

**Molekulare Charakterisierung des
trockenstressinduzierten Gens CpGRP1
isoliert aus der
Wiederauferstehungspflanze
*Craterostigma plantagineum***

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von
Barbara Kampmann
aus
Bonn, Deutschland

Bonn 2017

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Dorothea Bartels

2. Gutachter: Prof. Dr. Peter Dörmann

Tag der Promotion: 29.09.2017

Erscheinungsjahr: 2017



Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	8
Abkürzungsverzeichnis	10
1 Einleitung	12
1.1 Bevölkerungswachstum, Klimawandel und Nahrungsmittelbedarf.....	12
1.2 Wiederaufierungspflanzen und Trockenstresstoleranz.....	13
1.3 Trockenstressinduzierte Modulation der Genexpression.....	17
1.3.1 ABA-abhängige und ABA-unabhängige Genexpression.....	18
1.4 Die Versuchspflanzen.....	19
1.4.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> – moderat trocken tolerant.....	19
1.4.2 <i>Cratogeomys plantagineum</i> – austrocknungstolerant.....	20
1.4.3 <i>Lindernia brevidens</i> - austrocknungstolerant.....	21
1.4.4 <i>Lindernia subracemosa</i> - austrocknungssensitiv.....	22
1.5 Cratogeomys Glycinreiches Protein 1.....	22
1.6 Ziele dieser Arbeit.....	24
1.6.1 Proteinmenge von CpGRP1 in <i>C. plantagineum</i> wt – nach ABA- und Mannitolbehandlung.....	24
1.6.2 Die Lokalisation des Proteins CpGRP1 untersucht in transient und stabil transformierten <i>C. plantagineum</i> Pflanzen.....	25
1.6.3 Untersuchung des Promotors von CpGRP1 und der Promotoren..... der homologen Gene in <i>L. brevidens</i> und <i>L. subracemosa</i>	25
1.6.4 Erzeugung und Untersuchung von Überexpressionslinien.....	27
2 Material und Methoden	28
2.1 Pflanzenmaterial.....	28
2.2 Bakterien.....	28
2.3 Vektoren.....	29
2.4 Primer.....	38
2.5 Kits.....	40
2.6 Geräte.....	40
2.7 Chemikalien, Enzyme und DNA/Protein Größenstandards.....	41
2.8 Medien und Zusätze für Medien.....	41
2.9 Puffer und Lösungen.....	42
2.10 Datenbank und Software.....	42
2.11 RNA Extraktion aus <i>A. thaliana</i>	43
2.12 RNA Extraktion aus <i>C. plantagineum</i>	44
2.13 DNA Extraktion.....	45

2.14	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration in einer Lösung	45
2.15	DNA Extraktion aus Agarosegel	45
2.16	Extraktion von Gesamtprotein	45
2.17	cDNA Synthese.....	46
2.18	(RT-)PCR.....	46
2.19	Agarose Gel Elektrophorese	47
2.20	Herstellung Rubidiumchlorid kompetenter Zellen	48
2.21	Klonierung.....	48
2.22	Transformation von <i>E. coli</i> durch einen Hitzeschock	48
2.23	Plasmidpräparation	49
2.24	Sequenzierung.....	49
2.25	Herstellung von Glycerin Vorräten.....	49
2.26	Transiente Transformation durch ballistische Transformation	49
2.27	Erzeugung kompetenter Agrobakterien	51
2.28	Stabile Transformation mittels Agrobakterien	51
2.29	Samen: Sterilisation, Aussaat, Vernalisation und Selektion.....	52
2.30	GUS Färbung – Qualitativer GUS Assay.....	52
2.31	Quantitative GUS Messung – MUG Assay	53
2.32	Genome Walking.....	54
2.33	Ion-Leakage Test	54
2.34	Lipid Peroxidation.....	55
2.35	SDS Gele	55
2.36	Coomassie-Färbung.....	56
2.37	Ponceau Färbung.....	56
2.38	Protein Blot	56
2.39	Immundetektion von Proteinen.....	57
2.40	Überexpression von Proteinen	58
2.41	Anzucht und Untersuchung der Überexpressionslinien	58
3	Ergebnisse.....	60
3.1	Proteinmenge von CpGRP1 in <i>C. plantagineum</i> nach ABA- und Mannitolbehandlung.....	60
3.2	Die Lokalisation des Proteins CpGRP1	62
3.2.1	Transiente Transformation von <i>C. plantagineum</i> mit CpGRP1	62
3.2.2	Stabile Transformation mit CpGRP1 - Transgene Linien.....	63
3.3	Untersuchung des Promotors von CpGRP1 und der Promotoren der homologen Gene in <i>L. brevidens</i> und <i>L. subracemosa</i>	67
3.3.1	Trockenstressinduzierte Aktivität des CpGRP1 Promotors.....	67
	transient exprimiert in <i>C. plantagineum</i>	67

3.3.2	Untersuchung des entwicklungspezifischen Genexpressionsmusters von CpGRP1 durch <i>A. thaliana</i> Promotor-GUS Linien	70
3.3.3	Trockenstressinduzierte Aktivität des CpGRP1 Promotors in <i>A. thaliana</i> Promotor-GUS-Linien	77
3.3.4	Expressionsmuster von CpGRP1 in <i>C. plantagineum</i> und der homologen Gene in <i>L. brevidens</i> und <i>L. subracemosa</i> und Beschaffenheit der Promotoren	80
3.4	Erzeugung und Untersuchung von CpGRP1-Überexpressionslinien	86
3.4.1	Genotypisierung	86
3.4.2	Keimung	87
3.4.3	Durchmesser, Wuchshöhe und Verzweigungszahl	88
3.4.4	Blütenstand, Blütenbildung	92
3.4.5	Wurzellänge	94
3.4.6	RNA-Quantifizierung	95
3.4.7	Protein Quantifizierung	96
3.4.8	Ionen-Leck-Test	98
3.4.9	Lipid-Peroxidation	99
3.4.10	Übersicht CpGRP1-Überexpressionslinien	102
4	Diskussion	105
4.1	Proteinexpression von CpGRP1 in <i>C. plantagineum</i> wt – ABA- und Mannitolbehandlung	105
4.2	Die Lokalisation des Proteins CpGRP1	106
4.2.1	Transiente Transformation von <i>C. plantagineum</i>	106
4.2.2	Stabile Transformation - Transgene Linien	107
4.3	Untersuchung des Promotors von CpGRP1 und der Promotoren der homologen Gene in <i>L. brevidens</i> und <i>L. subracemosa</i> und deren Expressionsmuster	108
4.3.1	Trockenstressinduzierte Aktivität des CpGRP1 Promotors transient exprimiert in <i>C. plantagineum</i>	108
4.3.2	Untersuchung des entwicklungspezifischen Genexpressionsmusters von CpGRP1 durch <i>A. thaliana</i> Promotor-GUS Linien	109
4.3.3	Trockenstress induzierte Aktivität des CpGRP1 Promotors stabil exprimiert in <i>A. thaliana</i>	112
4.3.4	Expressionsmuster von CpGRP1 in <i>C. plantagineum</i> und der homologen Gene in <i>L. subracemosa</i> und <i>L. brevidens</i> im Vergleich und Beschaffenheit der Promotoren	113
4.4	Erzeugung und Untersuchung von Überexpressionslinien	115
5	Zusammenfassung und Ausblick	119
5.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	119
5.2	Ausblick	121
6	Anhang	123
A.1	Lichtmikroskopische Aufnahme 35S-CpGRP1	123

A.2 <i>In silico</i> Analyse Promotor	123
A.2.1 Promotorelementdichte im Vergleich	123
A.2.2 Promotoranalyse mit PLACE	124
A.2.3 Promotoralignments.....	132
7 Erklärung	142
8 Danksagung	143
9 Literaturverzeichnis	144

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Model der Klimabedingungen in Bezug auf globale Trockenheit von 2030 bis 2039.....	12
Abbildung 2: Model des Effekts von Wasserverlust auf die Zellwand	15
Abbildung 3: Die Versuchspflanzen.....	20
Abbildung 4: Verwandtschaftsverhältnis von <i>C. plantagineum</i> , <i>L. brevidens</i> und <i>L. subracemosa</i>	22
Abbildung 5: Vektorkarte des Vektors pJET1.2/blunt.....	29
Abbildung 6: Karte des Vektors pBT10-Gus.....	30
Abbildung 7: Vektors pGJro280	31
Abbildung 8: Karte des Vektors pTS35-luc.....	32
Abbildung 9: Karte des Vektors pET-28a(+)	32
Abbildung 10: Vektors pBIN19	34
Abbildung 11: Promotor-GUS Konstrukte.....	35
Abbildung 12: Vektor pBIN19-35S-CpGRP1-roGFP.....	35
Abbildung 13: Vektor pBIN19-C2-CpGRP1-roGFP.....	36
Abbildung 14: Vektor pBIN19-35S-CpGRP1	37
Abbildung 15: Detektion von CpGRP1 Protein	61
Abbildung 16: Aufnahmen einer transient transformierten <i>C. plantagineum</i> Blattzelle	62
Abbildung 17: Aufnahme transient transformierter <i>A. thaliana</i> Keimlinge	63
Abbildung 18: <i>A. thaliana</i> wt vs <i>A. thaliana</i> Überexpressionslinie (A 1.2)	64
Abbildung 19: Verschiedene GFP-Linien im Vergleich	64
Abbildung 20: Nahaufnahme von einer Pflanze der Linie A 1.2 neben einer Pflanze der Linie C 2.1	65
Abbildung 21: Laser Scanning Mikroskopische Aufnahmen der Linie A 1.2	65
Abbildung 22: Laser Scanning Mikroskopische Aufnahmen der Linie A 1.2	65
Abbildung 23: Laser Scanning Mikroskopische Aufnahmen der Linie C 1.2	66
Abbildung 24: Ergebnisse der RT-PCR für A 1.2 Pflanzen.....	66
Abbildung 25: Transgene Pflanzen der Linie A 1.2.....	67
Abbildung 26: Promotorfragmente und Promotorelemente des CpGRP1 Promotors.....	68
Abbildung 27: Vergleich der Promotoraktivität nach Trockenstress	70
Abbildung 28: <i>A. thaliana</i> Promotor-GUS Linien, ungestresst, von MS _{Kan} Platten, 24 Stunden Färbung.....	71
Abbildung 29: <i>A. thaliana</i> Promotor-GUS Linien, ungestresst, von MS _{Kan} Platten, 4 Stunden Färbung.....	71
Abbildung 30: <i>A. thaliana</i> Promotor-GUS Linien, Wurzeln, 24 Stunden GUS-Färbung.....	72
Abbildung 31: <i>A. thaliana</i> Promotor-GUS Linien, Wurzeln, 4 Stunden GUS-Färbung.....	73
Abbildung 32: <i>A. thaliana</i> Promotor-GUS Linien, junge vs. alte Blätter, 4 Stunden GUS-Färbung	74

Abbildung 33: <i>A. thaliana</i> Promotor-GUS Linien, Blüten und Schoten.....	75
Abbildung 34: GUS-Expression Wurzelspitzen und Hydathoden.....	75
Abbildung 35: GUS-Expression in meristematischen Geweben	76
Abbildung 36: <i>A. thaliana</i> Promotor-GUS Linien, Trockenstress, auf Erde gewachsen, 4 Stunden GUS-Färbung	77
Abbildung 37: <i>A. thaliana</i> Promotor-GUS Linien, Trockenstress, auf Erde gewachsen, 4 Stunden GUS-Färbung	78
Abbildung 38: Quantitative Messung der GUS-Aktivität nach Trockenstress.....	79
Abbildung 39: Expressionsmuster von CpGRP und homologen Genen	80
Abbildung 40: Expressionsmuster im Verlauf der Trockenstressantwort	81
Abbildung 41: Vergleich der Promotoren von CpGRP1, LbGRP1 und LsGRP1	82
Abbildung 42: Die homologen Promotoren und ihre cis-Elemente.....	83
Abbildung 43: Analyse putativer Promotorelemente mit PLACE.....	85
Abbildung 44: Die Versuchspflanzen, Set B.....	86
Abbildung 45: Genotypisierungs PCR	87
Abbildung 46: Keimung Überexpressionslinien	88
Abbildung 47: Batch B – Durchmesser, Wuchshöhe, Verzweigungen.....	90
Abbildung 48: Durchmesser, Wuchshöhe und Verweigungen	91
Abbildung 49: Blütenbildung Batch B	92
Abbildung 50: Blütenbildung Batch C	93
Abbildung 51: Wurzelarchitektur Überexpressionslinien	94
Abbildung 52: Wurzellänge Überexpressionslinien.....	95
Abbildung 53: Expression von CpGRP1 in den Überexpressionslinien – RNA	95
Abbildung 54: Immunodetektion des CpGRP1 Proteins	97
Abbildung 55: Immunodetektion <i>L.brevidens</i> und <i>C. plantagineum</i>	98
Abbildung 58: Ionenleck-Test.....	100
Abbildung 59: Lipid Peroxidation	101
Abbildung 60: Lichtmikroskopische Aufnahme 35S-CpGRP1 Linie C.....	123
Tabelle 1: Aktivität verschiedener Promotorfragmente des CpGRP1 Promotors	69
Tabelle 2: Ähnlichkeit der Promotoren untereinander.....	84
Tabelle 3: Zusammenfassung Performance Überexpressionslinien	102

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin	Nm	Nanometer
ABA	Abscisinsäure	Nt	Nukleotid
ABRE	ABA-responsive element	OD	optische Dichte
Amp	Ampicillin	ON	Over night
APS	Ammoniumpersulfat	PCR	Polymerase-chain-reaction
As	Aminosäure	pH	<i>Pondus hydrogenii</i>
Bp	Basenpaare	PLACE	Plants cis-acting regulatory DNA elements
bZIP	basic leucine zipper domain	RbCl	Rubidiumchlorid
BSA	Bovine serum albumin	RNA	Ribonukleinsäure
C	Cytosin	Rnase	Ribonuklease
CaCl₂	Calciumchlorid	Rif	Rifampicin
CaMV	Cauliflower mosaic virus	ROS	Reactive oxygen species
cDNA	komplementäre DNA	RT	Raumtemperatur
CDS	Coding Sequence	RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
Col0	Columbia	RWC	relativ water content/relativer Wassergehalt
Da	Dalton	SDS	Natriumlaurylsulfat
ddH₂O	doppelt destilliertes Wasser	Sec	Sekunden
DMF	Dimethylformamid	SOC	Super optimal Broth
DMSO	Dimethylsulfoxid	T	Thymidin
DANN	Desoxyribonukleinsäure	TAE	TRIS-Acetat-EDTA
DEPC	Diethyldicarbonat	Taq	<i>Termus aquaticus</i>
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate	TBS(T)	Tris-buffered saline (Tween20)
DER	drought responsive element	TCE	Trichloressigsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	TE	Tris-EDTA
Elf-1-alpha	Elongation-Factor-1-alpha	Temed	Tetramethylethylendiamin
et al.	und andere	TKT3	Transketolase 3
G	Guanin	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
G	Gravitätskonstante	Triton-X-100	polyethylene glycol-iso-

			octyl-phenyl ether
GRP	glycinreiches Protein	U	Unit = Einheit der Enzymaktivität
GFP	grün fluoreszierendes Protein	U/min	Umdrehungen pro Minute
GUS	Glucuronidase	UV	Ultraviolett
H	<i>hora</i> = Stunde	V; v	Volumen
HCl	Chlorwasserstoff	V	Volt
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid	Vir	Virulenz
Kan	Kanamycin	WAK	
Kac	Kaliumacetat	Wt	Wildtyp
KOH	Kaliumhydroxid	X-Gluc	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl β -D-Glucuronsäure
Lac	Lactose	YEB	
LB	lysogeny broth	(v/v)	Volumen/Volumen
LEA	Late embryogenesis abundant	(w/v)	Gewicht/Volumen
LiCl	Lithiumchlorid	Λ	Wellenlänge
LUC	Luciferase		
GUS	β -Glucuronidase		
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid		
MCS	multiple cloning site		
MgCl	Magnesiumchlorid		
MgSO₄	Magnesiumsulfat		
Min	Minuten		
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure		
mRNA	messenger RNA		
4-MU	4-Methylumbelliferyl		
4-MUG	4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid		
NaCl	Natriumchlorid		
NaH₂PO₄	Natriumdihydrogenphosphat		
NaOH	Natriumhydroxid		

1 Einleitung

1.1 Bevölkerungswachstum, Klimawandel und Nahrungsmittelbedarf

Die Weltbevölkerung hat im April 2017 die Zahl von 7 510 000 000 überschritten und wächst sekundlich weiter, wie die Weltbevölkerungsuhr beindruckend veranschaulicht (<http://countrymeters.info/de/World>). Die bevölkerungsreichsten Staaten sind dabei China mit etwa 18,8 % Anteil an der Weltbevölkerung und Indien mit etwa 17,9 % gefolgt von den USA mit 4,4 % (2015 World Population Data Sheet, Population Reference Bureau).

