RT-PCR (Abb. 33) einer differenzierten Expressionsanalyse, bei der die Expressionsmuster von zwei Histon-Genen (Nr. 1 und Nr. 9) getrennt voneinander untersucht werden konnten.

Es bestätigte sich die konstitutive Expression des Histon H3-Transkripts Nr. 1. Zwar treten zwischen den einzelnen RT-PCR-Proben geringe Schwankungen auf. Da jedoch die RT-PCR mehrfach wiederholt worden ist und die Tendenzen der Schwankungen nicht einheitlich sind, kann man davon ausgehen, dass es sich um statistische Streuungen handelt.

Transkripte des anderen untersuchten Histon H3-Gens (Nr. 2 und 9) ließen sich in keiner der RNA-Proben nachweisen. Der Grund dafür liegt darin, dass diesem Histon H3-Transkript der Poly(A)-Schwanz fehlt. Somit konnte sich der Poly(T)-RT-Primer nicht an die RNA anlagern. Als Folge davon fand auch keine Reverse Transkription statt, wodurch die Matrize für die anschließenden PCR-Untersuchungen fehlte. Auf diese Weise ermöglicht die RT-PCR eine Unterscheidung zwischen Replacement-Histon-Varianten mit Poly(A)-Schwanz (Klone Nr. 1, 12, 31, 32 sowie 36 und 37) und Zellzyklus-abhängigen Histonen H3 (Klone Nr. 2 und 9) ohne Poly(A)-Schwanz.

Obwohl die Reverse Transkription des Zellzyklus-abhängigen Histon-Transkripts im Rahmen des RT-PCR-Versuchs wegen des fehlenden Poly(A)-Schwanzes nicht funktioniert hat, konnte diese cDNA dennoch zweimal aus der One Hybrid-Bibliothek isoliert werden. Allerdings ist bei der Erstellung der One Hybrid-cDNA-Bank ein anderer Poly(T)-Primer, nämlich der Not I-Adapter (siehe 2.4. Material und Methoden), verwendet worden, der neben 15 T-Nukleotiden noch aus 29 weiteren Bausteinen besteht. Wahrscheinlich war dieser Abschnitt für die Bindung ausreichend. Eine vergleichbare Beobachtung wurde schon mit rRNA-Transkripten

gemacht, die ebenfalls keinen Poly(A)-Schwanz besitzen. Auch sie können trotzdem revers transkribiert werden (Bartels and Thompson, 1983).

4.4.2.3. Subzelluläre Lokalisationssignale bei Histon H3

Die Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Histon H3 (Klon Nr. 31 = Klon Nr. 1) hat ergeben, dass dieses Protein erwartungsgemäß im Zellkern exprimiert wird (Abb. 35). Demzufolge muss die Proteinsequenz ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) besitzen. Insbesondere Replacement-Histone werden während des gesamten Zellzyklus benötigt, der auch die Mitosephase miteinschließt, in der die nukleäre Doppelmembran abgebaut wird. Da die Histone anschließend wieder ins Innere des Zellkerns gelangen müssen, ist ein NLS erforderlich, das in der Proteinsequenz selber liegt und nicht als Signalpeptid nach dem ersten Transport in den Zellkern abgespalten wird.

Bei der Suche nach nukleären Lokalisationssignalen innerhalb der Sequenz des humanen Histon H3 wurden von Baake et al. (2001) einzelne Teilbereiche des 136 Aminosäuren langen Proteins mit dem Reportergen β -Galactosidase fusioniert. Dabei reichten jeweils die ersten 32 N-terminalen Aminosäuren, die nachfolgenden 43 Aminosäuren sowie die letzten 71 C-terminalen Aminosäuren aus, um das Fusionsprotein in den Nukleus zu transportieren. Insgesamt ergaben diese Experimente, dass das Kernlokalisierungssignal des Histon H3 sich nicht auf eine kurze Aminosäuresequenz beschränkt, sondern dass die gesamte globuläre Struktur des Proteins daran beteiligt ist. Wichtige Aminosäuren sind fast über das ganze Protein verteilt (Baake et al., 2001). Aufgrund des hohen Konservierungsgrads von Histonen ist anzunehmen, dass sich diese Ergebnisse auf das untersuchte Craterostigma-Histon übertragen lassen. Innerhalb der gesamten Sequenz befinden sich zahlreiche basische Lysin- und Arginin-Reste, die häufig an der Ausbildung von NLS beteiligt sind.

In Abb. 35, Teil b fallen in allen GFP-positiven Zellkernen einzelne Bereiche auf, die intensiver fluoreszieren als die Umgebung. Hierbei könnte es sich um Regionen handeln, die gerade verstärkt transkribiert werden, denn konstitutiv exprimierte Replacement-Histon H3-Varianten sind vermehrt in aktivem Chromatin zu finden (Ahmad and Henikoff, 2002).

4.4.3. Die Funktion von Histon H3 und bZip

Entgegen früherer Annahmen weiss man heute, dass Histone nicht ausschließlich der Verpackung der DNA dienen, sondern dass diese Proteine noch zusätzliche Funktionen besitzen. Sowohl in tierischen Organismen, wie zum Beispiel bei *Drosophila*, als auch in Pflanzen, wie beispielsweise *Arabidopsis*, sind drei Histon H3-Varianten bekannt, die unterschiedliche Funktionen besitzen.

Eine der drei Varianten tritt ausschließlich im centromerischen Bereich des Chromatins auf und unterscheidet sich strukturell erheblich von den beiden anderen (Ahmad and Henikoff, 2002; Talbert et al., 2002). Die beiden anderen Varianten, H3 und H3.3, differieren bei *Drosophila* und *Arabidopsis* nur in wenigen Aminosäuren (Ahmad and Henikoff, 2002). Die zwei Histon H3-Proteine aus *Craterostigma* weisen an nur fünf Positionen unterschiedliche Aminosäuren auf. Im Gegensatz zu den Zellzyklus-abhängigen Histon-Genen, deren Genprodukte sich bei der Replikation in die neu synthetisierte DNA einlagern, besitzen die H3.3-Varianten Introns. Bei *Arabidopsis* wurden darin cis-active Elemente nachgewiesen, die für die konstitutive Expression dieser Gene verantwortlich sind (Chaubet-Gigot et al., 2001). Die Stärke der Expression ist mit der des viralen CaMV 35S-Promotors vergleichbar (Kelemen et al., 2002). Bei *Tetrahymena thermophila* wurde nachgewiesen, dass ein konstitutiv exprimiertes Histon H3-Protein für diesen Ciliaten überlebenswichtig ist. Wenn nur Zellzyklus-abhängige Histone exprimiert werden, stirbt der Protozoe (Yu and Gorovsky, 1997).

Bei *Drosophila* haben Ahmad und Henikoff (2002) gezeigt, dass die Replacement-Variante besonders in transkriptionsaktiven Bereichen des Chromatins auftritt. Studien mit Alfalfa und *Arabidopsis* haben diese Ergebnisse auch in Pflanzen belegt (Waterborg, 1993).

Wie Histone in die Regulation der Gentranskription involviert sein können, erklärt die Histon-Code-Hypothese (Strahl and Allis, 2000; Felsenfeld and Groudine, 2003). Diese Hypothese besagt, dass über definierte Kombinationen reversibler chemischer Modifikationen der Core-Histone Einfluss auf die Transkriptionsaktivität von Genen genommen wird. Zum Beispiel wurde bei Hefe gezeigt, dass das Lysin 4 im Histon H3 einfach, zweifach oder dreifach methyliert vorliegen kann. Die dreifach methylierte Histon H3-Form findet sich ausschließlich in Genen, die gerade exprimiert werden (Santos-Rosa et al., 2002). Bei Histon H3 sind bereits zwölf Aminosäuren identifiziert, die nachweislich methyliert, acetyliert oder phosphoryliert

werden können (Abb. 27). Diese Aminosäuren sind auch in den drei Craterostigma-Proteinen vorhanden.

Insgesamt deuten alle Beobachtungen darauf hin, dass speziell die konstitutiv exprimierten Replacement-Histone, zu denen sehr wahrscheinlich auch zwei der drei isolierten Craterostigma-Proteine zählen (abgeleitet aus den One Hybrid-Klonen Nr. 1, 12, 31, 32, 36 und 37), Informationen darüber weiterleiten, ob bestimmte Zielgene exprimiert werden sollen. Da die Replacement-Histone selber jedoch konstitutiv exprimiert werden und somit zunächst keine Spezifität bezüglich Trockenstress-abhängiger Genexpression besitzen, muss eine Kooperation mit Reiz-abhängigen und Gen-spezifischen Regulationsmechanismen stattfinden. Diese Aufgabe können nur Transkriptionsfaktoren erfüllen, die spezifisch die Expression ihrer Zielgene regulieren und zu denen auch bZip-Proteine zählen. Hinzu kommt, dass auch die Funktion der Histon-modifizierenden Enzyme spezifisch reguliert werden muss. Sie schaffen durch chemische Veränderung der Histone die Voraussetzungen dafür, dass Zielgene überhaupt exprimiert werden können. Nur durch die Einbeziehung aller Faktoren kann sichergestellt werden, dass die Transkriptionsmaschinerie auch tatsächlich das gewünschte Zielgen erkennt und transkribiert.

4.4.3.1. Histon H3- und bZip-Überexpression

Es ist problemlos möglich, größere Mengen an GST-Histon H3-Fusionsprotein in *E. coli* zu exprimieren (Abb. 36). Da in der Zelle insgesamt viel Histon-Protein benötigt wird, verwundert es nicht, dass auch eine deutlich überhöhte Menge keinen sichtbaren Schaden anrichtet.

Bei bZip ist das anders. Hier handelt es sich sehr wahrscheinlich um einen Transkriptionsfaktor, der die Expression anderer Gene beeinflussen kann. Es ist leicht vorstellbar, dass die Überexpression eines funktionierenden Transkriptionsfaktors, der normalerweise nur in sehr geringer Menge exprimiert wird, das Gleichgewicht in einem Organismus durcheinander bringen kann. Unter Umständen sind davon sogar lebenswichtige Bereiche betroffen, so dass der Organismus nicht überlebt. Genau dies ist bei dem Versuch geschehen, GST-bZip-Fusionsprotein in *E. coli* zu exprimieren. Schon bei dem Versuch, das transformierte pGEX-Plasmid mit dem bZip-Insert wieder aus den Bakterien zu präparieren, fiel auf, dass die Ausbeute bei den meisten Klonen ungewöhnlich niedrig war. Bei allen Klonen mit normaler Ausbeute enthielt das Plasmid kein Insert. Als dann im nächsten

Schritt die Überexpression induziert wurde, hatten die Bakterien drei Alternativen: 1. Sie produzierten das gewünschte Fusionsprotein. 2. Sie exprimierten eine nicht funktionelle mutierte Version. 3. Sie eliminierten den Vektor. Dass in keinem der untersuchten Klone jemals eine überexprimierte Protein-Bande gefunden worden ist und die Bakteriensuspension insgesamt immer sehr schlecht gewachsen ist, spricht für das Eintreten der ersten und dritten Alternative.

Da sich *E. coli* nicht als bZip-Expressionssystem eignete, wurden schließlich beide Proteine einheitlich aus der One Hybrid-Hefe extrahiert. Boscheinen et al. (1997) haben gezeigt, dass es möglich ist, mit Hefe-Proteinextrakten Bindungsstudien durchzuführen.

4.4.3.2. Bindungsstudien

Um zu untersuchen, ob das bZip-Protein und Histon H3 tatsächlich an den C2-Promotor binden, wurden EMSAs (Abb. 37) durchgeführt.

Dabei liefern nur die Ansätze Signale, in denen bZip- und/oder Histon H3-Proteinextrakte mit einem C2-Promotorfragment inkubiert worden sind. Da gleichzeitig entsprechende Banden in der Proteinkontrolle und in der freien Probe ohne Protein fehlen, spricht dies für eine Bindung von bZip und Histon H3 an die DNA. Das Auftreten von zwei Banden könnte auf eine Dimer-Bildung der untersuchten Proteine hinweisen, eine Konformation, die für bZip und Histon H3 nicht ungewöhnlich wäre. Da das bZip-Protein und Histon H3 jedoch fast das gleiche berechnete Molekulargewicht besitzen, kann bei den Ansätzen, die beide Extrakte enthalten, nicht unterschieden werden, welche Proteine hier miteinander dimerisieren. Dies könnte nur durch die Verwendung selektiver Antikörper gezeigt werden. Bei dem EMSA mit den längeren Promotor-Fragmenten ist möglicherweise die Porengröße des Acrylamid-Gels zu gering, um diese größeren Komplexe in zwei getrennte Banden aufzulösen.

Die Konkurrenz mit im Überschuss zugegebener unmarkierter DNA führt nicht zur vollständigen Eliminierung der sichtbaren Banden, aber zu einer deutlichen Abschwächung. Insgesamt sieht es so aus, dass das bZip-Protein und Histon H3 an die untersuchte DNA binden.

4.4.3.3. Co-Bombardments

Zur Untersuchung, ob bZip-Proteine tatsächlich die Expression des C2-Promotors beeinflussen, wurden Co-Bombardments durchgeführt. Dabei konnte keine eindeutige Veränderung der C2-Expression beobachtet werden (Abb. 39). Um zu gewährleisten, dass beide Konstrukte gleichmäßig in allen transformierten Zellen vorliegen, sind die CaMV 35S::bZip- und C2::GUS-Fusionen auf denselben Vektor kloniert und zusammen transformiert worden.

Der erste Grund für das Ausbleiben erkennbarer Unterschiede bei der C2-Expression könnte in dem transformierten Konstrukt selber liegen. Diesem Konstrukt fehlt die 5'-Leadersequenz, in der sich bei bZip-Transkripten aus *Antirrhinum majus*, *Arabidopsis thaliana*, Reis und Mais ein kleines konserviertes offenes Leseraster befindet (siehe 4.4.1.2. und Abb. 42), das vermutlich auf post-transkriptioneller Ebene eine regulatorische Rolle spielt. Aufgrund der fehlenden Leadersequenz könnte das bZip-Protein nicht wie erwartet synthetisiert worden sein, so dass es auch nicht regulatorisch wirksam werden konnte.

Der zweite Grund könnte sein, dass dem bZip-Protein der passende Dimerisierungspartner gefehlt hat, denn bZip-Proteine der Gruppe S sind sehr klein und besitzen keine eigenen transaktivierenden Domänen. Bezüglich ihrer Funktionsweise sind zwei Mechanismen bekannt. Einerseits können kleine bZip-Proteine als negative Repressoren wirken, indem sie als Homo- oder Heterodimere mit einem Partnermolekül an die DNA binden und somit verhindern, dass andere Transkriptionsfaktoren Zugang finden. Zum Beispiel können die humanen bZip-Proteine Fos und Jun miteinander dimerisieren und bilden zusammen den Transkriptionsfaktor AP1, der durch DNA-Bindung die Expression von Zielgenen induziert. Kataoka et al. (1995) haben gezeigt, dass Fos sein aktivierendes Potential verliert, wenn es als Dimer mit einem kleinen bZip-Protein der Maf-Familie an seine DNA-Zielsequenz bindet. Gleichzeitig wird durch diese Form der kompetitiven Hemmung verhindert, dass AP1 fungieren kann. Andererseits behindern kleine bZip-Proteine der Maf-Familie nicht zwangsläufig die regulatorischen Fähigkeiten ihrer heterodimeren Partner. Kataoka et al. (1995) zeigten ebenfalls, dass kleine bZip-Proteine zusammen mit dem passenden Partner (NF-E2 p45) auch aktivierend wirksam sein können.

Falls die Wirkung des bZip-Proteins aus Craterostigma auf der Interaktion mit einem Partner basiert, der die Transaktivierungsdomäne mitbringt, und nur bZip in großer

Menge vorhanden ist, dann stellt der Reaktionspartner den limitierenden Faktor dar. Aus diesem Grund ist es nicht verwunderlich, dass keine Veränderung der C2-Expression beobachtet werden konnte.

4.5. Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zunächst der Promotor des durch Trockenstress und ABA induzierbaren LEA-Gens C2 untersucht. Dabei wurden cis-aktive regulatorische Elemente identifiziert, die für die C2-Expression bei Trockenstress und nach ABA-Induktion wichtig sind. Offen geblieben ist bislang, ob im C2-Promotor noch weitere regulatorische Elemente enthalten sind, die vielleicht über ähnliche Signaltransduktionswege angesteuert werden. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass der C2-Promotor das Ziel von zumindest zwei unterschiedlichen Regulationskaskaden ist, einer ABA-abhängigen und einer ABA-unabhängigen. Reinbothe et al. (1994) und Zegzouti et al. (1997) haben gezeigt, dass auch Ethylen und Jasmonsäuremethylester an der Regulation von LEA-Genen beteiligt sein können.

Um zu untersuchen, welche Rolle HDZip-Proteine bei der Regulation des C2-Promotors spielen, ist die Kreuzung von C2-Promotor::GUS-Linien mit verschiedenen CaMV 35S::HDZip-Linien auf den Weg gebracht worden (Xin Deng, unveröffentlichte Daten). Vielleicht erklären die zukünftigen Untersuchungen, warum der One Hybrid-Screen nicht zu der Isolierung von HDZip-Proteinen geführt hat.

Trockenstress bewirkt im Vergleich zu anderen LEA-Genen eine starke Induktion der C2-Promotoraktivität, die sich auch in anderen Organismen wie *Arabidopsis* beobachten lässt. Damit eröffnet sich die Möglichkeit, den C2-Promotor als Trockenstress-spezifischen Fusionspromotor zu nutzen, um den Einfluss interessanter Gene bei Trockenstress zu untersuchen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein regulatorisch wichtiger Abschnitt des C2-Promotors genutzt, um damit in einem One Hybrid-Screen Bindeproteine zu identifizieren. Insgesamt wurden vier verschiedene cDNAs isoliert: eine bZip- und drei Histon H3-cDNAs, von denen sich mutmaßliche regulatorische Proteine ableiten lassen.

Zwar sprechen viele Einzelaspekte dafür, dass diese Proteine tatsächlich an den C2-Promotor binden. Auf welche Weise sie regulierend wirksam werden, wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein, die biochemische Ansätze wie

Chromatinimmunopräzipitation involvieren. Um diesen Aspekt zu beleuchten, sind bereits Transaktivierungsstudien in Tabak-Protoplasten begonnen worden. Bisher konnte jedoch, genauso wie bei den Co-Bombardments, keine eindeutige Transaktivierung nachgewiesen werden (Xin Deng, unveröffentlichte Daten).

Insgesamt machen es die Resultate sehr wahrscheinlich, dass bZip noch einen weiteren Partner zur Interaktion benötigt, beispielsweise ein größeres bZip-Protein aus einer anderen bZip-Klasse, das möglicherweise auch eine Transaktivierungsdomäne besitzt. Um diesen Partner zu finden, bietet sich ein Two Hybrid-Screen an.

In der Vergangenheit haben bereits mehrere Studien gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor Viviparous1 (VP1) transaktivierende Funktion besitzt, die ebenfalls mit der Bindung an ABRE in Zusammenhang steht. Diese Untersuchungen wurden zum Beispiel mit dem Em-Promotor aus Weizen (Vasil et al., 1995) oder dem rab28-Promotor aus Mais (Busk and Pagès, 1997) durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass die transaktivierende Wirkung von VP1 unabhängig von ABA erfolgt. Ist ABA jedoch zusätzlich verfügbar, stellt sich ein synergistischer Effekt ein. Hobo et al. (1999b) haben bei Reis herausgefunden, dass die Wirkung von VP1 nur indirekt mit ABRE zu tun hat. VP1 bindet nämlich an das Klasse A-bZip-Protein TRAB1, das seinerseits ABRE im Promotor erkennt und die transaktivierende Wirkung von VP1 vermittelt. Auch bei *Craterostigma* ist ein homologes VP1-Gen isoliert worden, dessen Transkript allerdings nur in getrockneten Samen und jungen Keimlingen nachgewiesen wurde (Chandler and Bartels, 1997). Möglicherweise wird VP1 in adulten Pflanzen auf einem ähnlich niedrigen Level wie bZip exprimiert, dessen Expressionsniveau am Rande der Nachweisgrenze von Northern-Analysen lag. Auf jeden Fall sollte überprüft werden, ob VP1 aus *Craterostigma* an der C2-Regulation beteiligt ist und ob es an das hier beschriebene bZip-Protein oder seinen noch zu identifizierenden Interaktionspartner bindet.

Bei der Suche nach möglichen Interaktionspartnern sollte auch das Zellzyklus-unabhängig regulierte Histon H3 in die Untersuchungen mit einbezogen werden. Ein hypothetisches Schema, das die bisherige Vorstellung zur Regulation des C2-Promotors zeigt, ist in Abb. 43 dargestellt.

Um die Signaltransduktionskaskade weiter aufzuklären, muss ebenfalls mehr über die Regulation des bZip-Gens in Erfahrung gebracht werden. Die Differenz zwischen der beobachteten Transkriptlänge bei der Northern-Analyse und der Größe des

isolierten cDNA-Inserts zeigt, dass noch Teile des 5'-Bereichs fehlen. Es wäre sehr interessant zu erfahren, ob das bZip-Transkript tatsächlich einem posttranskriptionellen Regulationsmechanismus unterliegt. Um diese Frage weiter zu untersuchen, müsste zunächst einmal ein cDNA-Klon mit der vollständigen 5'-untranslatierten Region aus einer Genbank isoliert werden. Ebenso würde eine Überexpression und Aufreinigung zumindest von Teilbereichen des bZip-Proteins helfen, um Antikörper zu gewinnen, damit Expressionsanalysen auch auf Proteinebene durchgeführt werden können. Falls cytotoxische Effekte dies in *E. coli* unmöglich machen, können andere Zellsysteme oder *in vitro*-Translationssysteme getestet werden. Außerdem wäre es sehr interessant zu erfahren, zu welchen Effekten die Überexpression bzw. das Ausschalten des bZip-Gens in transgenen Arabidopsis-Pflanzen führt.

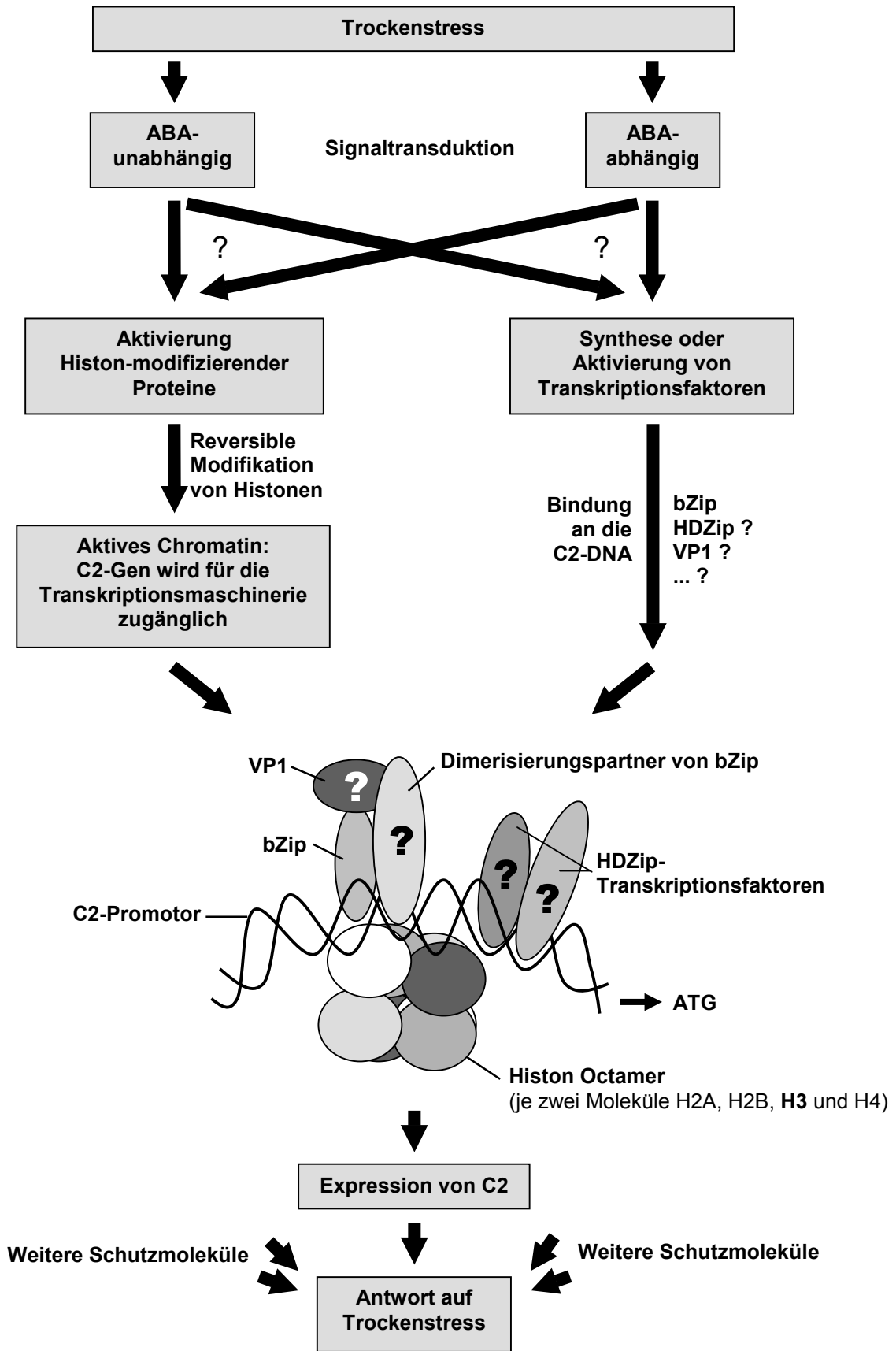


Abb. 43: Hypothetisches Schema zur Regulation des C2-Gens im Zusammenhang mit der Antwort auf Trockenstress