Gleichzeitig mit der Zunahme der Weltbevölkerung wandelt sich das Weltklima. Eine globale Erwärmung findet statt, die dazu führt, dass Hitzewellen zunehmen und Dürreperioden ausgeprägter sind, länger anhalten und sich auf größere Regionen ausweiten (Dai 2013) (Trenberth et al. 2014). Nach einem Model des NCAR (National Center for Atmospheric Research) (siehe **Abbildung 1**) ist schon in naher Zukunft mit zunehmender globaler Trockenheit zu rechnen.

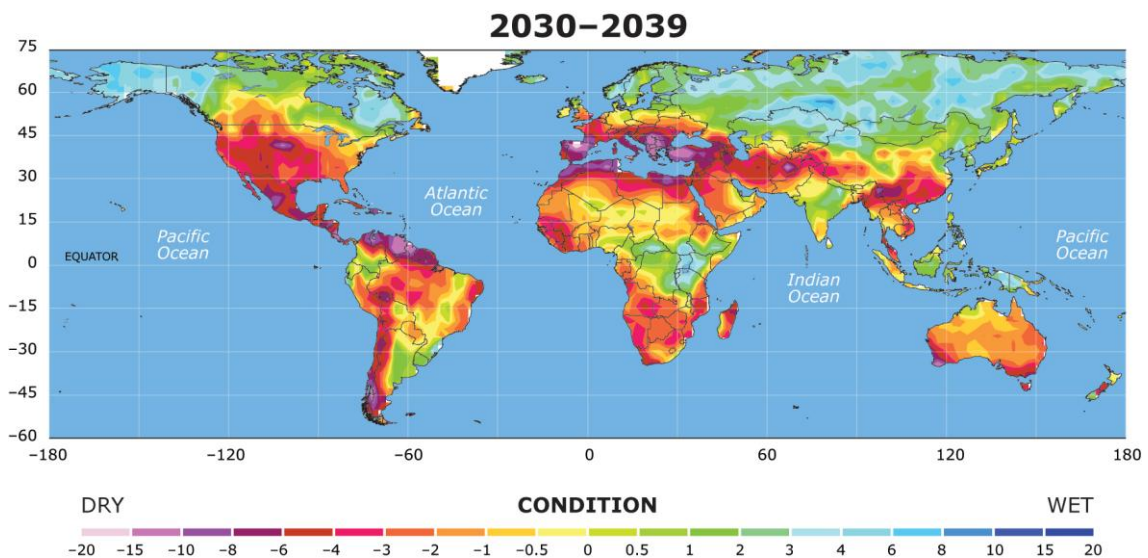


Abbildung 1: Model der Klimabedingungen in Bezug auf globale Trockenheit von 2030 bis 2039

Die Farben symbolisieren mit welchem Grad an Trockenheit die jeweils markierte Region nach dem verwendeten Simulationsmodell in den Jahren 2030 bis 2039 konfrontiert sein werden. Jeder Farbe ist im Index eine Zahl zwischen -20 und 20 zugeordnet. Werte unter -4 werden als extreme Trockenheit bezeichnet. Länder die in Rot- und Violetttönen dargestellt sind, werden vermutlich mit großer Trockenheit zu kämpfen haben, während das Risiko in grün und blau dargestellten Regionen eher gering ist (Dai 2011).

Da sich Hitze und Trockenheit negativ auf das Pflanzenwachstum und die Ernteerträge auswirken ist die Sicherung der Nahrungsmittelversorgung in betroffenen Regionen gefährdet (Bray 2000) (Wheeler & Von Braun 2013).

Während also der globale Wasser- und Nahrungsbedarf steigt, nimmt die Fläche des für den Nahrungsmittelanbau geeignetem Agrarlandes ab. Schon heute werden mehr als ein Drittel aller Nahrungsmittel weltweit auf bewässertem Kulturland angebaut und etwa 70 % des ver-

fügbaren Süßwassers werden für die Bewässerung von Anbauflächen verwendet (FAO = Food and Agricultural Organisation of the United States).

Immer wieder kommt es wegen Perioden anhaltender Trockenheit zu Dürrekatastrophen und Hungersnöten. Alle Kontinente sind von Trockenperioden betroffen. Besonders hart trifft es die afrikanische Sahelzone sowie Äthiopien, Kenia, Nigeria, Tansania, Nord- und Mittelchina, den Osten Australiens, Süd- und Westindien, Brasilien, Mittelamerika, Mexiko und den mittleren Westen der USA. Aber auch der gesamte Mittelmeerraum Europas ist immer wieder von Dürre und Wasserengpässen betroffen (<http://www.wassermangel.eu/duerrekatastrophe.html>).

Es ist anzunehmen, dass sich die Situation in bereits betroffenen Regionen verschärft und dass sich die Fläche des von Trockenheit beeinträchtigten Landes vergrößert (IPCC, 2014: Climate Change 2014: Synthesis Report).

Vor diesem Hintergrund wird die zunehmende Nachfrage nach Nutzpflanzen, die eine gute Trockenstresstoleranz aufweisen, verständlich (<http://globalfarmernetwoscjrk.org>) (<http://www.scidev.net/sub-saharan-africa/farming/>). Zusätzlich zu klassischen Methoden der Pflanzenzüchtung ist es sinnvoll ergänzend biotechnologische Verfahren zur genetischen Modifikation von Nutzpflanzen anzuwenden, um deren Toleranz gegenüber Wassermangel zu steigern. Um Pflanzen auf molekularer Ebene trockenstresstoleranter zu machen, ist Wissen darüber, welche Gene Pflanzen trockenstresstolerant machen, wie diese Gene reguliert werden, wie ihre Genprodukte miteinander und mit anderen intramolekularen Molekülen interagieren und welche Rolle ihnen im Stoffwechsel der Pflanze zukommt unbedingt notwendig. Daher werden von Natur aus trockenstresstolerante bzw. austrocknungstolerante Pflanzen, wie zum Beispiel die Wiederauferstehungspflanze *Craterostigma plantagineum* (siehe Abschnitt 1.5), als Modellpflanzen verwendet, um die genannten Fragestellungen beantworten zu können.

1.2 Wiederauferstehungspflanzen und Trockenstresstoleranz

Die Mehrheit der höheren Pflanzen kann eine Austrocknung ihrer vegetativen Gewebe unter 59 – 30 % Wassergehalt nicht überleben (Höfler et al., 1941). Nur spezialisierte Gewebe wie Samen und Pollen überdauern bei vielen Arten in trockenem Zustand, man nennt sie dann orthodoxe Samen oder Pollen (Franchi et al. 2011) wobei Samen wesentlich länger überdauern können als Pollen (Hoekstra 2005). Samen können zum Teil über erstaunlich lange Zeit ihre Keimungsfähigkeit erhalten. So keimten Samen der indischen Lotusblume (*Nelumbo nucifera*) nach rund 1000 Jahren (Shen-Miller et al. 1995) .

Einige Pflanzenarten können zusätzlich eine fast völlige Austrocknung ihrer vegetativen Gewebe über Monate bis Jahre hinweg überstehen und ihren Lebenszyklus nach einer Wiederbewässerung wiederaufnehmen (Scott, 2000). Sie werden daher als austrocknungstolerant oder auch als Wiederauferstehungspflanzen bezeichnet (Gaff 1977). Bemerkenswert ist dabei, dass es sich bei den sogenannten Wiederauferstehungspflanzen nicht um eine monophyleti-

sche Gruppe handelt, dass sie also nicht alle auf einen gemeinsamen Vorfahren zurückgehen. Es wird angenommen, dass die Fähigkeit zur Austrocknungstoleranz bei einem Teil der Wiederauferstehungspflanzen von ihren Vorfahren – frühen Landpflanzen - ererbt wurde und erhalten geblieben ist (Oliver et al. 2005), während andere Arten diese Fähigkeit im Zuge der Evolution zunächst verloren und später erneut entwickelt haben. Dabei wird vermutet, dass die erneute Entwicklung der Trockentoleranz auf der Basis der Fähigkeit der Pflanzen trocken-tolerante Samen zu erzeugen neu evolviert ist, wobei diese Neuevolution offenbar in verschiedenen Arten unabhängig voneinander stattgefunden hat (Farrant & Moore 2011).

Die Mehrheit der Wiederauferstehungspflanzen findet sich in den weniger komplexen Abteilungen der Algen, Flechten und Moospflanzen, während es deutlich weniger Vertreter in der Abteilung der Tracheophyta (Gefäßpflanzen) gibt. Innerhalb der Abteilung der Gefäßpflanzen wiederum gehören nur rund 300 Arten der 226 000 Angiospermen Pflanzen (Bedecktsamer) zur Gruppe der Wiederauferstehungspflanzen (Porembski, 2011). Insgesamt fällt auf, dass die Mehrheit der austrocknungstoleranten Pflanzen eher klein ist und einen flachen, kompakten Wuchs zeigt. Zudem sind austrocknungstolerante Organismen in Regionen ohne Trockenstress eher selten. Maximale Wuchs- und Reproduktionsraten stehen oft in einem negativen Zusammenhang mit verschiedenen Arten von Stresstoleranzen oder Resistenzen. So ist offenbar auch die Fähigkeit zur Austrocknungstoleranz schwer mit starkem Wachstum und hoher Produktivität vereinbar. Dadurch bedingt haben Trockenstresstolerante Pflanzen in Regionen ohne Trockenstress einen Wettbewerbsnachteil gegen schneller wachsende und sich schneller reproduzierende Arten (Alpert 2006). Viele Wiederauferstehungspflanzen die zu den Moosen und Flechten gehören, können eine sehr schnelle Austrocknung überstehen. Diese Arten sind weniger auf einen Schutz vor austrocknungsbedingten Schäden angewiesen, da sie über sehr effektive Reparaturmechanismen verfügen. Die zu den Angiospermen gehörenden Wiederauferstehungspflanzen hingegen überleben nur eine graduell eintretende Austrocknung, da sie Zeit benötigen um Prozesse auf molekularer Ebene einzuleiten die ihnen eine Anpassung an die Austrocknung und so die Einleitung von schützenden Mechanismen ermöglichen (Oliver et al. 2000) (Rascio & Rocca 2005).

Die Prozesse, durch die Wiederauferstehungspflanzen Trockenperioden überstehen können, sind komplex und vielschichtig. Ein Netzwerk von Signaltransduktionswegen ist daran beteiligt den Metabolismus der Pflanze an die Trockenheit anzupassen (Bartels & Sunkar 2005). Der Stoffwechsel wird gezielt gedrosselt und schließlich auf ein absolutes Minimum reduziert. Die Pflanzen treten in einen Überdauerungszustand ein, der sich Kryptobiose (griechisch: kryptos = verborgen und bios = Leben) nennt. Eine Veränderung der Genexpression vieler Gene und dadurch eine Anpassung des Energiestoffwechsels und der strukturellen Organisation der Pflanze sowie die Akkumulation schützender Substanzen und spezieller Proteine sind notwendig. Bereits innerhalb der ersten Stunden nach Einsetzen der Austrocknung sind Veränderungen in der Genexpression erkennbar.

Beobachtet man den Austrocknungsprozess einer Wiederauferstehungspflanze, so beobachtet man ein Schrumpfen und Einrollen der Blätter (Bartels 2005). Oft wandelt sich die grüne Färbung in eine bräunlich-violette Färbung um. Nach der Wiederbewässerung kann der umgekehrte Prozess beobachtet werden. Das Schrumpfen und Einrollen der Blätter kommt durch den Wasserverlust und eine so bedingte Faltung der Zellwand zustande, die bereits bei einigen Wiederauferstehungspflanzen beschrieben wurde (Vander Willigen et al. 2003) (Vicré et al. 2004) (Moore et al. 2009). Durch die Faltung der Zellwand bieten die Blätter einerseits der Sonne nur noch eine geringe Fläche, so dass die Zellen vor starker Lichteinstrahlung geschützt werden, zum anderen kann die Plasmamembran der Zellen so ihre Verbindung zur Zellwand beibehalten und wird vor Zerstörung geschützt (Wang et al. 2009).

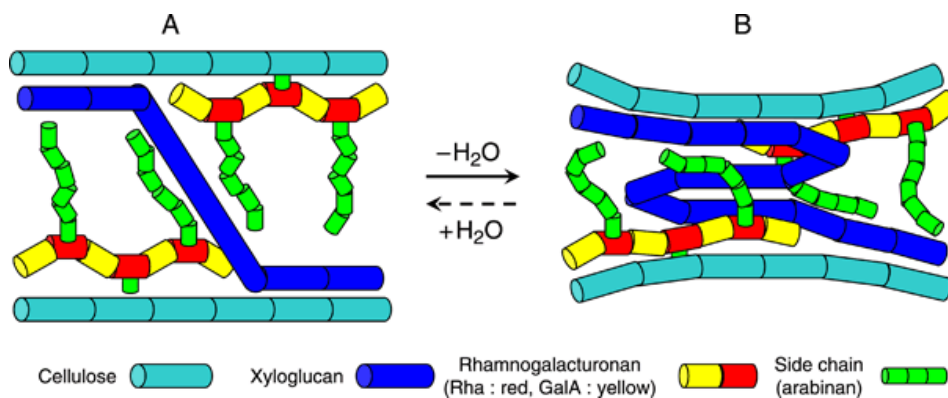


Abbildung 2: Model des Effekts von Wasserverlust auf die Zellwand

A: Turgeszente Zelle B: Zelle nach Wasserverlust

Durch den Wasserverlust werden die Bestandteile der Zellwand komprimiert und in größere Nähe zueinander gebracht (Moore, Vicré-Gibouin, Farrant, & Driouich, 2008).