5. Zusammenfassung

Die Wiederauferstehungspflanze *Craterostigma plantagineum* dient als Modellsystem zur Erforschung der physiologischen Antwort auf Trockenstress. Im Verlauf der Austrocknung leitet dieser Organismus zahlreiche Schutzmaßnahmen ein, die es ihm ermöglichen, ein vollständiges Austrocknen unbeschadet zu überstehen. Um Näheres über die Regulation Trockenstress-induzierter Gene zu erfahren, wurde der Promotor des Gruppe IV-LEA-Gens C2 untersucht, das in hohem Maße bei Trockenstress und nach ABA-Applikation exprimiert wird.

Zuerst wurde der C2-Promotor aus einer genomischen Bank isoliert. Anschließend erfolgte die Konstruktion zahlreicher C2-Promotor::GUS-Fusionen. Die Expression dieser Konstrukte wurde in zwei Systemen getestet, nämlich im homologen System *Craterostigma plantagineum* und im heterologen System *Arabidopsis thaliana*. Die transiente Transformation von *Craterostigma*-Blättern wurde mit Hilfe von Bombardments durchgeführt, während *Arabidopsis* stabil durch Agrobakterien transformiert wurde.

Anhand einer 5'-Deletionsreihe gelang es zunächst, wichtige regulatorische Bereiche des C2-Promotors einzugrenzen. Mit Hilfe verschiedener mutagenisierter Promotor::GUS-Konstrukte konnte dann gezielt die Funktionalität zweier ABA-Response-Elemente (ABRE) und einer HDZip-Bindestelle nachgewiesen werden. Dieser eingegrenzte Promotorbereich diente im zweiten Teil der Arbeit als Ziel-DNA, mit der in einem One Hybrid-Screen nach möglichen Transkriptionsfaktoren gesucht wurde. Dabei wurden mehrfach unabhängig voneinander die cDNAs von einem bZip-Transkriptionsfaktor der Gruppe S und von drei Histon H3-Proteinen isoliert.

Die abgeleiteten 136 Aminosäuren langen Proteinsequenzen der drei Histone sind hoch konserviert und unterscheiden sich in maximal fünf Aminosäuren voneinander. Ihr zu erwartendes Molekulargewicht liegt bei 15,6 kDa. Bei zwei der drei Histone handelt es sich um konstitutiv exprimierte Varianten, die unabhängig vom Zellzyklus reguliert werden, einen Poly(A)-Schwanz tragen und vermutlich auch Introns besitzen. Diese Histon-Varianten können chemisch an zahlreichen Stellen im Molekül modifiziert werden und spielen sehr wahrscheinlich eine Rolle bei der Regulation der Genexpression. Das dritte Histon H3 trägt keinen Poly(A)-Schwanz

und vermutlich auch keine Introns. Somit handelt es sich um ein replikationsabhängig reguliertes Histon H3.

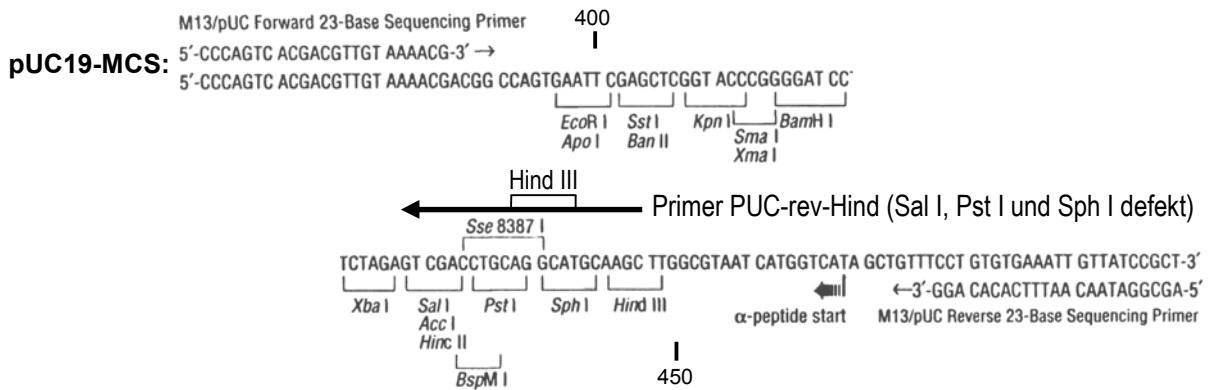
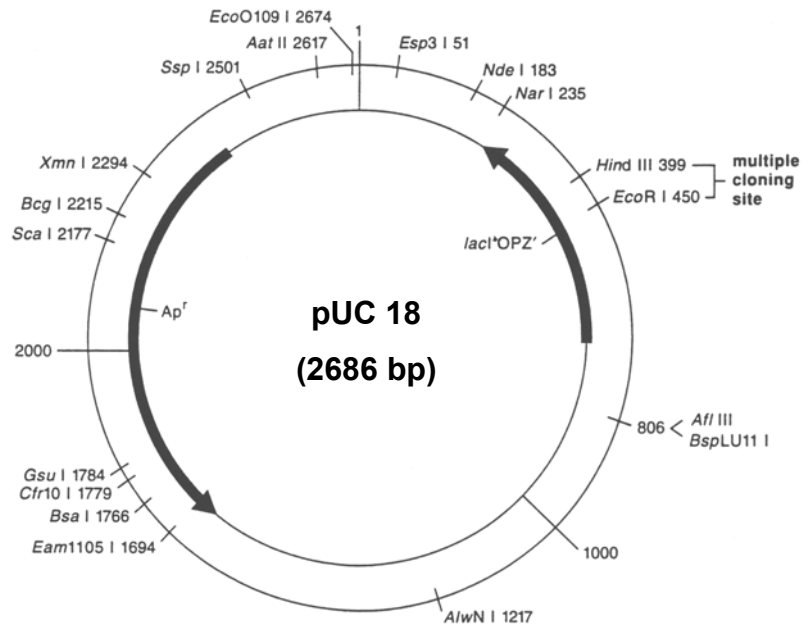
Das bZip-Protein ist 139 Aminosäuren lang und etwa 16 kDa groß. Es besitzt eine konservierte basische Domäne, die zur Bindung an die DNA dient, und eine Leucin-Zipper-Domäne, durch die Interaktion mit anderen Proteinen möglich ist. Das Protein weist die größten Homologien zu zwei bZip-Proteinen aus *Antirrhinum majus* auf, deren Bindestelle den beiden ABA-Response-Elementen im C2-Promotor stark ähnelt. Das bZip-Transkript wird konstitutiv gebildet, es gibt aber Hinweise auf eine mögliche post-transkriptionelle Regulation.

Ebenso wie die Histone ist auch bZip Mitglied einer kleinen Genfamilie. Anhand von GFP-Fusionskonstrukten konnte gezeigt werden, dass sowohl Histon H3 als auch das bZip-Protein im Zellkern exprimiert werden. Bindungsstudien zeigen, dass die Histon-Variante und das bZip-Protein an den C2-Promotor binden. Aber Co-Bombardments von CaMV 35S::bZip- und C2-Promotor::GUS-Konstrukten konnten bisher kein transaktivierendes Potential von bZip alleine nachweisen. Möglicherweise ist der dazu benötigte Dimerisierungspartner noch nicht identifiziert.