Die Abnahme der grünen Färbung und die Entstehung einer violetten Färbung der Blätter kommen einerseits durch einen Abbau oder eine Strukturänderung des Chlorophylls (Heber et al. 2007) und andererseits durch die Einlagerung von Anthocyanen zustande.

Innerhalb der austrocknungstoleranten Pflanzen gibt es poikilochlorophylle und homoiochlorophylle Arten. Poikilochlorophylle Arten verlieren ihr Chlorophyll durch die Austrocknung und müssen dieses nach der Wiederbewässerung neu bilden (Tuba et al. 1998). Die Mehrheit der Arten ist jedoch homoiochlorophyll, was bedeutet, dass diese Pflanzen ihren Photosyntheseapparat während der Austrocknung zwar reduzieren und umstrukturieren, aber nicht abbauen, so dass sie nach einer Wiederbewässerung schnell wieder photosynthetisch aktiv werden können.

Anthocyane werden in vielen Pflanzen im Zuge einer Reaktion auf verschiedenste Umweltstresse wie Hitze, starke Sonneneinstrahlung, Ozon, Stickstoffmangel und Trockenheit angereichert. Die Funktion der Anthocyane wird noch diskutiert. Es erscheint wahrscheinlich, dass sie die Zellen unter anderem vor durch Stress entstehende, schädliche ROS (reactive oxygen

species = reaktiven Sauerstoff Spezies) schützen, also als Antioxidantien wirksam werden (Neill & Gould 2003).

Das zuvor beschriebene Schrumpfen und Einrollen der Blätter bedeuten eine große mechanische Belastung für die Zellwand wie in **Abbildung 2** (Moore et al. 2008) veranschaulicht. Um dieser Belastung entgegenzuwirken, verändert sich die Zusammensetzung der Zellwand so, dass diese an Flexibilität gewinnt (Moore et al. 2013). Zudem wurde beobachtet, dass die Aktivität von Expansinen in der Zellwand zunimmt. Expansine lösen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Polymeren wie den Zellwandpolysacchariden und ermöglichen dadurch eine Lockerung der Zellwandstruktur (Jones & McQueen-Mason 2004).

Zu den im Zuge der Austrocknung akkumulierten Proteinen gehören LEA-Proteine (LEA = late embryogenesis abundant = späte Embryogenese reichlich vorhanden), Hitzeschockproteine und entgiftende Enzyme wie zum Beispiel die Aldehyddehydrogenase. LEA-Proteine werden während der Samenentwicklung in großen Mengen hergestellt (Roberts et al. 1993) (Cuming 1999) und stehen im Zusammenhang mit der Erlangung von Austrocknungstoleranz orthodoxer Samen, aber auch von Pollen und Wiederauferstehungspflanzen. LEA-Proteine verhindern die Aggregation von Proteinen und die Inaktivierung von Enzymen unter Trockenstressbedingungen (Goyal, Walton, & Tunnacliffe, 2005) und schützen Membranen (Thalhammer et al. 2010) (Hinch & Thalhammer 2012) .

Abiotischer Stress, darunter auch Hitze- und Trockenstress, löst in lebenden Organismen, so auch in Pflanzen, die Expression von Hitzeschock-Proteinen aus (HSPs). Es gibt viele verschiedene Typen von HSPs. Gemeinsam ist ihnen typischerweise eine konservierte Domäne, die als Hitzeschockdomäne bezeichnet wird (Lindquist & Craig 1988). HSPs fungieren als molekulare Chaperone. Sie sorgen für eine korrekte Faltung anderer Proteine und verhindern unerwünschte Proteinaggregationen. HSPs kommen in verschiedenen Pflanzenarten in unterschiedlicher Variabilität und Menge vor. Es gibt Spezies, die etwa 20 verschiedene HSP Proteine nutzen, während in anderen Spezies 40 verschiedene HSPs aktiviert werden können. So kommt es zu einer unterschiedlich effizienten Adaption der jeweiligen Pflanzenart an abiotische Stressbedingungen (Al-Whaibi 2011).

Wie weiter oben bereits erwähnt, führt (Trocken-)stress in Pflanzenzellen zur Bildung von Zellschäden verursachenden reaktiven Sauerstoffspezies. ROS haben ein freies Elektron und sind deshalb sehr reaktionsfreudig. Sie interagieren mit Proteinen, Aminosäuren, Nukleinsäuren und Membranlipiden und schädigen diese durch Oxidation. Die entstehenden Oxidationsprodukte sind zudem zum Teil giftig für die Zelle (Sunkar et al. 2003). Entgiftende Enzyme bauen diese Substanzen ab. Es konnte gezeigt werden, dass das Enzym Aldehyddehydrogenase in mehreren Pflanzen, so auch in der Wiederauferstehungspflanze *C. plantagineum* trockenstressinduziert exprimiert wird und dementsprechend ein Teil der Trockenstressantwort dieser Pflanzen zu sein scheint (Kirch et al. 2001). Neben der Aldehyd-

Dehydrogenase gehören weitere Enzyme wie Katalase, Superoxid-Dismutase und Peroxidase sowie Antioxidantien wie Glutathion, Tocopherol, β -Karotin und Ascorbinsäure zum Schutzsystem der Pflanzen gegen oxidativen Stress (Kranter & Birtić 2005).

Zusätzlich zur Akkumulation schützender Proteinen, Enzymen und Antioxidantien verändert sich die Zuckerzusammensetzung in der Pflanze. Die Akkumulation von löslichen, nicht reduzierenden Zuckern, vor allem Saccharose, ist ein wichtiger Teil der Erlangung der Trockentoleranz (Crowe et al. 1992) (Martinelli 2008). Die Zucker interagieren mit Membranen und Makromolekülen und stabilisieren diese. Zudem ersetzen sie das Wasser in der austrocknenden Zelle und tragen so dazu bei, das Cytoplasma in einen glasartigen Zustand zu versetzen (Vitrifikation) (Burke 1986) (Farrant 2007). In diesem hochviskosen Zustand werden die biologischen Strukturen stabilisiert und schädliche Prozesse unterbunden. Nahezu alle austrocknungstoleranten Organismen gehen im Zuge der Austrocknung in einen solchen glasartigen Zustand über. Dies ist offenbar von größter Wichtigkeit, um eine Austrocknung zu überleben (Buitink & Leprince 2004).

1.3 Trockenstressinduzierte Modulation der Genexpression

Damit die in **Abschnitt 1.2** beschriebenen Anpassungen im Rahmen der Trockenstressadaptation stattfinden können, müssen einige Voraussetzungen erfüllt sein.

Zunächst muss die Pflanze den Trockenstress wahrnehmen. Durch die Vorgänge, die mit der Austrocknung einhergehen, werden primäre Signalmoleküle rekrutiert, die an spezifische membrangebundene Rezeptoren binden und diese dadurch aktivieren oder inaktivieren. Dadurch werden Signalübertragungswege innerhalb der Zelle aktiviert oder inaktiviert. Als Primäre Signalmoleküle fungieren unter anderem Pflanzenhormone wie Abscisinsäure (ABA) oder Ethylen. Auch eine Veränderung des Turgordrucks in der Zelle kann als Signal wirken. Intrazellulär erfolgt die Signalweiterleitung über Sekundäre Signalmoleküle wie Ca^{2+} Ionen, ROS und verschiedene Lipidmoleküle (Munnik 2001) (Apel & Hirt 2004). Meist wird das Signal im Zuge der Weiterleitung amplifiziert. Bestandteil der aktivierten Signalübertragungswege sind fast immer Proteinkinasen (Zhu 2002). Zu den durch Trockenstress induzierten Kinasen gehören die MAP-Kinasen (Mitogen-Aktiviertes-Protein-Kinasen), GSK-3 (Glykogensynthase-Kinase 3), CIPKs (mit Calcium bindenden Proteinen interagierende Kinasen) und andere (Krasensky & Jonak 2012). Kinasen lösen Signaltransduktionsprozesse aus, indem sie ihr jeweiliges Zielsubstrat phosphorylieren und so aktivieren oder deaktivieren. Da eine Kinase normalerweise mehrere Ziele phosphoryliert – darunter wiederum andere Kinasen – spricht man von einer Signalkaskade.

Zu den primären Zielen der Kinasen im Verlauf der Stressantwort gehören Transkriptionsfaktoren. Diese Proteine können sequenzspezifisch an Teile der regulierenden Einheiten von Genen – den Promotoren – binden und so die Aktivität ihrer Zielgene kontrollieren. Viele

Transkriptionsfaktoren können nicht nur an die cis-Elemente ihrer Zielgene binden, sondern auch an den m-RNA-Polymerase Komplex. Dadurch können sie die Bindungsaffinität zwischen Polymerase und Zielgen erhöhen, so dass dieses vermehrt abgelesen wird. Zusätzlich gibt es Transkriptionsfaktoren, die aktivierend auf die Genexpression wirken, da sie eine Histon-Acetyl-Transferase-Funktion haben oder eine Histon-Acetyl-Transferase rekrutieren können. Durch eine Acetylierung werden Histonproteine aufgelockert und ermöglichen der RNA-Polymerase den Zugang zur DNA, wodurch diese an ihr Zielgen binden und dieses transkribieren kann (Graw 2005).

1.3.1 ABA -abhängige und ABA-unabhängige Genexpression

Ein Teil der physiologischen Antwort von Pflanzen auf Trockenstress erfolgt Abscisinsäure-abhängig. Das bedeutet, dass ausgelöst durch die Stresswahrnehmung der Pflanze das endogene Level des Pflanzenhormons Abscisinsäure (ABA) stark ansteigt (Wright & Hiron 1969) und verschiedene physiologische Prozesse, wie zum Beispiel der Verschluss der Spaltöffnungen (Mittelheuser & Van Steveninck 1969) und die Synthese schützender Proteine ausgelöst werden. Für diesen Teil des physiologischen Anpassungsprozesses werden Gene mit ABA-responsiven Promotoren aktiviert. Andere Teile der Stressantwort laufen unabhängig von ABA-Signalen ab. So gibt es auch Gene, deren Promotoren spezifisch durch Trockenstress aktiviert werden (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki 2005).

Promotoren, die durch ABA aktiviert werden können, enthalten konservierte Regionen (cis-Elemente), die als ABRE (ABA-responsive Elemente) bezeichnet werden. ABREs enthalten die Konsensussequenz ACGT, sind typischerweise acht bis zehn Basenpaare lang und enthalten in vielen Fällen eine als "G-Box" bezeichnete Sequenz mit der Basenfolge CACGTG (Guiltinan et al. 1990) (Shen & Ho 1995). ABA vermittelte Genexpression kann allerdings nur dann stattfinden, wenn mehr als ein ABRE oder ein ABRE und ein "Coupling Element" mit der Sequenz TGCCACCG in der Promotorregion vorhanden sind (Hobo et al. 1999). Die Promotorregulation erfolgt durch Transkriptionsfaktoren des bZIP- Typs (Yoshida et al. 2010). bZIP-Transkriptionsfaktoren regulieren in Pflanzen viele physiologische und entwicklungs-spezifische Prozesse wie zum Beispiel Photomorphogenese, Energiehomeostase und die Antwort auf biotischen und abiotischen Stress (Corrêa et al. 2008). Die bZIP-Transkriptionsfaktoren werden ihrerseits von bestimmten Kinasen und Phosphatasen kontrolliert (SNF1-verwandten Protein Kinasen 2 und A 2C-Typ Protein Phosphatasen) (Nakashima et al. 2014) .

Ein typisches Promotorelement, das in Promotoren von Genen zu finden ist, die ABA-unabhängig auf Trockenstress reagieren, ist das DRE (drought responsive) Element. Die konservierte Sequenz lautet A/GCCGAC. Zwei verschiedene Gruppen von Transkriptionsfaktoren, die an diese Sequenz binden, wurden gefunden, DREB1 und DREB2 (Liu et al. 1998). Spezielle DREB1 Transkriptionsfaktoren interagieren mit dem DRE-Element und regulieren in *A. thaliana* die Expression zahlreicher Gene. Die Überexpression von DREB1 Transkriptionsfaktoren kann die Trockenstresstoleranz transformierter Pflanzen erhöhen, allerdings zeigen die

Pflanzen zum Teil Wachstumsdefekte, wobei hier die Auswahl des Promoters einen Einfluss zu haben scheint (Liu et al. 1998)(Kasuga et al. 1999). DREB1 Gene stehen aber nicht nur mit Trockenstresstoleranz in Zusammenhang sondern auch mit Frosttoleranz. So wurden aus zahlreichen Pflanzen DREB1 Gene isoliert, die durch Kältestress induziert werden (Nakashima et al. 2014).

Obwohl ein Teil der Gene, die an der pflanzlichen Trockenstressantwort beteiligt sind ABA-abhängig und ein anderer Teil ABA-unabhängig reguliert werden, sind diese beiden Antwortwege nicht unabhängig voneinander. Interaktionen zwischen beiden Wegen konnten sowohl auf der Ebene der Genexpression als auch auf Proteinebene gezeigt werden (Lee et al. 2010) (Kim et al. 2011)

1.4 Die Versuchspflanzen

Arabidopsis thaliana – moderat trockentolerant

Arabidopsis thaliana (Ackerschmalwand) ist eine einjährige, krautige Pflanze aus der Familie der Brassicaceae (Kreuzblütler) mit etwa 30 cm Wuchshöhe, kleinen, weißen Blüten und Schotenfrüchten (siehe **Abbildung 3**). *A. thaliana* ist eine beliebte Modellpflanze, da sie robust und leicht zu kultivieren ist und einen Generationenzyklus von nur acht Wochen hat (Rédei 1975). Zudem hat *A. thaliana* mit 125 Megabasenpaaren ein relativ kleines Genom auf 5 Chromosomenpaaren. Das Genom ist seit dem Jahr 2000 sequenziert (Huala et al. 2001) und es sind bereits viele Mutanten bekannt. Informationen zu Gen-Sequenz, Genstruktur sowie Expressionsmuster vieler Arabidopsis Gene können online über The Arabidopsis Information Resource (TAIR) abgerufen und Samen zu entsprechenden Mutanten bestellt werden (Rhee et al. 2003).



Abbildung 3: Die Versuchspflanzen

A: *Arabidopsis thaliana* B: *Craterostigma plantagineum* C: *Lindernia brevidens* D: *Lindernia subracemosa*

***Craterostigma plantagineum* – austrocknungstolerant**

Craterostigma plantagineum ist eine 5 cm bis 10 cm hohe Staude aus der Familie der Scrophulariaceae (Braunwurzgewächse) die zuerst 1841 von Christian Hochstetter beschrieben wurde. Die Pflanze stammt aus Südafrika und hat kleine, violette Blüten die an Veilchen erinnern (siehe **Abbildung 3**). Sie wird daher auch als rhodesisches Veilchen bezeichnet.

C. plantagineum kann viele Monate im luftgetrockneten Zustand überleben, sich innerhalb von Stunden nach einer Wiederbewässerung erholen und ihre Stoffwechselaktivität wiederaufnehmen (Hilbricht et al. 2008). Ihre volle photosynthetische Aktivität erreicht *C. plantagineum* als homoiochlorophylle Pflanze (siehe **Abschnitt 1.2**) bereits innerhalb von 24 Stunden nach der Wiederbewässerung (Bianchi et al. 1991) (Schwall et al. 1995).

Auf Grund ihrer Austrocknungstoleranz wird *C. plantagineum* seit rund 25 Jahren als Modellpflanze zur Erforschung der pflanzlichen Trockenstresstoleranz auf molekularem Level verwendet (Bartels et al. 1990).

Schon seit den frühen 90er Jahren wurden Gene beschrieben, die in *C. plantagineum* trockenstressinduziert reguliert werden (Piatkowski et al. 1990). Die Sequenzierung und Analyse der Transkripte von vier verschiedenen Frische- bzw. Austrocknungsstadien von *C. plantagineum* zeigte 2010, dass mehrere hundert Gene auf Trockenstress hin differentiell exprimiert werden (Rodriguez et al. 2010). Ein großer Teil der Gene ist dabei nicht einzigartig für *C. plantagineum*. Die Grundlage dafür, dass die Pflanze fähig ist eine Austrocknung zu tolerieren, wird vielmehr durch die spezifische Regulation der Genexpression - also durch die Regulation der Menge an hergestelltem Genprodukt - gelegt.

Zusätzlich besitzt *C. plantagineum* sogenannte 'Waisengene' – also Gene die nur in einer Art oder nahe verwandten Arten vorkommen – die differentiell auf Trockenstress hin reguliert werden (Giarola, Krey, Frerichs, et al. 2015). Waisengene, auch taxonomisch begrenzt vorkommende Gene genannt, werden als besonders wichtig für Taxon-spezifische Eigenarten und Anpassungen an die Umwelt angesehen (Long et al. 2003). Daher ist es wahrscheinlich, dass die beschriebenen Gene einen Anteil an der Fähigkeit der Pflanze haben eine völlige Austrocknung unbeschadet zu überstehen.

Insgesamt sind die für *C. plantagineum* beschriebenen Prozesse, die im Rahmen der Trockenstressantwort ablaufen, ähnlich wie bei anderen austrocknungstoleranten und auch trockenstresssensitiven Pflanzen (Vergleiche **Abschnitt 1.2**). Dazu gehört die Ansammlung von nicht reduzierenden, löslichen Zuckern und anderen Soluten als Osmolyte, eine Akkumulation schützender LEA-Proteine, Scavenger Enzyme und entgiftender Enzyme (Bianchi et al. 1992) (Ingram & Bartels 1996) (Kirch et al. 2001) sowie die Aktivitätssteigerung von Expansinen, welche die Zellwandflexibilität erhöhen (Jones & McQueen-Mason 2004).

Kleine Hitzeschockproteine (sHSPs), die normalerweise nur in pflanzlichen Samen oder durch Stresseinwirkung gebildet werden, werden in *C. plantagineum* bereits in ungestressten Geweben akkumuliert und tragen wahrscheinlich zur konstitutiven Trockenstresstoleranz der Pflanze bei (Alamillo et al. 1995).

Eine besondere Eigenschaft von *C. plantagineum* ist die hohe Konzentration des ansonsten seltenen Zuckers 2-Octulose in den Blättern. Der Zucker fungiert unter normalen Bedingungen als Kohlenhydratspeicher. Nach dem Einsetzen von Trockenstress wird 2-Octulose schnell in Saccharose umgewandelt (Bianchi et al. 1991) (Norwood et al. 2000).

1.4.3 *Lindernia brevidens* - austrocknungstolerant

Lindernia brevidens ist eine nahe mit *Craterostigma plantagineum* verwandte Art und ebenso wie diese austrocknungstolerant, was erstaunlich ist, da *L. brevidens* in den Regenwäldern von Kenia und Tansania beheimatet ist und normalerweise nicht mit Trockenstress konfron-

tiert wird. *L. brevidens* hat diese Eigenschaft offenbar auch ohne Selektionsdruck auf dieses Merkmal in ihrem Genom bewahrt, da es keine negativen Effekte für die Pflanze mit sich brachte (Phillips et al. 2008). Verglichen zu *C. plantagineum* hat *L. brevidens* kleinere, zartere Blätter, eine verzweigtere Wuchsform und etwas kleinere, violette Blüten (siehe **Abbildung 3**).

1.4.4 *Lindernia subracemosa* - austrocknungssensitiv

Lindernia subracemosa stammt aus Zentral und Südafrika, gleicht optisch *L. brevidens* (siehe **Abbildung 3**) und ist ebenso wie *L. brevidens* nahe mit *C. plantagineum* verwandt (siehe **Abbildung 4**). Dennoch ist *L. subracemosa* im Gegensatz zu den anderen beiden Arten nicht austrocknungstolerant und eignete sich somit sehr gut für vergleichende Studien.

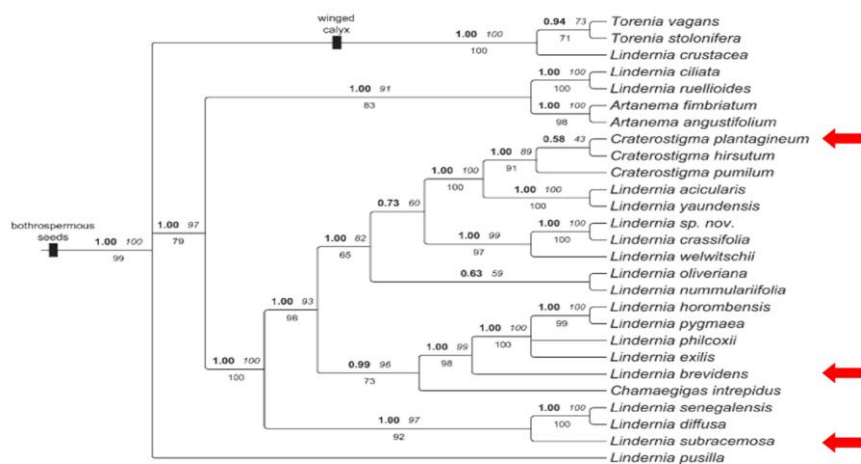


Abbildung 4: Verwandtschaftsverhältnis von *C. plantagineum*, *L. brevidens* und *L. subracemosa*
Zur Berechnung der Verwandtschaftsverhältnisse wurden drei verschiedene Methoden verwendet – Parsimony (unterhalb der Verzweigungen), Wahrscheinlichkeit (kursiv) und Bayessche Statistik (Ergebnis fett gedruckt). Hohe Werte spiegeln eine hohe Wahrscheinlichkeit der Richtigkeit der angenommenen Verwandtschaft dar. Modifiziert nach Fischer, Schäferhoff & Müller, 2013

1.5 Craterostigma Glycinreiches Protein 1

Die Auswahl des CpGRP1-Gens als Kandidat für weitere Untersuchungen erfolgte auf Grundlage einer Transkriptomanalyse von *C. plantagineum*. Da *C. plantagineum* polyploid ist, konnte das Genom bisher nicht sequenziert werden. Durch Pyro-Sequenzierung war es aber möglich, das Transkriptom zu sequenzieren. Dies erfolgte für vier verschiedene Stadien im Dehydrierungs-Rehydrierungszyklus der Pflanze. Dazu wurde Pflanzenmaterial der voll turgeszenten Pflanze (100 % RWC), der leicht dehydratisierten Pflanze (RWC 80 %), der ausgetrockneten Pflanze (5 % RWC) und der wiederbewässerten Pflanze (100 % RWC) sequenziert. Vergleicht man die Transkriptome, so kann man auch ohne Referenzgenom Aussagen über das Genexpressionsmuster von *C. plantagineum* machen (Rodriguez et al. 2010).

Die durchgeführten Sequenzierungen produzierten 29.000 contigs von denen 19.000 einer UniProt Identität zugeordnet werden konnten. Die verbleibenden 10.000 contigs konnten kei-

nem schon beschriebenen Gen bzw., Protein zugeordnet werden und wurden so für weitere Untersuchungen interessant. Um die vielversprechendsten Kandidaten auszuwählen wurden drei Parameter berücksichtigt: 1.) Die Länge der contig (über 100 bp.) 2.) die Expressionshäufigkeit (mehr als hundertfach) im partiell trockenen oder voll ausgetrockneten Zustand und/oder 3.) eine Ko-Varianz innerhalb der vier Stadien von über 1,4. Von den 50 verbliebenen Kandidaten wurden die vier längsten zur weiteren Untersuchung ausgewählt. Eines davon war contig 28056 – später CpGRP1 genannt (Giarola et al. 2015) – mit einer Länge von 580 bp, einem normalisierten Expressionslevel von 101,62 im trockenen Zustand und einer Kovarianz von 1,34. Das Expressionslevel im frischen Zustand war als 3,7 ermittelt worden, im partiell trockenen Zustand als 4,55 und im wiederbewässerten Zustand als 28,15. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Expression von contig 28056 im Verlauf der Austrocknung deutlich hochreguliert wird. Die Vermutung liegt nahe, dass dieses Gen mit der Ausbildung der Austrocknungstoleranz in *C. plantagineum* in Zusammenhang steht und möglicherweise selbst eine wichtige Rolle dabei übernimmt.

Im Rahmen der Diplomarbeit von Stephanie Krey (Krey, 2011), der Dissertation von Dr. Valentino Giarola (Giarola 2014) und meiner Diplomarbeit (von den Driesch, 2012) wurden folgende Erkenntnisse über contig 28056/CpGRP1 gewonnen:

- Das für CpGRP1 kodierende Gen besteht aus mindestens einem Intron und zwei Exons.
- Reverse Transkriptase PCR, RNA-Blot und Proteinblots bestätigen die *in silico* Daten nach denen CpGRP1 im Zuge der Austrocknung hochreguliert wird. Die Proteinmenge steigt dementsprechend an.
- Die Promotoraktivität korreliert mit den experimentell bestimmten Transkriptleveln. Dies deutet darauf hin, dass die Genexpression vornehmlich auf transkriptioneller Ebene reguliert wird.
- Die Mehrheit der cis-Elemente des Promoters, die eine austrocknungsresponsive Promoteraktivität vermitteln, liegen zwischen Base 584 und 240 stromaufwärts der genkodierenden Sequenz.
- Obwohl der Promoter neben einem DRE-Element auch ABRE-Elemente enthält, wird die Promoteraktivität durch ABA nicht erhöht, sondern vielmehr vermindert. Trockenstress steigert die Transkription bis zu einem maximalen Transkriptlevel im ausgetrockneten Zustand. Die Behandlung mit Mannitol und Sorbitol (die oft zur Simulation von Trockenstress verwendet werden, da sie osmotischen Stress auslösen) hingegen bewirken nur eine vorübergehende Erhöhung des Transkriptlevels im teilweise ausgetrockneten Zustand.

-
- CpGRP1 hat 156 Aminosäuren und ist ein glycinreiches Protein mit einem N-terminalen Signalpeptid, dem für die große Gruppe der glycinreichen Proteine typischen glycinreichen Motiv und einem C-terminalen cycteinreichen Motiv.
 - Das Molekulargewicht beträgt 15,2 kDA, der theoretische isoelektrische Punkt liegt bei 8,83. In der Praxis läuft das Protein im Blot auf einer Höhe von 28 kDA und zeigt einen isoelektrischen Punkt von 5. Möglicherweise liegt CpGRP1 als Dimer vor.
 - Das Protein konnte in Blättern, nicht aber in Wurzeln detektiert werden.
 - Mit einem Fusionsprotein aus CpGRP1 und GFP transient transformierte Zwiebelzellen zeigten eine Lokalisation in vesikelähnlichen Strukturen nahe der Zellgrenze. Nach einer Plasmolyse der Zwiebelzelle war GFP-Fluoreszenz im apoplastischen Spalt und in der Zellwand zu sehen. Dies und die Sequenz des Signalpeptids deuten auf eine apoplastische Lokalisation des Proteins hin.
 - Yeast two-hybrid assay und BIFC assay zeigten, dass CpGRP1 mit einer WAK Kinase (Zellwand assoziierten Kinase) – von da an CpWAK1 genannt - aus *Craterostigma plantagineum* interagiert.

1.6 Ziele dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollen folgende Punkte untersucht werden:

1.6.1 Proteinmenge von CpGRP1 in *C. plantagineum* wt – nach ABA- und Mannitolbehandlung

Wie in **Abschnitt 1.5** beschrieben sinken die Promotoraktivität und das Expressionslevel des CpGRP Promotors bzw. Gens nach Behandlung der Pflanze bzw. der Blätter von *C. plantagineum* mit ABA und ebenso Mannitol. Weitergehen sollten untersucht werden, ob die Proteinebene nach den beschriebenen Behandlungen ebenfalls abnimmt.

1.6.2 Die Lokalisation des Proteins CpGRP1 untersucht in transient und stabil transformierten *C. plantagineum* Pflanzen

Bisher konnte die Lokalisation des Proteins CpGRP1 mit Hilfe von verschiedenen GFP-Fusionskonstrukten und transienter Transformation von Zwiebelzellen gut gezeigt werden (siehe **Abschnitt 1.5**) (Giarola et al. 2015). Die Transformation von Zwiebelzellen wurde gewählt, da die Zellen groß und durchsichtig sind, was die Wahrnehmung der grünen GFP-Fluoreszenz und deren Zuordnung zu einem bestimmten Bereich der Zelle gegenüber anderen Zellen deutlich vereinfacht. Dennoch ist es wünschenswert zu überprüfen, ob sich die gezeigte Lokalisation des Proteins in der Pflanze, aus der das proteinkodierende Gen ursprünglich stammt ebenso darstellt. Daher war die erste Zielsetzung dieser Arbeit *C. plantagineum* transient und stabil mit einem CpGRP1-GFP Fusionskonstrukt zu transformieren, um die angenommene Lokalisation zu überprüfen.

1.6.3 Untersuchung des Promotors von CpGRP1 und der Promotoren der homologen Gene in *L. brevidens* und *L. subracemosa*

1.6.3.1 Trockenstressinduzierte Aktivität des CpGRP1 Promotors – transient in *C. plantagineum*

Während der zuvor von mir durchgeführten Experimente im Rahmen meiner Diplomarbeit wurden der Promotor des CpGRP1 Gens *in silico* analysiert. Dazu wurde die online Datenbank PLACE verwendet, in der zahlreiche Promotorelemente, die an sie bindende Transkriptionsfaktoren, sowie mögliche Funktionen zusammengestellt sind (Higo et al. 1999). Anschließend wurden vier verschiedene Promotor-LUC Fragmente (Fragment p887, p584, p240 und p145) erzeugt, die verschiedene cis-Elemente enthalten und zur transienten Transformation von *C. plantagineum* Blättern verwendet wurden. Gleichzeitig wurde das Blatt in äquimolarer Menge mit einem 35S-GUS-Vektor transformiert. Danach wurden die Blätter verschiedenen Behandlungen unterzogen und die Promotoraktivität jeder Probe aus dem Verhältnis der Menge von GUS und LUC Punkten auf den Blättern ermittelt. Die Ergebnisse zeigten unter anderem (siehe **Abschnitt 1.5**), dass der Promotor durch Trockenstress aktiviert wird, wobei die verschiedenen Fragmente unterschiedliche Aktivität zeigten. So konnte zum Beispiel durch das kleinste Promotorfragment keine Aktivierung der Genexpression ausgelöst werden. Das zweitgrößte Fragment, Fragment p584, zeigte die spezifischste Aktivierung durch Trockenstress und eine ebenso hohe trockenstressinduzierte Aktivität wie das längste Fragment, Fragment p887. Ich nehme daher an, dass dieses Promotorfragment ausreicht, um die volle Promotoraktivität auszulösen. Da das Promotorfragment ein DRE (siehe **Abschnitt 1.3.1**) enthält, lag die Vermutung nahe, dass diesem cis-Element eine entscheidende Rolle bei der spezifisch durch Trockenstress ausgelösten Promotoraktivierung zukommt (von den Driesch,

2012) (Giarola et al. 2015). Die zweite Zielsetzung dieser Arbeit war daher, diese Hypothese zu überprüfen. Zu diesem Zweck sollten zwei weitere Promotor-GUS Konstrukte mit und ohne das erwähnte DRE-Element erzeugt und vergleichend getestet werden.