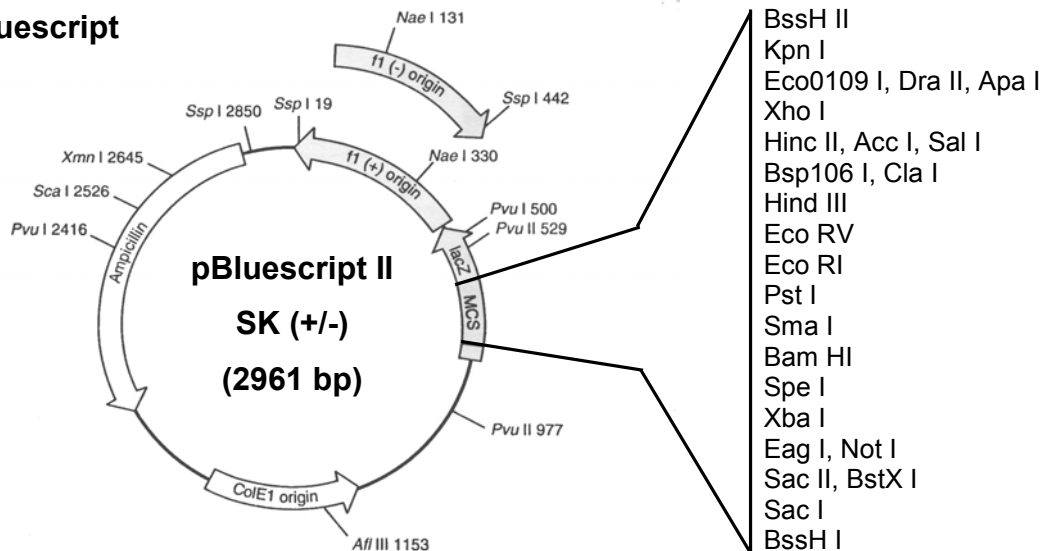
6. Anhang

6.1. Vektorkarten

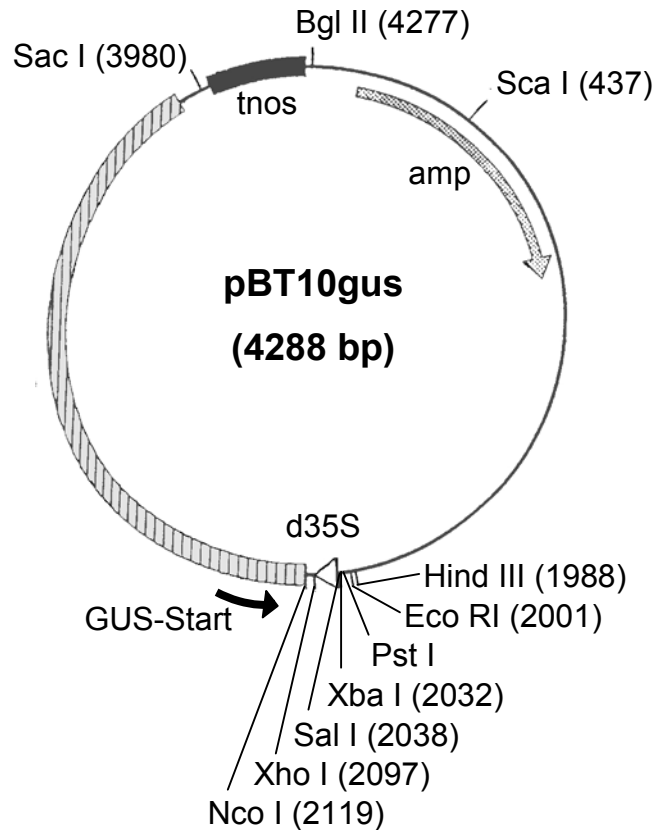
6.1.1. pUC



6.1.2. pBluescript

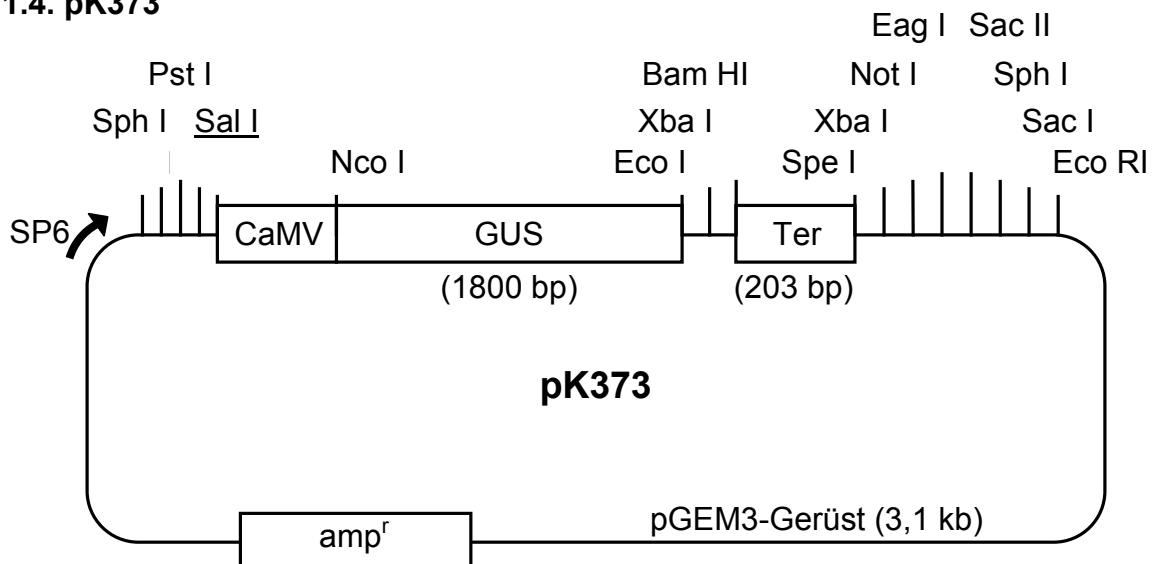


6.1.3. pBT10gus



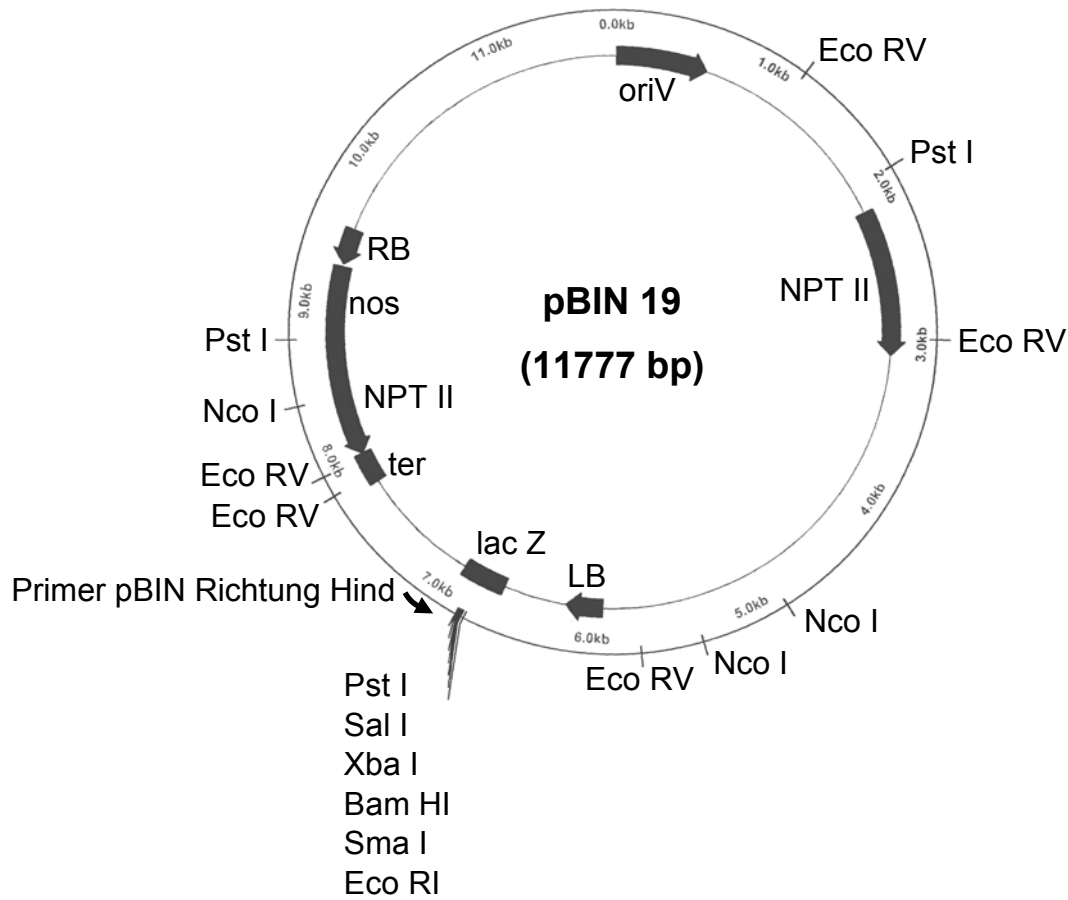
In den Vektor pBT10gus hineinklonierte C2-Promotorfragmente wurden durch Sequenzierung mit dem Primer GUS-Start kontrolliert.

6.1.4. pK373

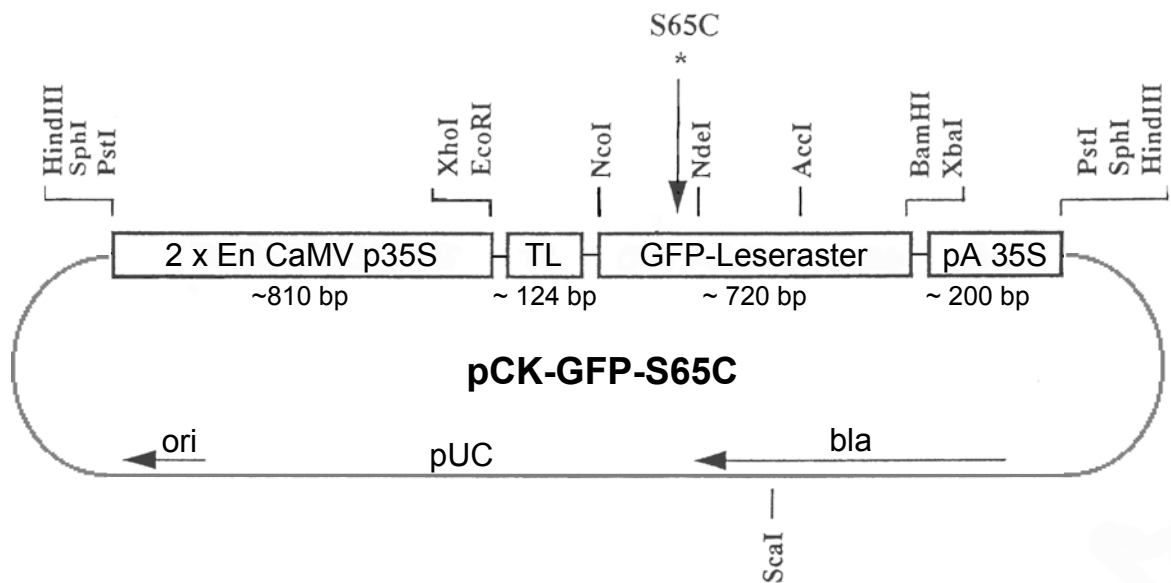


Die unterstrichenen Restriktionsschnittstellen treten nur einmal auf. Die Sequenzen der klonierten C2-Promotorfragmente wurden durch Sequenzierung mit dem Primer SP6 überprüft.

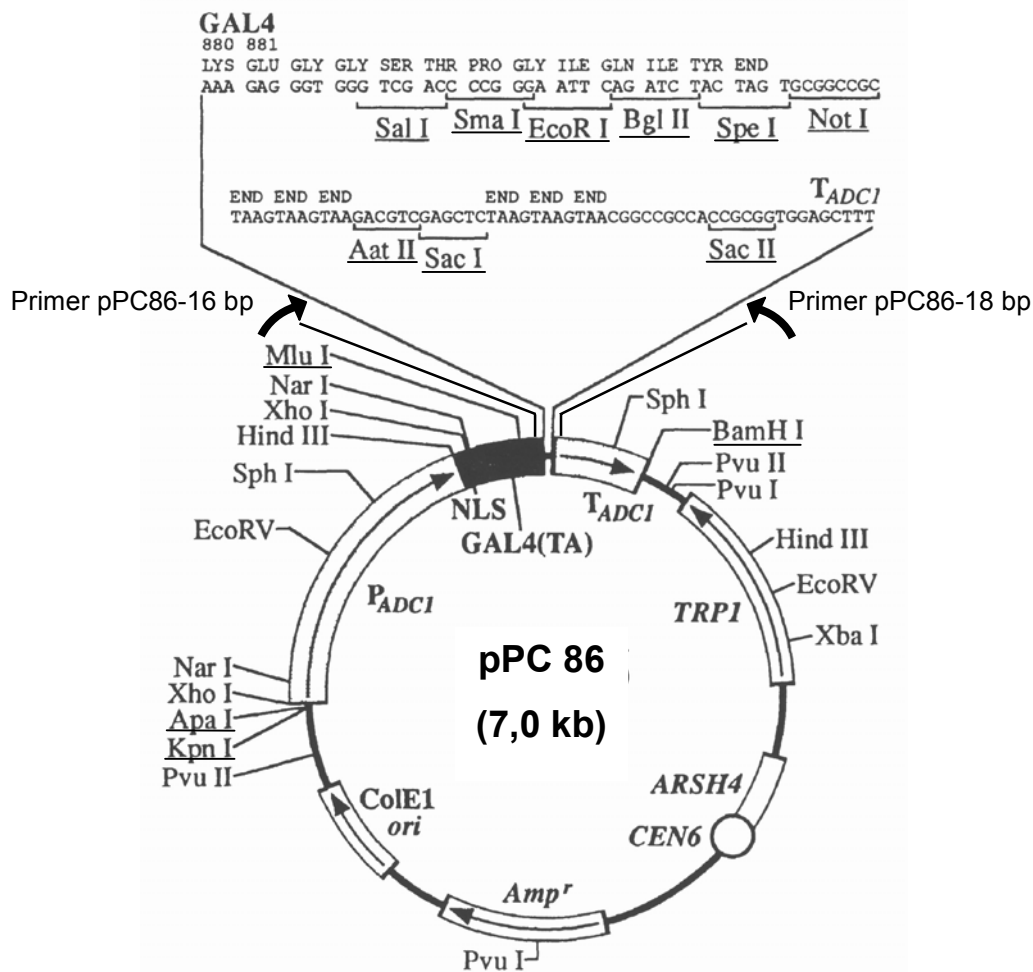
6.1.5. pBIN 19: Vektor zur Agrobacterien-vermittelten Pflanzentransformation