1.6.3.2 Expressionsmuster von CpGRP1 in *C. plantagineum* und der homologen Gene in *L. subracemosa* und *L. brevidens* und Beschaffenheit der Promotoren

Da die nahe mit *C. plantagineum* verwandten Arten *L. brevidens* und *L. subracemosa* einerseits trockenstresstolerant (*L. brevidens*) und andererseits trockenstresssensitiv sind (*L. subracemosa*) stellt sich die Frage, ob das zu CpGRP1 homologe Gen in diesen Pflanzen unterschiedlich reguliert wird. Es erscheint denkbar, das CpGRP1 in den trockenstressresistenten Arten stärker exprimiert sein könnte als in *L. subracemosa*. Diese Hypothese sollte zunächst getestet werden. Zeigen die Promotoren nach einer Trockenstressbehandlung der Pflanzen unterschiedliche Aktivität, so ist es interessant zu vergleichen, welche Promotorelemente die drei Promotoren gemeinsam haben und inwiefern sie sich unterscheiden. So kann eine Hypothese erarbeitet werden, welche Promotorelemente für die trockenstressinduzierte Promotoraktivierung relevant sind.

1.6.3.3 Untersuchung des Entwicklungsspezifischen Genexpressionsmusters von CpGRP1 durch *A. thaliana* Promotor-GUS Linien

Um zu beobachten, zu welchen Zeitpunkten im Verlauf der Entwicklung und in welchen Geweben der Promotor von CpGRP aktiv ist, sollten zwei Promotor-Gus Linien untersucht werden. Das erste Konstrukt, mit dem *A. thaliana* transformiert wurde, war eine Fusion aus dem mit 887 nt längsten Promotorfragment plus 5'-UTR und der für GUS kodierenden Sequenz. Das zweite zur Transformation verwendete Fusionskonstrukt bestand aus dem mit 584 nt zweitlängsten Promotorfragment plus 5'-UTR und dem GUS-Gen. So sollte im Versuch durch Vergleich der Ergebnisse beider Linien getestet werden, ob das 584 nt lange Promotorfragment das gleiche Expressionsmuster produziert wie das längere Fragment.

1.6.3.4 Trockenstressinduzierte Aktivität des CpGRP1 Promotors – stabil in *A. thaliana*

In einem weiteren Schritt sollten die in 1.6.2.3 beschriebenen Promotor-GUS Linien verwendet werden, um zu testen, ob die trockenstressinduzierte Promotoraktivität in *A. thaliana* ebenso ausgelöst wird wie die Promotoraktivität in der Donorpflanze *C. plantagineum*. Dazu sollte die Promotoraktivität unter Trockenstress getestet werden.

Erzeugung und Untersuchung von Überexpressionslinien

Durch die Erzeugung stabiler *A. thaliana* Linien, die das CpGRP1 Gen unter Kontrolle eines starken, konstitutiv aktiven 35S-Promotors überexprimieren sollte untersucht werden, welche Auswirkungen die Expression dieses Gens auf die transgenen Pflanzen hat und ob ein Einfluss auf die Trockenstresstoleranz der Pflanzen erkennbar ist. Dazu sollten bei den transgenen Pflanzen verschiedene Parameter wie - unter anderem - Größe, Durchmesser, Wurzellänge, Menge an gebildeten Samen und die Vitalität nach Trockenstress gemessen und mit den Messwerten von parallel angezogenen Wildtyppflanzen verglichen werden. Ist ein positiver Effekt auf die Trockenstresstoleranz der Pflanzen erkennbar, ohne dass deren Wachstum und Entwicklung durch die Überexpression des Gens CpGRP1 beeinträchtigt ist, so wäre CpGRP1 es möglicherweise sinnvoll weiter zu untersuchen, ob sich CpGRP1 als Kandidatengen für die Überexpression in Nutzpflanzen eignet.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

Bei den verwendeten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen handelte es sich um Pflanzen des Ökotyps Col-0. Diese wurden unter kontrollierten Bedingungen (8 Stunden Licht bei 22°C und 16 Stunden Dunkel bei 20°C) in einer Klimakammer angezogen. Um vor dem Floral Dip die Blüte einzuleiten, wurden die Pflanzen in eine Klimakammer mit Langtagbedingungen (16 Stunden Licht bei 22°C und 8 Stunden Dunkel bei 20°C) überführt.

Die erste Generation der in unserem Labor verwendeten *Craterostigma plantagineum* Pflanzen wurde in Afrika von Herr Professor Volk gesammelt. Seitdem werden die Pflanzen teils durch Samen, teils vegetativ vermehrt und unter kontrollierten Bedingungen kultiviert (16 Stunden Licht und 8 Stunden Dunkel bei 18°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 %). Für die transiente Transformation wurden etwa 3 Monate alte Pflanzen (Ableger älterer Pflanzen) aus einer sterilen Kultur (MS-Medium) verwendet.

Lindernia brevidens und *Lindernia subracemosa* wurden von Prof. Eberhard Fischer in Afrika gesammelt. Seitdem werden die Pflanzen durch Samen vermehrt und unter kontrollierten Bedingungen (8 Stunden Licht bei 22°C und 16 Stunden Dunkel bei 20°C) kultiviert.

Um den relativen Wassergehalt der Versuchspflanzen zu bestimmen werden das Frischgewicht (FW), das Turgeszentgewicht (TW) (nach 24 Stunden eintauchen der Pflanztopfe in Wasser) und das Gewicht der ausgetrockneten Blätter (DW) (Zustand nach 48 Stunden bei 80°C) von mehreren Blättern jeder Pflanze bestimmt und das arithmetische Mittel der jeweiligen Werte berechnet. Mit den erhaltenen Werten lässt sich der RWC anhand folgender Formel errechnen:

$$[(FW-DW)/(TW-DW)] \cdot 100$$

2.2 Bakterien

Bei dem verwendeten Bakterienstamm handelte es sich um *Escherichia coli* DH10B Zellen (Lorow & Jessee, 1990). Der Genotyp ist: F⁻mrcAΔ(mrr-hsdRMS-mcrBC)φ80d lacZΔ M15 Δ lacX74 endA1 recA1 deoRΔ (ara, leu) 7697 araDD139 galU galK nup6 rpsLλ⁻.

Die Anzucht der Bakterien erfolgte bei 37°C und 250 U/min in flüssigem LB-Medium. Nach erfolgter Transformation mit einem Vektor wurde LB-Medium mit einem geeigneten Antibiotikum zur Selektion verwendet. Zellen aus Glycerin-Vorräten werden zunächst über Nacht auf selektiven Platten ausgestrichen. Anschließend wird das Material einer einzelnen Kolonie in selektivem Flüssigmedium vermehrt.

Für die Überexpression von Proteinen in dem Vektor pET28a (siehe 2.4 und Anhang) wurden andere Bakterien benötigt. Der verwendete Bakterienstamm hieß **Escherichia coli BL21(DE3)** (Pharmacia, Freiburg, Deutschland) mit dem Genotyp F^- . ompT. hsdS (r_B^- . m $^-$. B $^-$). gal. Dcm. / λ DE3 (lacI. lacUV5 – T7 gene 1. ind 1. sam7. nin5). Die BL21 Zellen wurden speziell für die Überexpression rekombinanter Proteine entwickelt. Sie sind nach einer Induktion mit IPTG in der Lage, ein in pET28a integriertes proteinkodierendes Gen abzulesen und das entsprechende Protein in großen Mengen anzureichern. Die Anzucht der Bakterien erfolgt bei 37° C und 200 – 250 U/min.

Für die transiente und stabile Transformation von *A. thaliana* Pflanzen wurde **Agrobacterium tumefaciens GV3101/pmP90RK** (Koncz and Shell 1986) verwendet. Agrobakterien wurden bei 30 °C und 200 U/min in YEB-Medium angezogen.

2.3 Vektoren

. pJET1.2 (Fermentas, St. Leon-Rot, D)

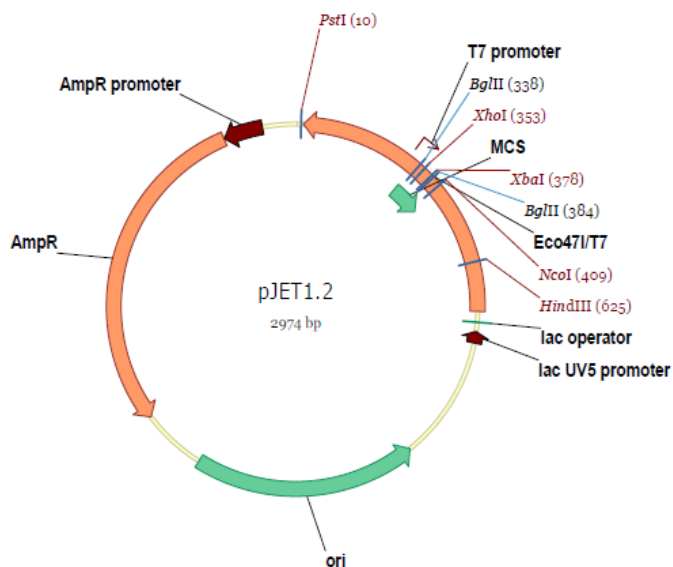


Abbildung 5: Vektorkarte des Vektors pJET1.2/blunt

In orange sind die Gene *eco471R* und *ampR* dargestellt. In grün sind der Replikationsursprung (*ori*) und die MCS (multiple cloning site) abgebildet. Das Zielgen kann an der MCS integriert werden und unterliegt dann der Kontrolle des T7-Promotors. In kursiv sind die Abkürzungen von verschiedenen Restriktionsenzymen annotiert. Rot geschriebene Enzyme schneiden nur einmal im gesamten Vektor. In schwarz geschriebene Enzymnamen schneiden den Vektor mehrfach.

Der Vektor pJET1.2 hat eine Größe von 2974 bp. Er enthält das Gen *eco471R* das für eine Restriktionsendonuklease kodiert. Kommt *eco471R* in Bakterien zur Expression, so wirkt dies

letal. Durch eine Insertion in der MCS innerhalb des Gens wird dieses inaktiviert, so dass erfolgreich transformierte Bakterien überleben können. Zudem enthält der Vektor das Gen für das Enzym β -Lactamase, welches dem Träger eine Ampicillin-Resistenz verleiht, da dieses Enzym den β -Lactam Ring von Ampicillin zerschneiden und das Antibiotikum somit unwirksam machen kann. Dank der beschriebenen Eigenschaften ist mit pJET1.2 die positive Selektion rekombinanter *E. coli*-Klone zuverlässig möglich. Das in die MCS integrierte Fragment steht unter Kontrolle des T7-Promotors.

pBT10-GUS (Kleines, 1997)

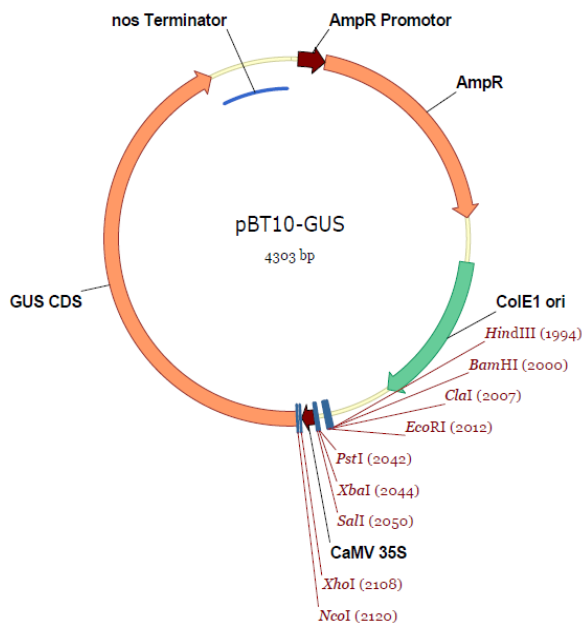


Abbildung 6: Karte des Vektors pBT10-Gus

In orange sind das GUS-kodierende Enzym und das Gen für das Enzym β -Lactamase, welches eine Ampicillinresistenz vermittelt (ampR) dargestellt. In grün ist der Replikationsursprung (ori) abgebildet. Das GUS-Gen unterliegt der Kontrolle des CaMV-35S-Promotors. In kursiv sind die Abkürzungen von verschiedenen Restriktionsenzymen annotiert, die den Vektor an der so markierten Stelle schneiden. Rot geschriebene Enzyme schneiden nur einmal im gesamten Vektor.

Der Vektor pBT10-GUS hat eine Größe von 4288 bp und enthält neben den üblichen Komponenten das Reportergen GUS. Als Resistenzgen zur Selektion wird das β -Lactamase Gen für Ampicillin-Resistenz verwendet. pBT10-GUS wurde mit verschiedenen 28056-Promotorfragmenten transformiert. Die verschiedenen Konstrukte wurden bei der biolistischen Transformation von *C. plantagineum*-Blättern verwendet (siehe erzeugte Konstrukte).

pGJro280 (S. Krey 2012)

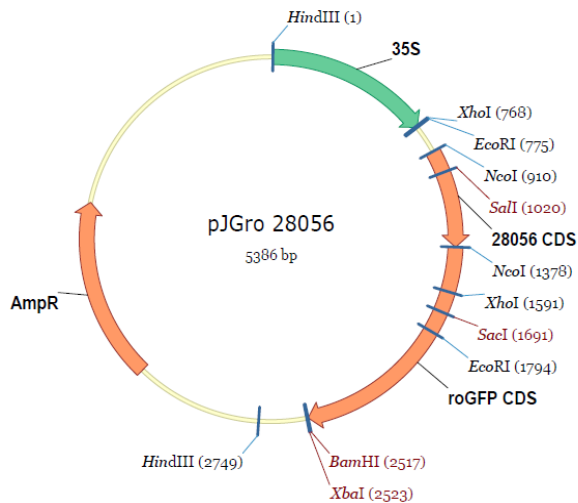


Abbildung 7: Vektors pGJro280

In orange sind die kodierenden Sequenzen für CpGRP1, roGFP und β -Lactamase (Ampicillin-resistenzgen AmpR) dargestellt, in grün der CaMV-35S-Promotors dessen Kontrolle die kodierenden Sequenzen von CpGRP1 (vorher contig 28056) und roGFP unterliegen. In kursiv sind die Abkürzungen von verschiedenen Restriktionsenzymen annotiert, die den Vektor an der so markierten Stelle schneiden. Rot geschriebene Enzyme schneiden nur einmal im gesamten Vektor, schwarz gedruckte Enzyme schneiden den Vektor an mehreren Stellen.

Der Vektor pGJro enthält den CaMV-35S Promotor mit einem duplizierten Enhancer-Element aus dem Tabak-Etch-Virus, die für roGFP codierende Sequenz sowie das β -Lactamase Gen welches die Ampicillin-Resistenz vermittelt. Der Vektor pJGro280 enthält zusätzlich die kodierende Sequenz von CpGRP1 (vorher contig 28056) vor der kodierenden Sequenz von roGFP.

pTS35-luc (V.Giarola 2011)

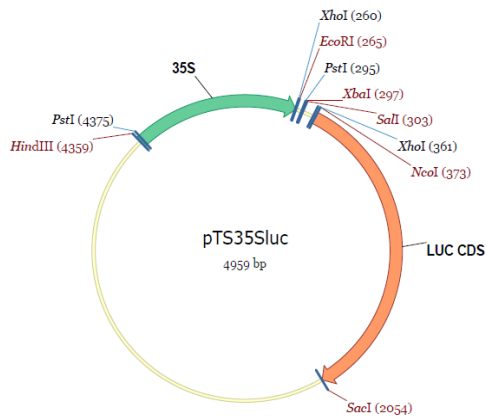


Abbildung 8: Karte des Vektors pTS35-luc

In orange ist die für Luciferase (LUC) kodierenden Sequenzen dargestellt, in grün der CaMV-35S-Promotors dessen Kontrolle die genkodierende Sequenz unterliegt. In kursiv sind die Abkürzungen verschiedener Restriktionsenzymen annotiert, die den Vektor an der so markierten Stelle schneiden. Rot geschriebene Enzyme schneiden nur einmal im gesamten Vektor, schwarz gedruckte Enzyme schneiden den Vektor an mehreren Stellen.

Bei der Erzeugung dieses Vektors wurde zunächst ein HindIII-EcoRI-Fragment mit dem CaMV35S Promotor mit dualem Enhancer aus dem Vektor pRTL2-GUS ausgeschnitten und in pBT10GUS subkloniert. Der resultierende Vektor mit einer CaMV35S-promotor-GUS-nos-Terminator Kasette wurde pTS genannt (Dr. T Missihoun). Später wurde die für GUS kodierende Sequenz gegen die für das Gen Luciferase (LUC) kodierende Sequenz ausgetauscht (Dr. V. Giarola).

pET28a (Fermentas, St. Leon-Rot, D)

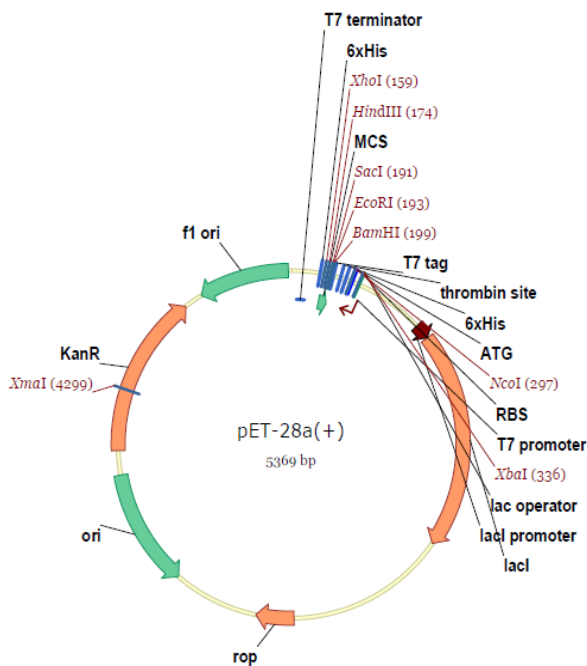


Abbildung 9: Karte des Vektors pET-28a(+)

In orange sind die kodierenden Sequenzen für das Kanamycinresistenzgen (KanR), der LacI-Promotor und der Lac-Operator, sowie rop (repressor of primer) dargestellt, in grün die Replikationsursprünge (ori)

und f1ori) und der T7-Promotor. In kursiv sind die Abkürzungen von verschiedenen Restriktionsenzymen annotiert, die den Vektor an der so markierten Stelle schneiden. Rot geschriebene Enzyme schneiden nur einmal im gesamten Vektor, schwarz gedruckte Enzyme schneiden den Vektor an mehreren Stellen. MCS steht für multiple cloning site. Von Rop (repressor of primer) wird ein Protein abgelesen, das die Kopienzahl des Plasmids niedrig hält.

Der Vektor pET28a ist ein Expressionsvektor zur Klonierung und Überexpression von Proteinen mit N-terminalem 6*HIS-Tag/Thrombin-Schnittstelle/T7-Epitop in *E. coli* (Novagen, Darmstadt, Deutschland). Die Überexpression erfolgt unter Kontrolle des T7-Promotors. Die Selektion über Kanamycin. Die Induktion der Genexpression wird durch IPTG (nicht verstoffwechselbares Lactoseanalog) ausgelöst. IPTG-Bindung an den Lac-Repressor im *E. coli* Genom bewirkt, dass sich der Lac-Repressor vom Lac-Operator löst und die T7-RNA-Polymerase abgelesen wird. Diese wiederum bindet an den T7-Promotor und löst die Transkription des Zielgens aus.

pBIN19 (Bevan 1984; Frisch et al. 1995)

Der Vektor pBIN19 ist Teil eines binären Vektorsystems und wird dazu verwendet, Agrobakterien, die ein bestimmtes Helferplasmid mit Virulenzgenen enthalten müssen, zu transformieren. Mit Hilfe der transgenen Agrobakterien können dann Pflanzen stabil transformiert werden. Dazu inkubiert man die Pflanzen mit den virulenten Bakterien. pBIN19 enthält das Gen für β -Lactamase durch welches die Kanamycinresistenz zur Selektion ausgeprägt wird, das TetR-Gen, welches eine Resistenz gegen Tetrazyklin bewirkt und eine Multiple Klonierungsstelle die zu beiden Seiten von T-Wiederholungen flankiert wird (left- and right-border-T-DNA). Mit Hilfe dieser T-Wiederholungen wird die vom Experimentator einklonierte Sequenz in das pflanzliche Genom integriert.

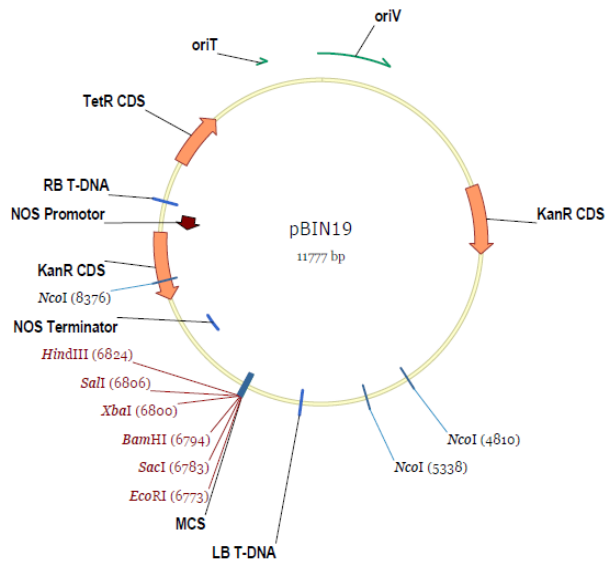


Abbildung 10: Vektors pBIN19

In orange sind die kodierenden Sequenzen für das Kanamycinresistenzgen (KanR) und das Tetracyclinresistenzgen (TetR) dargestellt. In kursiv sind die Abkürzungen von verschiedenen Restriktionsenzymen annotiert, die den Vektor an der so markierten Stelle schneiden. Rot geschriebene Enzyme schneiden nur einmal im gesamten Vektor, schwarz gedruckte Enzyme schneiden den Vektor an mehreren Stellen. MCS steht für multiple cloning site. Die grünen Pfeile markieren Replikationsursprünge (oriT, oriV). LB-T-DNA und RB-T-DNA steht für left-border-T-DNA und right-border-T-DNA.

Erzeugte Konstrukte

Promotor GUS Konstrukte:

p887-GUS, p584-GUS, p584(-)-GUS und p370-GUS

Alle verwendeten Promotor-GUS Konstrukte sind Fusionen aus dem Vektor pBT10GUS und dem jeweiligen Promotorfragment. Für diese Fusion wurde der 35S Promotor aus pBT10GUS entfernt und durch das Fragment des Promotors von CpGPR1 ersetzt. Zur Restriktion wurde für das größte Fragment NcoI und SalI verwendet, für alle übrigen Konstrukte NcoI und XhoI. In **Abbildung 11** sind Beispielhaft zwei der Konstrukte abgebildet.

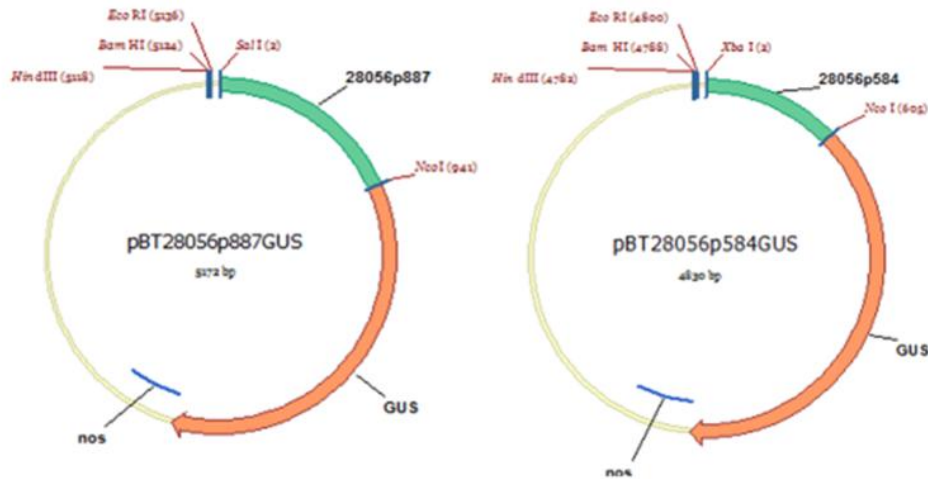


Abbildung 11: Promotor-GUS Konstrukte

Die Promotor-GUS Vektoren enthalten das GUS-Gens (in orange dargestellt) unter Kontrolle verschieden großer Fragmente des Promotors von CpGRP1 (in grün dargestellt). In rot sind verschiedene Restriktionsenzyme annotiert. Die Abkürzung nos bezeichnet den nos-Terminator.

pBIN-35S-CpGRP1-roGFP

Zur Erzeugung dieses Konstrukts wurde die 35S-CpGRP1-roGFP Kasette mit HindIII aus dem Vektor pGJro28056 geschnitten und an der HindIII Schnittstelle in pBIN19 inseriert.

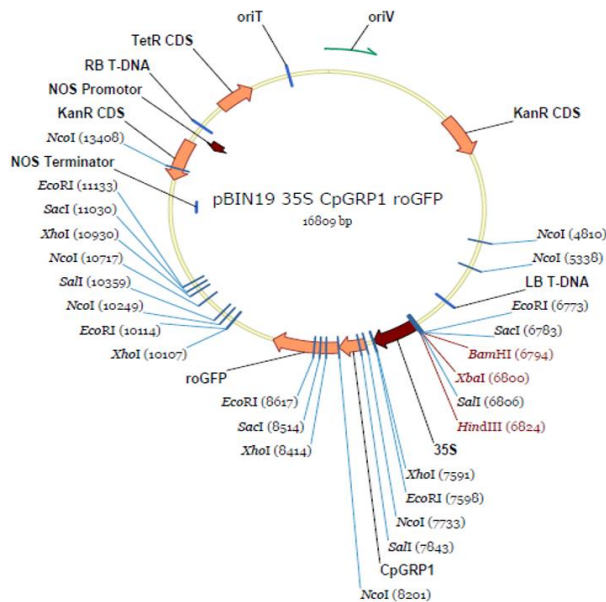


Abbildung 12: Vektor pBIN19-35S-CpGRP1-roGFP

In orange sind die kodierenden Sequenzen für das Kanamycinresistenzgen (KanR), das Tetracyclinresistenzgen (TetR), das für CpGRP1 kodierende Gen und das für roGFP kodierende Gen dargestellt. Der CaMV-35S- Promotor ist in dunkelrot abgebildet. In kursiv sind die Abkürzungen von verschiedenen Restriktionsenzymen annotiert, die den Vektor an der so markierten Stelle schneiden. Rot geschriebene Enzyme schneiden nur einmal im gesamten Vektor, schwarz gedruckte Enzyme schnei-

den den Vektor an mehreren Stellen. Replikationsursprünge sind mit oriT und oriV bezeichnet. LB-T-DNA und RB-T-DNA steht für left-border-T-DNA und right-border-T-DNA.

pBIN-C2-CpGRP1-roGFP

Zur Erzeugung von C2-CpGRP1-roGFP wurde zunächst der CaMV-35S-Promotor aus dem Vektor pGJro28056 geschnitten und statt diesem der durch ABA und Trockenstress induzierbare C2-Promoto

r aus dem Vector pA17 (A. Ditzer 2003) eingefügt. Anschließend wurde die Kasette über dieHindIII-Schnittstelle in pBIN19 inseriert.

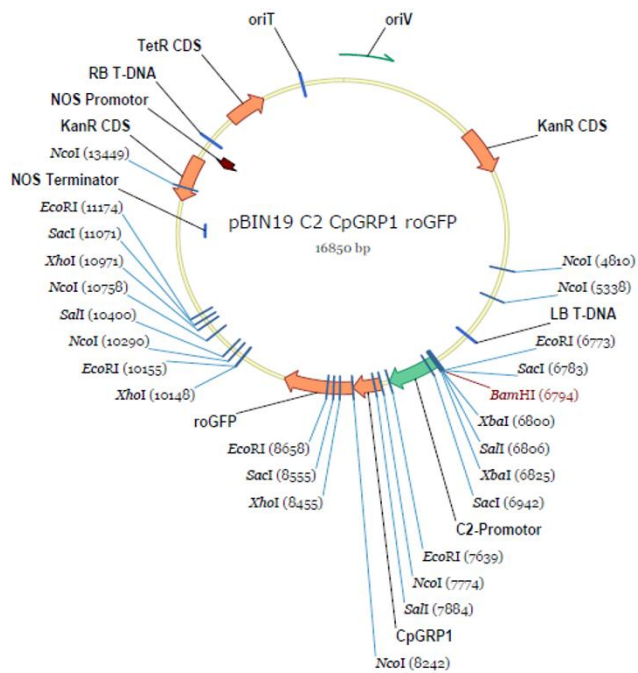


Abbildung 13: Vektor pBIN19-C2-CpGRP1-roGFP

In orange sind die kodierenden Sequenzen für das Kanamycinresistenzgen (KanR), das Tetracyclinresistenzgen (TetR), das für CpGRP1 kodierende Gen und das für roGFP kodierende Gen dargestellt. Der C2 -Promotor ist in grün abgebildet. In kursiv sind die Abkürzungen von verschiedenen Restriktionsenzymen annotiert, die den Vektor an der so markierten Stelle schneiden. Rot geschriebene Enzyme schneiden nur einmal im gesamten Vektor, schwarz gedruckte Enzyme schneiden den Vektor an mehreren Stellen. Replikationsursprünge sind mit oriT und oriV bezeichnet. LB-T-DNA und RB-T-DNA steht für left-border-T-DNA und right-border-T-DNA

pBIN-35S-CpGRP

Zur Erzeugung dieses Konstrukts wurde das für Luziferase kodierende Gen (*luc*) mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *Sall* aus dem Vektor pTS35-*luc* herausgeschnitten und durch die kodierende Sequenz von CpGRP1 ersetzt. Die 35S-CpGRP1 Kasette wurde dann mit *HindIII* und *BglII* ausgeschnitten und in den mit *HindIII* und *BamHI* geöffneten Vektor pBIN19 integriert.