6.1.6. pCK-GFP-S65C

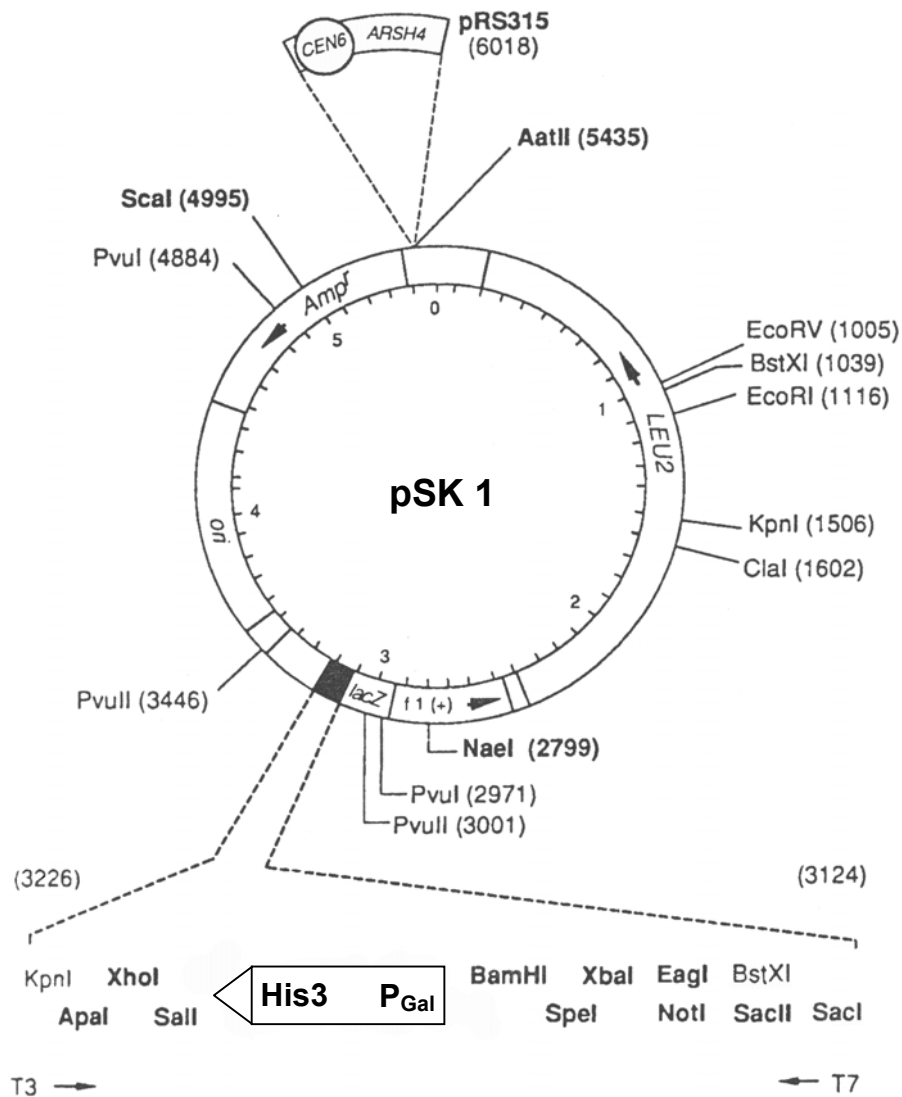


6.1.7. pPC 86: GAL4-Aktivierungsdomäne-Fusionsvektor



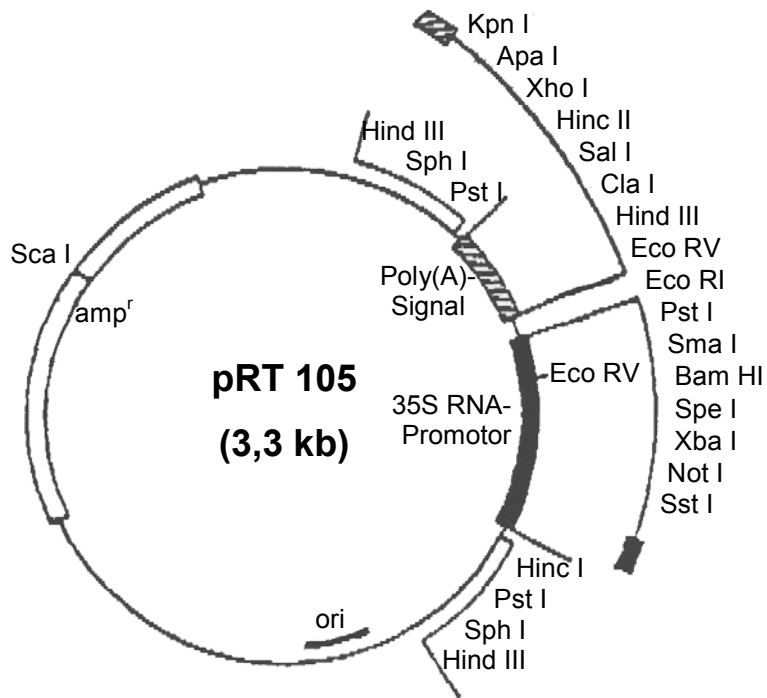
Der One Hybrid-Vektor pPC 86 codiert die GAL4-Aktivierungsdomäne [GAL4(TA)] unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors (P_{ADC1}). An eine Kernlokalisierungssignal-Sequenz (NLS) schließen sich die GAL4(TA)-Kodons an, gefolgt von einer multiplen Klonierungsstelle, die mit Stoppkodons in allen drei Leserastern und einem Terminationssignal (T_{ADC1}) endet. Für die Klonierung in Hefezellen sind ein Hefe-Zentromer (CEN6), ein Hefe-Replikationsursprung (ARSH4) und ein Tryptophan-Markergen (TRP1) vorhanden. Für die Klonierung in *E. coli* besitzt der Vektor einen bakteriellen Replikationsursprung (ColE1ori) und ein Ampicillin-Resistenzgen (Amp^r). Nur einfach vorhandene Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

6.1.8. pSK 1: Reporter-One Hybrid-Vektor

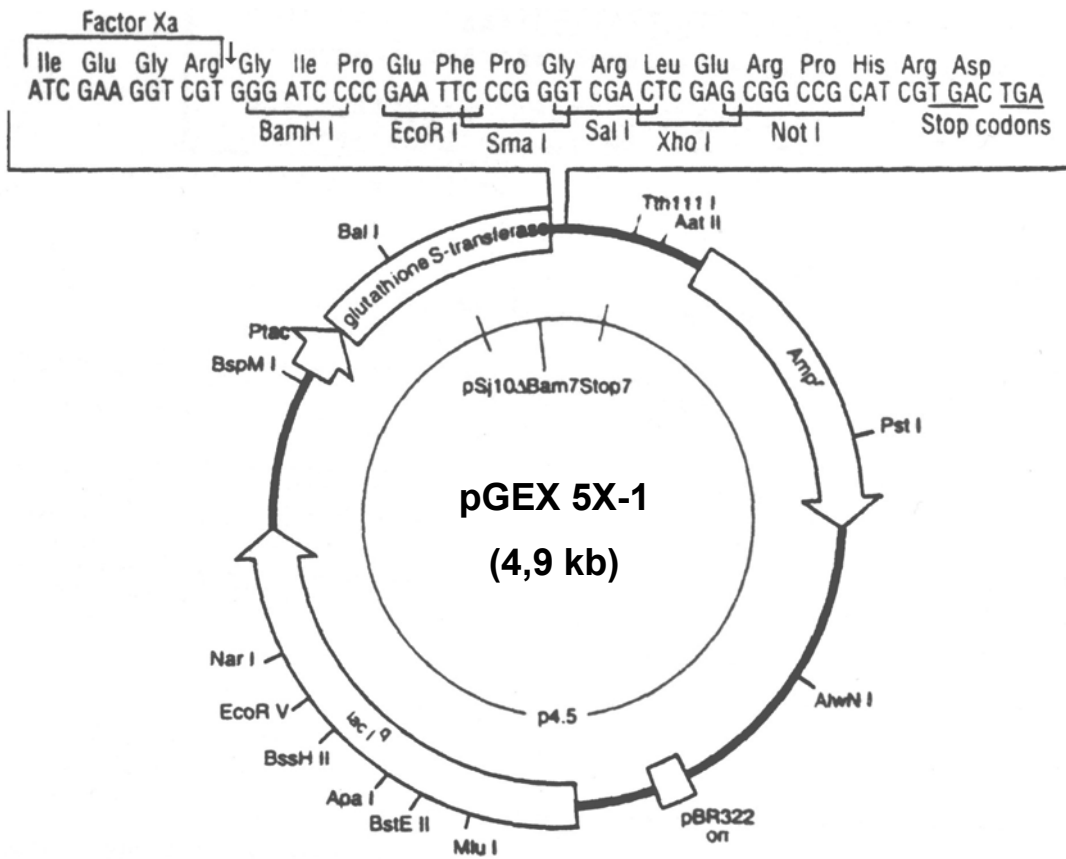


Der One Hybrid-Vektor pSK 1 besteht aus einem pBluescript II K/S (+/-)-Grundgerüst mit einem bakteriellen Replikationsursprung (ori) und einem Ampicillin-Resistenzgen (Amp^r). Für die Klonierung in Hefezellen sind ein Leucin-Markergen (LEU2) und eine Cassette mit Hefe-Zentromer (CEN6) und -Replikationsursprung (ARSH4) eingefügt worden. Das Reportergen His3 mit vorgeschaltetem Gal-Minimal-Promotor (P_{Gal}) wurde über die Restriktionsschnittstellen Sal I und Bam HI in die multiple Klonierungsstelle inseriert. Seine Expression befähigt die Hefe, auf Histidin-freiem Medium zu wachsen.

6.1.9. pRT 105



6.1.10. pGEX 5X-1



6.2. Sequenzen

6.2.1. Sequenz der cDNA-C2-Sonde, die zur Isolierung der genomischen C2-Sequenz benutzt wurde

C2-for →

GAATTCGGCA CGAGAAGAAA AAAAAATGCAG ACGGCCGAAGC AGAAAGTGAG CGACGCGGCG 60
 GCTTCAGCTC AGCAGAACGT CGATAAAGTT CGAGCCAAAG CCCAAGAAAA GCGGGAGAAA 120
 ACCGATGCGA GGACATCAGA AGAGAAAGAA ATGGCCACG AGCGTAAGGA GATTAGCGAA 180
 GCCGAAGCTA AGATGAAGAA GCACGAATCC AAGGCACAAA ACGTGGATAA GAAGGCCAC 240
 AGCCACCAGC AGCCGCCGCT TGGTGCGGAG GCGCCGCCCA CTGAGGGGTGG CGTTACCCCT 300

← C2-rev

ACTCCTAGTC CGGCGGCCGG TGGTCAGTAT CCTGGTGGTG CTGGGAGTCA TGTGATGTGA 360
 TTTGTTTAGT AC

Fettgedruckte Nukleotide weichen von der genomischen Sequenz ab. Die Schnittstellen Eco RI und Rsa I sind unterstrichen. Die Pfeile oberhalb der Sequenz markieren die Bindungsstellen der Primer C2-for und C2-rev.

6.3. Accession-Nummern

6.3.1. Accession-Nummern der Histon H3-homologen Proteine

a) Homologe Proteine der Klone 1, 12, 31, 32, 36 und 37:

1. Histon 2H3C1 (*Mus musculus*, AAO06264, 181 AS)
2. agCP9426 (*Anopheles gambiae* str. PEST, EAA00515, 160 AS)
3. agCP10831 (*Anopheles gambiae* str. PEST, EAA09847, 159 AS)
4. Histon H3B-ähnlich (*Rattus norvegicus*, XP 215175, 136 AS),
5. Histon H3.3, Hitze-induziert (*Trichinella pseudospiralis*, 136 AS)

b) Homologe Proteine der Klone 9 und 2:

1. Histon 2H3C1 (*Mus musculus*, AAO06264, 181 AS)
2. Protein, das mit Krankheitsresistenz-Protein verwandt ist, (*Oryza sativa*, AAL78367, 136 AS)
3. agCP9426 (*Anopheles gambiae* str. PEST, EAA00515, 160 AS)
4. agCP10831 (*Anopheles gambiae* str. PEST, EAA09847, 159 AS)
5. Putatives Histon H3 (*Arabidopsis thaliana*, NP 177690, Protein-ID At1g75600)

6.3.2. Accession-Nummern und Arabidopsis-Protein-Identifikationsnummern der bZip-homologen Proteine

1. DNA-binding protein bZIP-1 = bZIP910 (*Antirrhinum majus*; accession: CAA74022, Y13675; 133 AS)
2. DNA-binding protein bZIP-2 = bZIP911 (*A. majus*; CAA74023, Y13676; 140 AS)
3. bZIP transcription factor TBZF (*N. tabacum*; BAB13719, AB032478; 144 AS)
4. Common plant regulatory factor 6 (*P. crispum*; CAC00657, AJ292744; 147 AS)
5. bZIP transcription factor BZI-3 (*N. tabacum*; AAK92214, AY045571; 144 AS)
6. bZIP DNA-binding protein (*L. esculentum*; AAD55394, AF176641; 144 AS)
7. bZIP transcription factor-like protein = AtbZIP53 (*A. thaliana*; AAK94924, AF400620, Protein-ID: At3g62420; 146 AS)
8. DNA-binding protein tbz 17 (*Nicotiana tabacum*; BAA22204, D63951; 145 AS)
9. rdLIP gene (*Raphanus sativus*; BAA34938, AB015187; 144 AS)
10. bZIP transcription factor AtbZIP44 (*Arabidopsis thaliana*; NP 177672, NM 106193; Protein-ID: At1g75390; 167 AS)
11. bZIP family transcription factor = AtbZIP2 (*Arabidopsis thaliana*; NP 179408, NM 127373; Protein-ID: At2g18160; 171 AS)
17. bZIP transcription factor ATB2 = AtbZIP11 (*Arabidopsis thaliana*; CAA68078, X99747; Protein-ID: At4g34590; 160 AS)
33. bZIP family transcription factor = AtbZIP43 (*Arabidopsis thaliana*; NP 198696, NM 123241; Protein-ID: At5g38800; 165 AS)
37. bZIP protein = ATbZIP48 (*Arabidopsis thaliana*; NP 178489, NM 126441; Protein-ID: At2g04038; 166 AS)
40. bZIP family transcription factor = AtbZIP42 (*Arabidopsis thaliana*; NP 189674, NM 113954; Protein-ID: At3g30530; 173 AS)
41. bZIP family transcription factor protein = AtbZIP8 (*Arabidopsis thaliana*; NP 177054, NM 105562; Protein-ID: At1g68880; 138 AS)
46. bZIP family transcription factor = AtbZIP3 (*Arabidopsis thaliana*; NP 197087, NM 121588; Protein-ID: At5g15830; 186 AS)
48. bZIP family transcription factor = AtbZIP1 (*Arabidopsis thaliana*; NP 199756, NM 124322; Protein-ID: At5g49450; 145 AS)

7. Literatur

- Abe H., Yamaguchi-Shinozaki K., Urao T., Iwasaki T., Hosokawa D. and Shinozaki K. (1997)** Role of Arabidopsis MYC and MYB Homologs in Drought- and Abscisic Acid-Regulated Gene Expression. *Plant Cell* 9, 1859-1868.
- Abe H., Urao T., Ito T., Seki M., Shinozaki K. and Yamaguchi-Shinozaki K. (2003)** Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) Function as Transcriptional Activators in Abscisic Acid Signaling. *Plant Cell* 15, 63-78.
- Agatep R., Kirkpatrick R. D., Parchaliuk D. L., Woods R. A. and Gietz R. D. (1998)** Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by the lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol (LiAc/ss-DNA/PEG) protocol. Technical Tips Online (<http://tto.trends.com> and www.umanitoba.ca/faculties/medicine/biochem/gietz/Trafo.html).
- Ahmad K. and Henikoff S. (2002)** Histone H3 variants specify modes of chromatin assembly. *PNAS* 99, 16477-16484.
- Alamillo J., Almoguera C., Bartels D. and Jordano J. (1995)** Constitutive expression of small heat shock proteins in vegetative tissues of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Mol. Biol.* 29, 1093-1099.
- Alpert P. and Oliver M. J. (2002)** Drying Without Dying. Chapter 1 In: Black M. and Pritchard H. W. (eds.) *Desiccation and Survival in Plants: Drying Without Dying*. CABI Publishing, <http://www.cabi-publishing.org/Bookshop/Readingroom/0851995349.asp>.
- Baake M., Doenecke D. and Albig W. (2001)** Characterisation of Nuclear Localisation Signals of the Four Human Core Histones. *J. Cell. Biochem.* 81, 333-346.
- Baker J., Steele C. and Dure L. III (1988)** Sequence and characterization of 6 *Lea* proteins and their genes from cotton. *Plant Mol. Biol.* 11, 277-291.
- Bartels D. and Thompson R. (1983)** The characterization of cDNA clones coding for wheat storage proteins. *Nucl. Acids Res.* 11, 2961-2977.
- Bartels D., Schneider K., Terstappen G., Piatkowski D. and Salamini F. (1990)** Molecular cloning of abscisic acid-modulated genes which are induced during desiccation of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Planta* 181, 27-34.

- Bartels D., Hanke C., Schneider K., Michel D. and Salamini F. (1992)** A desiccation-related Elip-like gene from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* is regulated by light and ABA. EMBO J. 1992 11 (8), 2771-8.
- Bernacchia G., Schwall G., Lottspeich F., Salamini F. and Bartels D. (1995)** The transketolase gene family of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*: differential expression during the rehydration phase. EMBO J. 14 (3), 610-618.
- Bernacchia G., Salamini F. and Bartels D. (1996)** Molecular Characterization of the Rehydration Process in the Resurrection Plant *Craterostigma plantagineum*. Plant Physiol. 111, 1043-1050.
- Bertsch A. (1970)** CO₂-Gaswechsel und Wasserhaushalt der aerophilen Grünalge *Apatococcus lobotus*. Planta 70, 157-166.
- Bevan M. (1984)** Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. Nucl. Acids Res. 12, 8711-8721.
- Bianchi G., Gamba A., Murelli C., Salamini F. and Bartels D. (1991)** Novel carbohydrate metabolism in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. The Plant J. 1, 355-359.
- Boscheinen O., Lyck R., Queitsch C., Treuter E., Zimarino V. and Scharf K.-D. (1997)** Heat stress transcription factors from tomato can functionally replace HSF1 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Gen. Genet. 255, 322-331.
- Browne J., Tunnacliffe A., and Burnell A. (2002)** Plant desiccation gene found in a nematode. Nature 416, 38.
- Buchanan, Grissem and Jones (eds.) (2000)** Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists.
- Buitink J., Hoekstra F. A. and Leprince O. (2002)** Biochemistry and Biophysics of Tolerance Systems. Chapter 10 In: Black M. and Pritchard H. W. (eds.) Desiccation and Survival in Plants: Drying Without Dying. CABI Publishing, <http://www.cabi-publishing.org/Bookshop/Readingroom/0851995349.asp>.
- Busk P. K. and Pagès M. (1997)** Protein Binding to the Abscisic Acid-Responsive Element Is Independent of VIVIPAROUS1 in Vivo. Plant Cell 9, 2261-2270.
- Carpenter J. F., Crowe L. M. and Crowe J. H. (1987a)** Stabilization of a phosphofructokinase with sugars during freeze-drying: characterization of enhanced protection in the presence of divalent cations. Biochimica et Biophysica Acta 923, 109-115.

- Carpenter J. F., Martin B., Crowe L. M. and Crowe J. H. (1987b)** Stabilization of phosphofructokinase during air-drying with sugars and sugar/transition metal mixtures. *Cryobiology* 24, 455-464.
- Chandler J. W. and Bartels D. (1997)** Structure and function of the vp1 gene homologue from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* Hochst. *Mol. Gen. Genet.* 256 (5), 539-46.
- Chandler J. W., Abrams S. R. and Bartels D. (1997a)** The effect of ABA analogs on callus viability and gene expression in *Craterostigma plantagineum*. *Physiologia Plantarum* 99, 465-469.
- Chang B. S., Beauvais R. M., Dong A. and Carpenter J. F. (1996)** Physical factors affecting the storage stability of freeze-dried interleukin-1 receptor antagonist: glass transition and protein conformation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 331, 249-258.
- Chatterjee M. (2002)** Visualisierung der Genexpression in Pflanzenzellen durch GUS- und GFP-Reporter-Konstrukte am Beispiel der Phospholipase D. Diplomarbeit an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Bonn.
- Chaubet-Gigot N., Kapros T., Flenet M., Kahn C., Gigot C. and Waterborg J. H. (2001)** Tissue-dependent enhancement of transgene expression by introns of replacement histone H3 genes of *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 45, 17-30.
- Chen W., Provart N. J., Glazebrook J., Katagiri F., Chang H.-S., Eulgem T., Mauch F., Luan S., Zou G., Whitham S. A., Budworth P. R., Tao Y., Xie Z., Chen X., Lam S., Kreps J. A., Harper J. F., Si-Ammour A., Mauch-Mani B., Heinlein M., Kobayashi K., Hohn T., Dangl J. L., Wang X. and Zhu T. (2002)** Expression Profile Matrix of Arabidopsis Transcription Factor Genes Suggests Their Putative Functions in Response to Environmental Stresses. *Plant Cell* 14, 559-574.
- Chevray P. and Nathans D. (1992)** Protein interaction cloning in yeast: Identification of mammalian proteins that react with the leucine zipper of Jun. *PNAS* 89, 5789-5793.
- Clontech Matchmaker One Hybrid System Protocol.** Clontech Laboratories, 4030 Fabian Way, Palo Alto, CA 94303, USA.
- Close T. (1997)** A commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiologia Plantarum* 100, 291-296.

- Clough S. J. and Bent A. F. (1998)** Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16 (6), 735-743.
- Crowe J. H., Hoekstra F. A. and Crowe L. M. (1992)** Anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* 54, 579-599.
- Cuming A. (1999)** LEA proteins. In: Shewry P. R. and Casey R. (eds.) *Seed proteins*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 753-780.
- Deng X., Phillips J., Meijer A. H., Salamini F. and Bartels D. (2002)** Characterization of five novel dehydration-responsive homeodomain leucine zipper genes from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Mol. Biol.* 49, 601-610.
- Ditzer A. (1999)** Molekulare Charakterisierung von Trockenstress- und Abscisinsäure-induzierten Transkripten aus *Craterostigma plantagineum*. Diplomarbeit an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Bonn.
- Ditzer A., Kirch H.-H., Nair A. and Bartels D. (2001)** Molecular characterization of two alanin-rich *Lea genes* abundantly expressed in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* in response to osmotic stress and ABA. *J. Plant Physiol.* 158, 623-633.
- Doyle J. J. and Doyle J. L. (1989)** Isolation of plant DNA from fresh tissue. *BRL Focus* 12, 13-14.
- Dure L. III, Crouch M., Harada J., Ho T.-H. D., Mundy J., Quatrano R., Thomas T. and Zung Z. R. (1989)** Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Mol. Biol.* 12, 475-486.
- Feinberg A. P. and Vogelstein B. (1983)** A technique for radiolabeling DNA-restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132, 6-13.
- Felsenfeld G. and Groudine M. (2003)** Controlling the double helix. *Nature* 421, 448-453.
- Frank W., Phillips J., Salamini F. and Bartels D. (1998)** Two dehydration-inducible transcripts from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* encode interacting homeodomain-leucine zipper proteins. *Plant J.* 15, 413-421.

- Frank W., Munnik T., Kerkmann K., Salamini F. and Bartels D. (2000)** Water deficit triggers phospholipase D activity in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Cell* 12 (1), 111-124.
- Frisch D. A., Harris-Haller L. W., Yokubaitis N. T., Thomas T. L., Hardin S. H. and Hall T. C. (1995)** Complete sequence of the binary vektor Bin 19. *Plant Mol. Biol.* 27, 405-409.
- Furini A., Koncz C., Salamini F. and Bartels D. (1994)** *Agrobacterium*-mediated transformation of the desiccation-tolerant plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Cell Rep.* 14, 102-106.
- Furini A., Parcy F., Salamini F. and Bartels D. (1996)** Differential regulation of two ABA-inducible genes from *Craterostigma plantagineum* in transgenic Arabidopsis plants. *P. Mol. Biol.* 30, 343-349.
- Furini A., Koncz C., Salamini F. and Bartels D. (1997)** High level transcription of a member of a repeated gene family confers dehydration tolerance to callus tissue of *Craterostigma plantagineum*. *EMBO J.* 16 (12), 3599-3608.
- Gaff D. F. (1971)** Desiccation-tolerant flowering plants in Southern Africa. *Science* 174, 1033-1034.
- Gaff D. F. (1977)** Desiccation tolerant vascular plants of Southern Africa. *Oecologia* 31, 95-109.
- Galau G. A. and Hughes D. W. (1987)** Coordinate accumulation of homologous transcripts of seven cotton *lea* gene families during embryogenesis and germination. *Developmental Biology* 123, 213-221.
- Gallagher S. R. (1992)** Introduction, GUS Protocols. Academic Press Inc., San Diego.
- Gerlach W. L. and Bedbrook J. R. (1979)** Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucl. Acids Res.* 7, 1869-1885.
- Gibson T. J. (1984)** Studies on the Epstein-Barr virus genome. Dissertation an der Universität Cambridge, GB.
- Gietz, R. D. and Woods R. A. (1994)** High Efficiency transformation in Yeast. (Invited Book Chapter) In: *Molecular Genetics of Yeast: Practical Approaches*, ed. J.A. Johnston, Oxford University Press pp. 121-134.
- Goday A., Jensen A. B., Culiáñez-Marcia F. A., Alba M. M., Figueras M., Serratos J., Torrent M. and Pagès M. (1994)** The maize abscisic acid-

responsive protein Rab17 is located in the nucleus and interacts with nuclear localization signals. *Plant Cell* 6, 351-360.