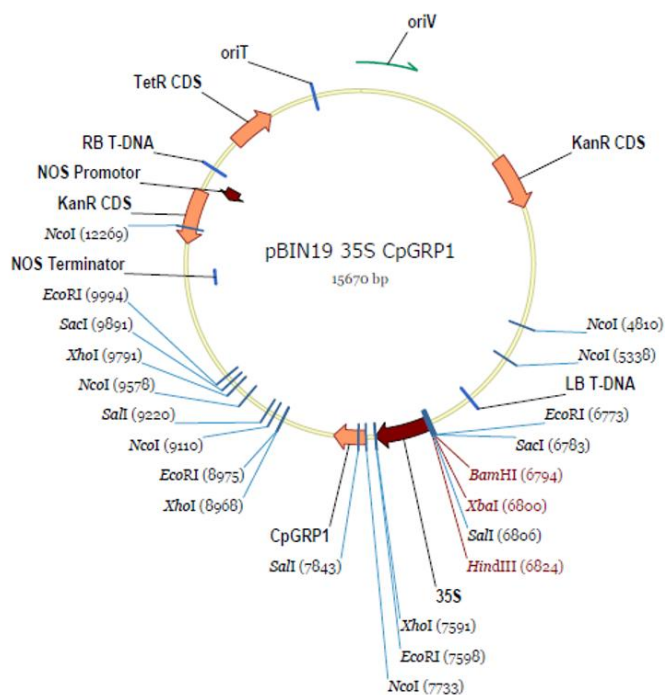


Abbildung 14: Vektor pBIN19-35S-CpGRP1

In orange sind die kodierenden Sequenzen für das Kanamycinresistenzgen (*KanR*), das Tetracyclinresistenzgen (*TetR*) und das für CpGRP1 kodierende Gen dargestellt. Der CaMV -35S-Promotor ist in dunkelrot abgebildet. In kursiv sind die Abkürzungen von verschiedenen Restriktionsenzymen annotiert, die den Vektor an der so markierten Stelle schneiden. Rot geschriebene Enzyme schneiden nur einmal im gesamten Vektor, schwarz gedruckte Enzyme schneiden den Vektor an mehreren Stellen. Replikationsursprünge sind mit *oriT* und *oriV* bezeichnet. LB-T-DNA und RB-T-DNA steht für left-border-T-DNA und right-border-T-DNA

2.4 Primer

Primer	Sequenz (5' → 3')	Restriktions-Schnittstelle
O6401 Promotor		
AP1	GTAATACGACTCACTATAGGGC	
AP2	ACTATAGGGCACGCGTGGT	MluI
GW06401Prim_R	GACGGTGAGGGAGGCGACGTTTTCCAT	
GW06401Sec_R	TCCATTTTCGTGGGCGGCGAGAGAGCT	
GW06401Tert_R	GCGTATAATTGAGTGGAAGGCGTGGT	
Putprom06401_F1	AGAACAATGGCCTCCTTTCTCT	
CDS06401colin_R	GCGGAACTTGGCGCTTTAT	
Col3prom_ver_F	CATCAATCTTCCTAAATTATTACAACAT	
Col4 put prom	CATATTATTATTACATTACAATTACACCA	
Put072cds_spe_R	GAGGGAGGTGACTTTTTCTAC	
Put064cds_spe_R	GGAGGCGACGTTTTCCAT	
Primer für die Expressionsanalyse		
Elf-1a-Q_F	GGGCAGATTGGCAATGG	
NORM-3-R2	ACGAACAGCAACGACGCACA	
AthActin2fwd823	GGAATCCACGAGACAACCTATACC	
AthActin2rev	AGGAATCGTTCACAGAAAATGTTTC	
28056-RT_F	TTGTCCCATTCCCTCCTATCCTA	
28056-RT_R	TTGCATGAATGAAACGGAGAT	
28056 Primer		
(IIIR) 28056p_R	GGAAGCCATGGTTAGAATGTGT	NcoI
28056p_end_F	GGGACGTAAACGCAGTTCTT	
28056CDS_F	GTCGCCCTCTTTCTCTCGT	
CpGRP1CDSampSacl	ACGGAGAGCTCACCATTC	
28056p_F	TGTGAAATTTGGTTTTTCCTTTG	
28056NcoI_F	<u>CCATGGT</u> GGCTTCCAAAGTATTT	NcoI
28056CDS_F1	GTCGCCCTCTTTCTCTCG	

28056CDS_F2	TGATTACGCTGACCAGAAGC
28056CDS_R1	CTGGTCAGCGTAATCACAGC
28056R1	CCTCTTCCACCATAACCACC
28056R2	CATAACCACCACCGGGATT

PJet

pJET1.2_F	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC
pJET1.2_R	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG

Primer für die Klonierung in pBT10GUS/Promotoranalyse

5'-pBT10 GUS-fwd	AATACGCAAACCGCCTCT	
GUS-START-rev	GGTTGGGGTTTCTACAGGACG	
(IIR) 28056p_R	GGAAGCCATGGTTAGAATGTGT	NcoI
28056p(584)Xba_F	GGAGGTAAC <u>TCTAGAAC</u> ATGGA	XbaI
280(584min)Xba_F	ACTGCCGACATCTTTTCTAGATATAAAT	XbaI
28056p(370)Xba_F	GTAAATTCATTT <u>CTAGACC</u> ACGCAA	XbaI
28056p(240)Xba_F	CTCCAT <u>CTAGACTTAA</u> AGATATT	XbaI
28056p(145)Xba_F	CAATCATT <u>CTAGACACCA</u> ACG	XbaI

Primer C2 Promotor

C2-prom	TTCTATTCTTGCATGCGTGG
---------	----------------------

GFP Primer

roGFP_R1	CAGCAGTTCCTCCACTCTGTT
----------	-----------------------

Seq/PCR pBIN19

pBIN HindIII	AGCTATGACCATGATTACGCCAAG
pBIN EcoRI	CGATTAAGTTGGGTAACGCCAGG

GUS-Lines quantitative Analyse

RD29 1304_F	ACCAGAACTATCTCGTCCCAAA
RD29 1644_R	CGGAGAGAGGTAGCTTTGTCA T
GUS FP 3	TGCACCATCAGCACGTTATC
GUS RP 4	ACCGCAAGACCCTTCTCTAT
GUS sense	CGTCCTGTAGAAACCCCAACC
GUS rev	GATAGTCTGCCAGTTCAGTTC

L. brevidens* und *L. subracemosa

Lb28056homo_F1	GGTGGTGGATATGGTGGCTA
Lb28056homo_R1	CAACAACAATACAACACACGCA
LbGRP1_5primeUT	TTTCCTAACTCACAAACAAAATCA
GW_LBrevi_GRP1	CCTTTGACTTTTCAGCTGGATGATGAAT
LbGRP1_gwalk2	AATGCGTTATATATATAGGGTCAGGCC
LB_PPIsoCDS_fwd	CGCGAAAATGGAAAAGCTTGA
Ls28056homo_F1	CTATGGCGGAGGAAGAGGAG
Ls28056homo_R1	TGCATAAAATGATGAAAGCACCA
LsGRP1_5primeUT	TTGCAGTTCTTAGCCCACAG
GW_LSubra_GRP1	CCCTTAGACTTCTCAGCTGATGATATATATAA
LsGRP1_gwalk2	ATGAGCAGCACTGTGTAAATAGCTTGT

2.5 Kits

NucleoSpin Extract II Kit (Macherey-Nagel, Düren, D)

Zur Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde das NucleoSpin Extract II Kit nach Anweisung des Herstellers verwendet. Die Funktionsweise dieses Kits basiert auf dem Prinzip der Bindung der Nukleinsäuren an eine Silica-Membran unter der Anwesenheit chaotroper Salze. Die Salze entfernen die Hydrathülle der Nukleinsäure reversibel und begünstigen so die Ausbildung einer Bindung zwischen Membran und Nukleinsäure. Nach dem Waschen kann die Nukleinsäure dann mit einem Puffer mit geringem Salzgehalt oder mit Wasser eluiert werden.

pJET cloning Kit

Das CloneJET PCR Cloning Kit von Thermo Scientific enthält den pJET Vektor, Sequenzierungsprimer, Reaktionspuffer, T4-Ligase und Blunting-Enzym, ein Kontrollprodukt für die PCR und Nuklease freies Wasser.

Mit Hilfe des Kits können DNA-Fragmente mit hoher Effizienz positiv selektiert und in *E. coli* vermehrt werden.

2.6 Geräte

Agarose-Gelkammer	EasyCast (Owl-Scientific, Portsmouth, USA)
Binokular	SMZ 800 Nikon Digital Sight DS-2Mv (Nikon, Düsseldorf, D)

Elektroporationsgerät	Gene Pulser II mit Pulse Controller II und Capacitance Extender II (Bio-Rad, München, D)
Luminescent Image Analyzer	LAS 1000 CH (Fujifilm Life Science, Stamford, USA)
Nanodrop	BioSpec-Nano (Shimadzu Biotech, Chiyoda-ku, J)
Partikelkanone	Biolistic Particle Delivery System-1000/He Device System (Bio-Rad, München, D)
PCR-Maschine	T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen, D)
pH-Meter	SCHOTT GLAS (Mainz, D)
Photometer	SmartSpec 3000 (Bio-Rad, München, D)
UV-Licht-Tisch	PeQlab (Vilber, Eberhardzell, D)
Verbrauchsmaterial	Sarstedt AG, (Nümbrecht, D.)
Vortexer	Mixer Uzusio, VTX-3000L (Laboratory and Medical Supplies, Tokio, J)
Zentrifuge	5415D (Eppendorf, Hamburg, D), Z233Mk-2 (Hermle, Wehingen, D), 5810R (Eppendorf, Hamburg, D)

2.7 Chemikalien, Enzyme und DNA/Protein Größenstandards

Chemikalien, Enzyme und DNA/Protein Größenstandards wurden von folgenden Firmen bezogen:

Apolloscientific (Ltd Bredsbury, CZ) Biomol (Hamburg, D), Bio-Rad (München, D), Dushefa Biochemie B. V. (Haarlem, NL), Fermentas (St. Leon-Rot, D), Invitrogen (Karlsruhe, D), Labomedic (Bonn, D), LMS Consult (Brigachtal, D), Merck (Darmstadt, D), Roth (Karlsruhe, D), Sigma-Aldrich (München, D), Stratagene (Heidelberg, D) und ZVE (Bonn, D)

2.8 Medien und Zusätze für Medien

LB-Medium

10 g/L Pepton 10 g/L NaCl, 5 g/L Hefe-Extrakt, pH 7,5

Für Platten wurden 15 g/l Select-Agar verwendet.

½ MS-Medium

2,15 g/L MS-Salz, 20 g/L Saccharose, 1 ml/L Vitamin-Lösung

pH 5,8 mit KOH eingestellt

Für Platten wurden 8 g/L Select-Agar verwendet.

YEB-Medium

5 g/L Saccharose, 5 g/L Fleischextrakt, 5 g/L Pepton, 1 g/L Hefeextrakt; pH 7.2

Nach dem autoklavieren wurden 2 mM sterile MgSO₄ Lösung zugegeben.

Ampicillin Stammlösung:

100 mg/ml in Milli-Q-Wasser, Verdünnung 1:1000

Kanamycin Stammlösung

50 mg/ml in Milli-Q-Wasser; Verdünnung 1:1000

Rifampicin Stammlösung

50 mg/ml in DMSO, Verdünnung 1:500

2.9 Puffer und Lösungen

10 x TAE Puffer

0.4 M Tris; 0.2 M Natrium Acetate; 0.01 M EDTA, pH 8.2 eingestellt mit Essigsäure, gelagert bei Raumtemperatur

TE Puffer +

10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0, gelagert bei Raumtemperatur

0.5 M CaCl₂

gelagert bei Raumtemperatur

10 % (v/v) Tween 20

gelagert bei Raumtemperatur

0.5 M EDTA

pH 8.0 eingestellt mit NaOH, gelagert bei Raumtemperatur

1 M MgCl₂

gelagert bei Raumtemperatur

1 M Tris-HCl

pH 6.8 eingestellt mit HCl, gelagert bei Raumtemperatur

BSA

in 1 x SDS Probenpuffer, 5 mg/ml, 10 min bei 95 °C erhitzt, gelagert bei -20 °C

RNase A

in TE Puffer: 1 mg/ml, bei 90 °C für 10-15 min erhitzt, gelagert bei -20 °C

2.10 Datenbank und Software

AIDA Image Analyzer 2.11

(Fujifilm Life Science, Stanford, USA): Zur Bearbeitung der mit dem Luminescent Image Analyzer LAS 1000 CH produzierten Bilder

BLAST

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

ImageReader LAS-1000 Pro V2.6

(Fujifilm, Tokyo, Japan): Zum Speichern der mit dem Luminescent Image Analyzer LAS 1000 CH aufgenommenen Bilder.

MS-Office Packet 2007

(Word, PowerPoint und Excel)

PLACE

Plant Cis-Acting Regulatory DNA Element, Datenbank für pflanzliche Promoterelemente
www.dna.affrc.go.jp/PLACE/

Primer3

primer3.ut.ee/ Für das Primer Design

Reverse Complement

reverse-complement.com/ Zur Erzeugung reverser, komplementärer Sequenzen

Transfac

Datenbank für Transkriptionsfaktoren und deren Bindestellen

Vector NTI 10.3.0

(Invitrogen Corporation, Karlsbad, CA): Zur Analyse von DNA Fragmenten und für die Erzeugung von Vektor-Karten.

2.11 RNA Extraktion aus *A. thaliana*

20 ml Extraktionspuffer

12 ml 10 M Urea

6 ml 10 M LiCl

200 µl 1 M Tris-HCl, pH 8.0

800 µl 0.5 M EDTA, pH 8.0

1 ml steriles, ddH₂O

Weitere Lösungen:

3 M Na-Acetat pH 5.2 (steril)

Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)

Chloroform-Isoamylalkohol (24:1)

Absolutes Ethanol

70 % Ethanol

Isopropanol

50 mg – 200 mg in flüssigem Stickstoff gemörsertes Pflanzenmaterial werden in 500 µl Extraktionspuffer gegeben und gevortext. Dann werden 500 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol hinzugegeben und erneut gevortext. Nach 5 Minuten Zentrifugation bei 4000 g und RT wird der Überstand in ein neues Gefäß überführt, erneut mit 1 Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol versetzt und geschüttelt. Nun wird zentrifugiert wie zuvor. Im nächsten Schritt wird die obere Phase in ein neues Gefäß überführt und mit 1 Volumen Chloroform-Isoamylalkohol versetzt. Anschließend wird wieder geschüttelt und diesmal bei 4°C zentrifu-

giert. Alle folgenden Schritte erfolgen auf Eis oder in einer Kühlzentrifuge bei 4°C. Die nach der erneuten Zentrifugation entstehende obere Phase wird erneut abgenommen und diesmal mit 0.1 Volumen 3 M Na-Acetat pH 5.2 und 1 Volumen kaltem Isopropanol vermischt. Jetzt folgt ein Inkubationsschritt zur Fällung von 5 bis 45 Minuten. Nach erneuter Zentrifugation bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit wird das Isopropanol- Na-Acetat Gemisch abgenommen. Das Pellet wird zweimal mit kaltem 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 15 – 25 µl sterilem ddH₂O gelöst. Längere Lagerung erfolgt bei – 70 °C. Kurzfristige bei – 20 °C.