- Golovina E. A., Hoekstra F. A. and Hemminga M. A. (1998)** Drying increases partitioning of amphiphilic substances into the lipid phase: impact of membrane permeability and significance for desiccation tolerance. *Plant Physiol.* 118, 975-986.
- Guo N., Puhlev I., Brown D. R., Mansbridge J. and Levine F. (2000)** Trehalose expression confers desiccation tolerance on human cells. *Nature Biotechnology* 18 (2), 168-171.
- Hardie D. G. (1999)** Plant Protein Serin/Threonine Kinases: Classification and Functions. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 97-131.
- Hattori T., Terada T. and Hamasuna S. (1995)** Regulation of the Osem gene by abscisic acid and the transcriptional activator VP1: analysis of cis-acting promoter elements required for regulation by abscisic acid and VP1. *Plant J.* 7 (6), 913-925.
- Heino P., Nylander M., Palva T. and Bartels D. (1998)** Isolation of a cDNA clone corresponding to a protein kinase differentially expressed in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *J. Exp. Bot.* 49 (327), 1773-1774.
- Hilbricht T., Salamini F. and Bartels D. (2002)** CpR18, a novel SAP-domain plant transcription factor, binds to a promoter region, necessary for ABA mediated expression of the *CDeT27-45* gene from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* Hochst. *Plant J.* 31 (3), 293-303.
- Hobo T., Asada M., Kowyama Y. and Hattori T. (1999a)** ACGT-containing abscisic acid response element (ABRE) and coupling element 3 (CE3) are functionally equivalent. *Plant J.* 19 (6), 679-689.
- Hobo T., Kowyama Y. and Hattori T. (1999b)** A bZIP factor, TRAB1, interacts with VP1 and mediates abscisic acid-induced transcription. *PNAS* 96, 15348-15353.
- Hoekema A., Hirsch P. R., Hooykaas P. J. J. , Schilperoort R. A. (1983)** A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303, 179-180.
- Ingram J. and Bartels D. (1996)** The molecular basis of desiccation tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 377-403.
- Ingram J., Chandler J. W., Gallagher L., Salamini F. and Bartels D. (1997)** Analysis of cDNA clones encoding sucrose-phosphate synthase in relation to

sugar interconversions associated with dehydration in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* Hochst. Plant Physiol. 115 (1), 113-21.

International Water Management Institute, IWMI, P O Box 75 Colombo, Sri Lanka, www.iwmi.org.

Iturriaga G., Leyns L., Villegas A., Gharaibeh R., Salamini F. and Bartels D. (1996) A family of novel myb-related genes from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* are specifically expressed in callus and roots in response to ABA or desiccation. Plant Mol. Biol. 32 (4), 707-16.

Izawa T., Foster R. and Chua N. H. (1993) Plant bZIP protein binding specificity. J. Mol. Biol. 230 (4), 1131-1144.

Jakoby M., Weisshaar B., Dröge-Laser W., Vicente-Carbajosa J., Tiedemann J., Kroj T. and Parcy F. (The bZIP Research Group) (2002) bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. Trends in Plant Science 7 (3), 106-111.

Jefferson R. A. (1987) Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. Plant Mol. Biol. Rep. 5, 387-405.

Johannesson H., Wang Y. and Engström P. (2001) DNA-binding and dimerization preferences of *Arabidopsis* homeodomain-leucine zipper transcription factors *in vitro*. Plant Mol. Biol. 45, 63-73.

Jonak C., Ökrész L., Bögre L. and Hirt H. (2002) Complexity, Cross Talk and Integration of Plant MAP Kinase Signalling. Current Opinion in Plant Biology, 5, 415-424.

Kappen L. and Valladares F. (1999) Opportunistic growth and desiccation tolerance: the ecological success of poikilohydrous autotrophs. In: Pugnaire F. I. and Valladares F. (eds.) Handbook of Functional Plant Ecology. Marcel Dekker, New York, 10-80.

Kataoka K., Igarashi K., Itoh K., Fujiwara K. T., Noda M., Yamamoto M. and Nishizawa M. (1995) Small Maf Proteins Heterodimerize with Fos and May Act as Competitive Repressors of the NF-E2 Transcription Factor. Mol. Cell. Biol. 95, 2180-2190.

Kelemen Z., Mai A., Kapros T., Feher A., Gyorgyey J., Waterborg J. H. and Dudits D. (2002) Transformation vector based on promoter and intron sequences of a replacement histone H3 gene. A tool for high, constitutive gene expression in plants. Transgenic Res. 11, 69-72.

- Kim S. Y., Chung H.-J. and Thomas T. L. (1997)** Isolation of a novel class of bZIP transcription factors that interact with ABA-responsive and embryo-specification elements in the *Dc3* promoter using a modified yeast one-hybrid system. *The Plant J.* 11 (6), 1237-1251.
- Kirch H.-H., Nair A. and Bartels D. (2001)** Novel ABA- and dehydration-inducible aldehyde dehydrogenase genes isolated from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 28 (4), 1-15.
- Kirch H.-H., Phillips J. and Bartels D. (2002)** Dehydration-stress signal transduction. In: Scheel D. and Wasternack C. (eds.) *Plant Signal Transduction*. Oxford University Press, 141-164.
- Kiyosue T., Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K. (1993)** Characterization of a cDNA for a dehydration-inducible gene that encodes a Clp A, B like protein in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196, 1214.
- Kiyosue T., Yoshida Y., Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K. (1996)** A Nuclear Gene Encoding Mitochondrial Proline Dehydrogenase, an Enzyme Involved in Proline Metabolism, Is Upregulated by Proline but Downregulated by Dehydration in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 8, 1323-1335.
- Kleines M. (1997)** Untersuchungen zur Regulation von Genen, die für Enzyme des Zuckerstoffwechsels von *Craterostigma plantagineum* kodieren. Dissertation an der Technischen Hochschule Aachen.
- Kleines M., Elster R. C., Rodrigo M. J., Blervacq A. S., Salamini F. and Bartels D. (1999)** Isolation and expression analysis of two stress-responsive sucrose-synthase genes from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* (Hochst.). *Planta* 209 (1), 13-24.
- Koizumi M., Yamaguchi-Shinozaki K., Tsuyi H. and Shinozaki K. (1993)** Structure and expression of two genes that encode distinct drought-inducible cysteine proteases in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 129, 175.
- Laemmli U. K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 681-685.
- Leprince O., Hendry G. A. F. and McKersie B. D. (1993)** The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. *Seed Sci. Res.* 3, 231-246.
- Leprince O., Colson P., Houssier C. and Deltour R. (1995)** Changes in chromatin structure associated with germination of maize and their relation with desiccation tolerance. *Plant, Cell and Environment* 18, 619-629.

- Liscovitch M., Czarny M., Fiucci G. and Tang X. (2000)** Phospholipase D: molecular and cell biology of a novel gene family. *Biochem. J.* 345, 401-415.
- Liu Q., Kasuga M., Sakuma Y., Abe H., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K. and 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*. *Plant Cell* 10, 1391-1406.
- Lohse M.-A. (2001)** Molekulare Untersuchungen zur Phospholipase D aus *Craterostigma plantagineum* Hochst. Diplomarbeit an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Bonn.
- Lorrow D. and Jessee J. (1990)** Max efficiency DH10B: A host for cloning methylated DNA. *Focus* 12 (1), 19.
- Maniatis T., Fritsch E. F. and Sambrook J. (1989)** *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mariaux J. B., Bockel C., Salamini F. and Bartels D. (1998)** Desiccation- and abscisic acid-responsive genes encoding major intrinsic proteins (MIPs) from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Mol. Biol.* 38 (6), 1089-99.
- Martinez-Garcia J. F., Moyano E., Alcocer M. J. C. and Martin C. (1998)** Two bZIP proteins from *Antirrhinum* flowers preferentially bind a hybrid C-box/G-box motif and help to define a new sub-family of bZIP transcription factors. *Plant J.* 13 (4), 489-505.
- Mazur P. (1968)** Survival of fungi after freezing and desiccation. In: Ainsworth G. C. and Sussman A. L. (eds.) *The Fungi*. Academic Press, London, 325-394.
- Michel D., Furini A., Salamini F. and Bartels D. (1994)** Structure and regulation of an ABA- and desiccation-responsive gene from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Mol. Biol.* 24 (4), 549-60.
- Mueller P. P. and Hinnebusch A. G. (1986)** Multiple upstream AUG codons mediate translational control of *GCN4*. *Cell* 45, 201-207.
- Munnik T., de Vrije T., Irvine R. F. and Musgrave A. (1996)** Identification of Diacylglycerol Pyrophosphate as a Novel Metabolic Product of Phosphatic Acid during G-Protein-Activation in Plants. *J. Biol. Chem.* 171 (26), 15708-15715.
- Munnik T., Meijer H. J. G., ter Ried B., Hirt H., Frank W., Bartels D. and Musgrave A. (2000)** Hyperosmotic stress stimulates phospholipase D activity

and elevates the levels of phosphatic acid and diacylglycerol pyrophosphate. *Plant J.* 22 (2), 147-154.

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

Nelson D., Salamini F. and Bartels D. (1994) Abscisic acid promotes novel DNA-binding activity to a desiccation-related promoter of *Craterostigma plantagineum*. *Plant J.* 5, 451-458.

Oliver M. J. and Bewley J. D. (1997) Desiccation-tolerance of plant tissues: a mechanistic overview. *Horticultural Rev.* 18, 171-213.

Ooms G., Hooykaas P. J. J., van Beelen P., Regensburg-Tuink T. J. G., Schilperoort R. A. (1982) Octopine Ti-plasmid deletion mutants of *Agrobacterium tumefaciens* with emphasis on the right side of the T-region. *Plasmid* 7, 15-29.

Osborne D. J., Boubriak I. and Leprince O. (2002) Rehydration of Dried Systems: Membranes and the Nuclear Genome. Chapter 12 In: Black M. and Pritchard H. W. (eds.) *Desiccation and Survival in Plants: Drying Without Dying*. CABI Publishing, <http://www.cabi-publishing.org/Bookshop/Readingroom/0851995349.asp>.

Phillips J. R., Hilbricht T., Salamini F. and Bartels D. (2002a) A novel abscisic acid- and dehydration-responsive gene family from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* encodes a plastid-targeted protein with DNA-binding activity. *Planta* 215 (2), 258-266.

Phillips J. R., Oliver M. J. and Bartels D. (2002b) Molecular Genetics of Desiccation and Tolerant Systems. Chapter 11 In: Black M. and Pritchard H. W. (eds.) *Desiccation and Survival in Plants: Drying Without Dying*. CABI Publishing, <http://www.cabi-publishing.org/Bookshop/Readingroom/0851995349.asp>.

Piatkowski D., Schneider K., Salamini F. and Bartels D. (1990) Characterization of five abscisic acid-responsive cDNA clones isolated from the desiccation-tolerant plant *Craterostigma plantagineum* and their relationship to other water-stress genes. *Plant Physiol.* 94, 1682-1688.

Pluthero F. G. (1993) Rapid purification of high-activity Taq DNA polymerase. *Nucl. Acids Res.* 21, 4850-4851.

- Porembski S. and Barthlott W. (2000)** Granitic and gneissic outcrops (inselbergs) as center of diversity for desiccation-tolerant vascular plants. *Plant Ecology* 151, 19-28.
- Potts M. (1999)** Mechanisms of desiccation tolerance in cyanobacteria. *European Journal of Phycology* 57, 43-68.
- Prestrelski S. J., Tedeschi N., Arakawa T. and Carpenter J. F. (1993)** Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers. *Biophysical J.* 65, 661-671.
- Proctor M. C. F. and Pence V. C. (2002)** Vegetative Tissues: Bryophytes, Vascular Resurrection Plants and Vegetative Propagules. Chapter 7 In: Black M. and Pritchard H. W. (eds.) *Desiccation and Survival in Plants: Drying Without Dying*. CABI Publishing, <http://www.cabi-publishing.org/Bookshop/Readingroom/0851995349.asp>.
- Ramanjulu S. and Bartels D. (2002)** Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant, Cell and Environment* 25, 141-151.
- Rasco-Gaunt S., Riley A., Barcelo P. and Lazzeri P. A. (1999)** Analysis of particle bombardment parameters to optimize DNA delivery into wheat tissues. *Plant Cell Reports* 19, 118-127.
- Reichel C., Mathur J., Eckes P., Langenkemper K., Koncz C., Schell J., Reiss B. and Maas C. (1996)** Enhanced green fluorescence by the expression of an *Aequoria victoria* green fluorescent protein mutant in mono- and dicotyledonous plant cells. *PNAS* 93, 5888-5893.
- Reinbothe C., Tewes A., Lehmann J., Pathier B. and Reinbothe S. (1994)** Induction of methyl jasmonate of embryogenesis-related proteins and mRNA in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Science* 104, 59-70.
- Richardson D. H. S. (1981)** *The biology of mosses*. Blackwell Scientific, New York.
- Rogers S. O. and Bendich A. J. (1985)** Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol. Biol.* 5, 69-76.
- Rounsley S. D., Glodek A., Sutton G., Adams M. D., Somerville C. R., Venter J. C. and Kerlavage A. R. (1996)** The construction of Arabidopsis EST assemblies: A new resource to facilitate gene identification. *Plant Physiol.* 112, 1177-1183.
- Sales K., Brandt W., Rumbak E. and Lindsay G. (2000)** The Lea-like protein HSP 12 in *Saccharomyces cerevisiae* has a plasma membrane location and

protects membranes against desiccation and ethanol-induced stress. *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes* 1463, 267-278.

Santos-Rosa H., Schneider R., Bannister A. J., Sherriff J., Bernstein B. E., Emre N. C. T., Schreiber S. L., Mellor J. and Kouzarides T. (2002) Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* 419, 407-411.

Schopfer P. und Brennicke A. (1999) *Pflanzenphysiologie*, 5. Auflage, Springer Verlag.

Scippa S., Griffiths A., Chiatante D. and Bray E. A. (2000) The H1 histone variant of tomato, H1-S, is targeted to the nucleus and accumulates in the chromatin in response to water-deficit stress. *Plant* 211, 173-181.

Sessa G., Morelli G. and Ruperti I. (1997) DNA-binding specificity of the homeodomain-leucine zipper domain. *J. Mol. Biol.*, 274 (3), 303-309.

Setlow P. (1992a) DNA in dormant spores of *Bacillus* species is in an A-like conformation. *Mol. Microbiol.* 6, 563-567.

Setlow P. (1992b) I will survive: protecting and repairing spore DNA. *J. Bacteriology* 174, 2737-2741.

Shen Q., Zhang P. and Ho T.-H. D. (1996) Modular Nature of Abscisic Acid (ABA) Response Complexes: Composite Promoter Units That Are Necessary and Sufficient for ABA Induction of Gene Expression in Barley. *Plant Cell* 8, 1107-1119.

Smirnoff N. (1993) The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist* 125, 27-58.

Snedden W. A. and Fromm H. (2001) Calmodulin as a versatile calcium signal transducer in plants. *New Phytologist* 151 (1), 35.

Soares M. B., Bonaldo M. d. F., Jelene P., Su L., Lawton L. and Efstratiadis A. (1994) Construction and characterization of a normalized cDNA library. *PNAS* 91, 9228-9232.

Southern E. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoreses. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.

Steponkus P. L., Uemura M. and Webb M. S. (1993) The contrast of the cryostability of the plasma membrane of winter rye and spring oat – two species that widely differ in their freezing tolerance and plasma membrane lipid composition. In: Steponkus P. L. (ed.) *Advances in Low Temperature Biology* Vol. 2, JAI Press, London, 211-312.

- Strahl B. D. and Allis C. D. (2000)** The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45.
- Strasburger** Lehrbuch der Botanik, 35. Auflage 2002, Spektrum Lehrbuch, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Strathmann A., Kuhlmann M., Heinekamp T. and Dröge-Laser W. (2001)** BZI-1 specifically heterodimerises with the tobacco bZIP transcription factors BZI-2, BZI-3/TBZF and BZI-4, and is functionally involved in flower development. *Plant J.* 28 (4), 397-408.
- Sun W., Bernard C., van de Cotte B., Montagu M. V. and Verbruggen N. (2001)** At-HSP17.6A, encoding a small heat-shock protein in Arabidopsis, can enhance osmotolerance upon overexpression. *Plant J.* 27 (5), 407-415.
- Taiz L. und Zeiger E. (eds.) (2000)** Physiologie der Pflanzen. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Talbert P. B., Masuelli R., Tyagi A. P., Comai L. and Henikoff S. (2002)** Centromeric Localization and Adaptive Evolution of an Arabidopsis Histone H3 Variant. *Plant Cell* 14, 1053-1066.
- Toldi O., Toth S., Ponyi T. and Scott P. (2002)** An effective and reproducible transformation protocol for the model resurrection plant *Craterostigma plantagineum* Hochst. *Plant Cell Rep.* 21, 63-69.
- Thomas P. S. (1980)** Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *PNAS* 77, 5201-5205.
- Töpfer R., Matzeit V., Gronenborn B., Schell J. and Steinbiss H.-H. (1987)** A set of plant expression vectors for the transcriptional and translational fusions. *Nucl. Acids Res.* 15 (14), 5890.
- Tung W. L. and Chow K.-C. (1995)** A modified medium for efficient electrotransformation of *E. coli*. *Trends in Genetics* 11, 128-129.
- UNESCO (2003)** Weltwasserentwicklungsbericht der Vereinten Nationen. UNO-Verlag Bonn, www.unesco.org/water/wwap.
- Uno Y., Furihata T., Abe H., Yoshida R., Shinozaki K. and Yamaguchi-Shinozaki K. (2000)** Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *PNAS* 97 (21), 11632-11637.
- Vasil V., Marcotte W. R., Rosenkrans L., Cocciolone S. M., Vasil I. K., Quatrano R. S. and McCarty D. R. (1995)** Overlap of Viviparous1 (VP1) and Abscisic

Acid Response Elements in the *Em* Promoter: G-Box Elements Are Sufficient but Not Necessary for VP1 Transactivation. *Plant Cell* 7, 1511-1518.

- Velasco R., Salamini F. and Bartels D. (1994)** Dehydration and ABA increase mRNA levels and enzyme activity of cytosolic GAPDH in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Mol. Biol.* 26 (1), 541-546.
- Velasco R., Salamini F. and Bartels D. (1998)** Gene structure and expression analysis of the drought- and abscisic acid-responsive CDeT11-24 gene family from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* Hochst. *Planta* 204 (4), 459-471.
- Walters C., Farrant J. M., Pammenter N. W. and Berjak P. (2002)** Desiccation Stress and Damage. Chapter 9 In: Black M. and Pritchard H. W. (eds.) *Desiccation and Survival in Plants: Drying Without Dying*. CABI Publishing, <http://www.cabi-publishing.org/Bookshop/Readingroom/0851995349.asp>.
- Waterborg J. H. (1992)** Existence of two histone H3 variants in dicotyledonous plants and correlation between their acetylation and plant genome size. *Plant Mol. Biol.* 18, 181-187.
- Waterborg J. H. (1993)** Histone synthesis and turnover in alfalfa. Fast loss of highly acetylated replacement histone variant H3.2. *J. Biol. Chem.* 268, 4912-4917.
- Wehmeyer N. and Vierling E. (2000)** The Expression of Small Heat Shock Proteins in Seeds Responds to Discrete Developmental Signals and Suggests a General Protective Role in Desiccation Tolerance. *Plant Physiol.* 122, 1099-1108.
- Werner M., Feller A., Messengua F. and Pierard A. (1987)** The leader peptide of yeast gene CPA1 is essential for the translational repression of its expression. *Cell* 49, 805-813.
- Williams M. E., Foster R. and Chua N.-H. (1992)** Sequences Flanking the Hexameric G-Box Core CACGTG Affect the Specificity of Protein Binding. *Plant Cell* 4, 485-496.
- Wilson T., Fahrner T., Johnston M., Milbrand J. (1991)** Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. *Science* 252, 1296-1300.
- Wolkerts W. F., McCreedy S., Brandt W., Lindsay G. G. and Hoekstra F. A. (2000)** Isolation and characterization of a D-7 LEA protein from pollen that stabilizes glasses *in vitro*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1544, 196-206.
- Wrzaczek M. and Hirt H. (2001)** Plant MAP kinase pathways: how many and what for? *Biology of the Cell*, 93, 81-87.

-
- Xu D., Duan X., Wang B., Hong B., Ho T.-H. D. and Wu R. (1996)** Expression of a late embryogenesis-abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol.* 110, 249-257.
- Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K. (1994)** A Novel *cis*-Acting Element in an Arabidopsis Gene Is Involved in Responsiveness to Drought, Low-Temperature, or High-Salt Stress. *Plant Cell* 6, 251-264.
- Yu L. and Gorovsky M. A. (1997)** Constitutive Expression, Not a Particular Primary Sequence, Is the Important Feature of the H3 Replacement Variant hv2 in *Tetrahymena thermophila*. *Molecular and Cellular Biology*, 6303-6310.
- Zegzouti H., Jones B., Marty C. and Lelivre J.-M. (1997)** ER5, a tomato cDNA encoding an ethylene-responsive LEA-like protein: Characterization and expression in response to drought, ABA and wounding. *Plant Mol. Biol.* 35, 847-854.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Dorothea Bartels danken, die es mir ermöglicht hat, diese Arbeit anzufertigen und die mich mit großem Engagement betreut hat.

Heide Schnabl danke ich sehr für die Übernahme des Koreferats.

Hans-Hubert Kirch war neben Frau Bartels eine weitere Anlaufstelle für meine vielen Fragen. Ein herzliches Dankeschön dafür.

Beate Knauth, die damals Doktorandin in der Abteilung von Professor Klämbt war, bin ich dafür dankbar, dass sie mich während eines dreiwöchigen Berufspraktikums zur Halbzeit meiner BTA-Ausbildung sehr engagiert betreut hat, und dadurch mein Interesse an der pflanzlichen Hormonforschung geweckt hat.

Für tatkräftige Unterstützung bei meiner Arbeit danke ich Barbara Eilts, Birgit Walldorf und Susi Anhäuser, insbesondere für die Durchführung der fluorometrischen GUS-Messungen im MPIZ in Köln und für Hilfe beim Ausplattieren mehrerer Zehntausend Arabidopsis-Samen.

Bei Heidi Geithmann möchte ich mich herzlich für ihre Hilfe bei der Erstellung der Arabidopsis- und Craterostigma-Abbildungen bedanken.

Der Abteilung von Professor Menzel sage ich meinen Dank für die Benutzung der Particle Gun sowie des Laser-Mikroskops, ebenso der Abteilung von Professor Schreiber für den Gebrauch des Photo-Mikroskops.

Gerne möchte ich auch diejenigen erwähnen, die im Laufe der Zeit dazu beigetragen haben, dass mir meine Arbeit Spass gemacht hat. Dies waren insbesondere Ellinor Hertweck, Birgit Walldorf, Magdy Mattar, Tobias Wojciechowski, Andrea Deinken, Tobias Reetz, Ambili Nair, Alexandra Mies, Steffi Kelbert, Marc Lohse, Annelie Häuft, Ramanjulu Sunkar, Isabel Bartrina, Pius Parakattil, Mona Chatterjee, Andreas Kutscheidt, Susi Anhäuser, Ghada Ismail, Michael Kutzer, Siméon Oloni Kotchoni, Ramtin Rahmanzadeh und Simone Schlingensiepen.

An dieser Stelle möchte ich auch an Uschi Schwabe erinnern, die bis zu ihrem frühen Tod am 24.12.2001 immer ein wichtiger Bestandteil unserer Arbeitsgruppe gewesen ist. Ich werde sie immer in guter Erinnerung behalten.

Meinen Eltern danke ich sehr herzlich für ihre Unterstützung.

Ganz besonders danke ich Martin Volck für die Durchsicht des Manuskripts, für den seelischen Beistand, der so manches Mal nötig war, und nicht zuletzt für sein Verständnis, wenn es mal wieder etwas länger dauerte im Labor ...