2.12 RNA Extraktion aus *C. plantagineum*

Extraktionspuffer:

0.8 M Guanidin-Thiocyanat

0,4 M Ammonium Thiocyanat

0,1 M Natriumacetat

Später hinzugegeben: 38 % Phenol

Für die RNA- Extraktion aus *C. plantagineum* wurde das Protokoll von Valenzuela-Avendano von 2005 (Valenzuela-Avendano, 2005) verwendet.

Zunächst wurde das Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert. Dann wurden 1,5 ml Extraktionspuffer auf 50 mg gemörsertes Pflanzenmaterial geben und 10 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß bei 16.000 g und RT für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und 300 µl Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) dazugegeben. Nachdem die Mischung gevortext wurde, wurde erneut wie beschrieben zentrifugiert. Die klare, obere Phase wurde anschließend abgenommen und mit 375 µl Isopropanol und 375 µl 0.8 M Natriumcitrat/1 M NaCl vermischt und 10 Minuten bei RT inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation - diesmal bei 4°C – wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit gekühltem (-20°C) 70 % Ethanol gewaschen. Nun folgte eine weitere Zentrifugation bei 4°C. Der Überstand wurde wieder verworfen, das Pellet getrocknet und in 100 µl DEPC-Wasser gelöst. Anschließend folgte eine zweite Fällung mit 167 µl 2,5 M Lithiumchlorid. Die Fällung erfolgte für zwei Stunden auf Eis. Nach der Fällung der RNA wurde 20 Minuten bei 4°C und 20.000 g zentrifugiert. Das so gewonnene RNA-Pellet wurde wie zuvor mit 70%igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Zuletzt wurde das Pellet in DEPC-Wasser gelöst.

2.13 DNA Extraktion

Die Extraktion von genomischer DNA aus Pflanzenmaterial wurde wie folgt durchgeführt:

Das Pflanzenmaterial (z.B. ein kleines Blatt) wurde mit 400 µl Extraktionspuffer (250mM NaCl, 25mM EDTA, 200mM TrisHCl pH 7.5, 0,5 % (w/v) SDS) und einem Plastikpistill in einem Eppendorf Gefäß zerkleinert. Die Mischung wurde gevortext und für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurde für > 2 Minuten bei > 12.000 g zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 µl Gefäß überführt. Der Überstand wurde gründlich mit 300 µl Isopropanol vermischt und mindestens 5 Minuten inkubiert um die DNA zu fällen. Zum Pelletieren der DNA wurde 10 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen getrocknet und in 20 bis 50 µl TE oder destilliertem Wasser gelöst. Abschließend wurde der Extrakt für 30 Minuten bei 37°C mit RNase behandelt.

2.14 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration in einer Lösung

Die Konzentration von RNA oder DNA wurde mit Hilfe des Nanodrop-Gerätes bestimmt. Dieses misst die Absorption verschiedener Wellenlängen in einer Probe und ermittelt daraus die Qualität und Menge der RNA oder DNA. Die Berechnung des DNA-Gehalts in einer Probe erfolgte aus der Absorption (A) bei 260 nm mit folgender Formel aus dem BioSpec-nano-Handbuch:

$A_{260} \cdot \text{Umrechnungsfaktor} = \text{DNA-Gehalt (ng/}\mu\text{l)}$.

Der Umrechnungsfaktor ist 50 ng/1000

2.15 DNA Extraktion aus Agarosegel

Nach der Auftrennung von Nukleinsäuren in einem Agarosegel konnte die gewünschte Bande aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des NucleoSpin Extract II Kits DNA daraus isoliert werden. Das Kit wurde nach den Angaben des Herstellers verwendet.

2.16 Extraktion von Gesamtprotein

Zur einfachen und schnellen Extraktion von Gesamtprotein wird Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert und eine definierte Menge der Probe in 1*Probenpuffer aufgenommen, so dass das Pflanzenpulver gut bedeckt ist. Die Probe wird gründlich durchmischt und dann bei 95°C für 10 Minuten erhitzt. Anschließend wird zentrifugiert und der Überstand zur weiteren Verwendung abgenommen.

2.17 cDNA Synthese

Vor der cDNA-Synthese wurde die RNA so verdünnt, dass die Proben eine ähnliche RNA-Konzentration enthielten. Dann wurden die Proben mit dem Enzym DNaseI verdaut

Ein typischer Reaktionsansatz sah folgendermaßen aus:

RNA	2,0 µg
DEPC-Wasser	7,5 µl (bis zu)
RiboLock RNase Inhibitor (40 u/µl)	0,5 µl
10 x Reaktionspuffer mit MgCl ₂	1,0 µl
DNaseI, RNase frei	1,0 µl

Der Reaktionsansatz wurde für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde 1 µl 50 mM EDTA hinzugegeben und für weitere 10 Minuten bei 65°C inkubiert.

Zu Beginn der eigentlichen reversen Transkription wurden zunächst von jeder verwendeten RNA-Lösung zwei Aliquote in PCR-Gefäßen vorgelegt. In einem soll die Retrotranskription stattfinden, das andere diente als Negativkontrolle.

Zu beiden PCR-Gefäßen wurde hinzugegeben:

Oligo(dT) ₁₈ Primer von Sigma (100 µM)	0,5 µl
DEPC-behandeltes Wasser	0,5 µl

Die Reaktionsansätze wurden anschließend für 5 Minuten bei 65°C inkubiert, kurz auf Eis abgekühlt, zentrifugiert und erneut auf Eis gelagert.

Nun wurden hinzugefügt:

5 x Reaktionspuffer	2,0 µ
dNTP Mix (10 mM)	1,0 µl

Das Reaktionsgemisch wurde vorsichtig gemischt und kurz zentrifugiert. Anschließend wurde es für eine Minute bei 42°C inkubiert und zu je einem der zwei Ansätze wurden 0,5 µl der RevertAidReverse Transkriptase zugegeben. Nun wurde erneut sanft gemischt, zentrifugiert und schließlich für 1 h bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde abschließend durch ein Erhitzen auf 70°C für 10 Minuten gestoppt.

Der 10 µl Ansatz mit cDNA wurden mit 10 µl DEPC-Wasser verdünnt und in einer RT-PCR eingesetzt.

2.18 (RT-)PCR

Zur Überprüfung der cDNA-Qualität wurde nach jeder cDNA-Synthese eine PCR mit Primern für ein konstitutiv exprimiertes Gen durchgeführt. Für *C. plantagineum* wurde das Elf1alpha-

Gen (Elongationfactor 1 alpha) als Normalisator verwendet. Für *A. thaliana* wurde Aktin als Normalisator-Gen verwendet. Für jede einzelne Probe wurde eine Negativkontrolle getestet. Der Mastermix für die PCR wurde (für jede Probe) folgendermaßen angesetzt:

DEPC-Wasser	14,4 µl
10* Taq-Puffer mit MgCl ₂	0,4 µl
Vorwärts-Primer (10 µM)	0,5
Rückwärts-Primer (10 µM)	0,5
Taq-Polymerase (5 u/µl)	0,2

Als PCR-Programm wurde verwendet:

1.	5 min	94° C	Denaturierung
2.	30 sec	94° C	Denaturierung
3.	30 sec	60/62° C	Primer-Hybridisierung (Elf1alpha/Aktin)
4a.	30 sec	72° C	Strang-Verlängerung (für Aktin)
4b.	45 sec	72° C	Strang-Verlängerung (für Elf1alpha)
5.	5 min	72° C	Finale Strang-Verlängerung

Die Schritte 2-4 wurden 35 Mal wiederholt.

Um die Qualität der hergestellten cDNA beurteilen zu können, wurde das erhaltene PCR-Produkt durch eine Agarose-Gelelektrophorese visualisiert.

2.19 Agarose Gel Elektrophorese

Für ein 1%iges Agarosegel wurde 1g Agarose pro 100 µl von 1 x TAE-Puffer verwendet. Für Gele mit anderem Agaroseanteil oder mit anderer Größe wurde die Menge entsprechend angepasst. Nach dem Gießen in einen Gelträger, wurde das noch flüssige Gel mit 0,001 % (v/v) Ethidiumbromid-Stammlösung (100 µg/ml Ethidiumbromid in 1 x TAE-Puffer) versetzt und Kämme zum Formen der Taschen eingesetzt. Die Zugabe von Ethidiumbromid (EtBr) ermöglichte die spätere Analyse des Gels auf einem UV-Tisch, da sich EtBr in Nukleinsäuren einlagert und dadurch ihr Absorptionsspektrum verändert.

Nach der Polymerisation der Agarose können die mit 10 x Proben-Ladepuffer versetzten Proben aufgetragen werden.

Als Größenstandard diente ein 1 kb DNA-Marker.

Bei konstanter Spannung wurden die DNA-Fragmente aufgetrennt. Das Gel konnte anschließend mit Hilfe von UV-Licht analysiert werden.

2.20 Herstellung Rubidiumchlorid kompetenter Zellen

Die DH10B *E. coli* Zellen wurden aus dem Glycerinvorrat auf einer LB Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde eine einzelne Kolonie gepickt und über Nacht bei 37°C und 200 U/min in 3 ml LB-Medium vermehrt. Diese Starterkultur wurde anschließend wie zuvor in 100 ml LB vermehrt bis eine OD₆₀₀ von 0,35 bis 0,45 erreicht war. 50 ml der Kultur wurden für 10 Minuten in einem 50 ml Falconröhrchen bei 4°C und 4000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, die Zellen vorsichtig (kein pipettieren, kein vortexen) in 15 ml kaltem TFB1 (KAc 30 mM, RbCl 100 mM, CaCl₂*2H₂O 10 mM, MnCl₂+4H₂O 50mM, 15% Glycerin; pH 5.8) resuspendiert. Die Lösung wird für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nun wird erneut wie zuvor zentrifugiert. Die Zellen werden wie vorher in kaltem TFB1 gelöst und diesmal 5 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgt ein weiterer Zentrifugationsschritt. Abschließend werden die Zellen in kaltem TFB2 (MOPS (oder HEPES) 10 mM, CaCl₂*2H₂O 75 mM, RbCl 10 mM, 15% Glycerin; pH 6.5) gelöst. 50 µl Aliquote werden hergestellt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Aufbewahrung erfolgt bei – 80°C.

2.21 Klonierung

Um bestimmte Vektoren zu erzeugen wurden Restriktionen mit geeigneten Restriktionsenzymen und Ligationen mit dem Enzym Ligase durchgeführt. So wurde zum Beispiel zur Erzeugung des Überexpressionsvektors (35S-CpGRP1CDS) zuerst das LUC Gen aus dem Vektor 35S-LUC geschnitten und durch die kodierende Sequenz von CpGRP1 aus dem Vektor pJET-CpGRP1 ersetzt. Anschließend wurde die 35S-CpGRP1 Kassette ausgeschnitten und in den Vektor pBIN19 ligiert (Vektorkarten siehe **Abschnitt 2.3**).

2.22 Transformation von *E. coli* durch einen Hitzeschock

Für die Transformation durch Hitzeschock werden 2 – 2,5 µl (maximal 4 µl) eines Ligationsansatzes verwendet. Der Ligationsansatz wird zu 50 µl Zellsuspension kompetenter *E. coli* Zellen (hier DH10B Zellen) (kurz zuvor aus dem - 80°C Vorrat nehmen und auf Eis auftauen) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Der Hitzeschock wird bei 42°C und 40 bis 52 Sekunden durchgeführt. Danach wird die Lösung zügig auf Eis gestellt und 450 bis 950 µl SOC Medium zugegeben. Im Anschluss wird der Ansatz unter der Sterilbank in ein Reagenzglas überführt. Dieses wird geschlossen und bei 37°C und 200 – 250 U/min inkubiert damit die Zellen sich erholen können. Die anschließende Selektion erfolgt LB_{amp} Platten. Dazu werden 50 µl, 100 µl und 200 µl des Ansatzes steril ausgestrichen und nach dem Trocknen für 12 – 14 (nicht länger als 16) Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend können die Platten auf Kolonien untersucht werden. Die Selektion erfolgreich transformierter Klone wird durch PCR mit geeigneten Primern gewährleistet. Anschließend erfolgt eine Plasmidpräparation und ein analytischer Verdau des Plasmids.

2.23 Plasmidpräparation

Für die Präparation kleiner Mengen von Plasmid wurde eine Übernachtskultur mit 6 ml Volumen angesetzt. Dazu wurde eine positiv getestete Kolonie in selektivem LB-Medium gelöst und über Nacht bei 37°C und 200 U/min vermehrt. Je 3 ml der Kultur wurden in einem 2 ml Reaktionsgefäß zentrifugiert (14000 g, RT, 10 min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 300 µl Resuspensionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A in TE Puffer) gelöst. Die Lösung wird für 10 min bei 4°C inkubiert. Durch Zugabe von 300 µl des zweiten Puffers (200 mM NaOH, 1 % (w/v) SDS) werden genomische DNA und Proteine denaturiert. Durch mehrmaliges vorsichtiges Invertieren wird eine vollständige Vermischung gewährleistet. Nach maximal 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur werden 600 µl des Neutralisationspuffers (3 M Kaliumacetat, pH 5,4) zugegeben und das Gemisch erneut mehrfach vorsichtig invertiert. Die gDNA fällt aus. Das Plasmid bleibt in Lösung. Nach 5 Minuten Inkubation auf Eis wird 5 Minuten bei > 19.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird mit 1200 µl Phenol-Chloroform (1:1; v/v) versetzt und drei Minuten bei >19.000 g und RT zentrifugiert, um den Ansatz von verbliebenem Protein zu befreien. Die obere Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 0,7 Volumeneinheiten Isopropanol (v/v) für 5 bis 60 gefällt. Nach anschließender Zentrifugation für 20 Minuten bei > 19.000 g und 4 °C wird das Pellet zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet und anschließend in sterilem Wasser gelöst. Verbliebene RNA kann durch die Zugabe von 2 µl RNase A (10 mg/ml) pro ml und Inkubation bei 37 °C für 30 Minuten entfernt werden.

2.24 Sequenzierung

Für die Sequenzierung einer DNA-Probe (in der Regel in Form eines Plasmids) wird eine DNA-Konzentration von 50 – 100 ng/µl eingestellt. 15 µl der Probe werden mit 2 µl des gewünschten Primers (10 µM) vermischt und an Eurofins gesendet.

2.25 Herstellung von Glycerin Vorräten

Für *E. coli* Zellen werden 500 µl einer Übernachtskultur mit 500 µl steril filtriertem 50% Glycerin vermischt und bei – 80°C gelagert.

Für *A. tumefaciens* Zellen werden 800 µl einer Übernachtskultur mit 200 µl steril filtriertem 80% Glycerin vermischt und bei – 80°C gelagert.

2.26 Transiente Transformation durch ballistische Transformation

Vorbereitung der Microcarrier

Für den Beschuss von 2 Platten mit Blattmaterial werden 3 mg der Microcarrier (Goldkugeln, 1.6 µm im Durchmesser, Bio-Rad) in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß abgewogen und mit 1 ml 70 % (v/v) Ethanol versetzt. Darin werden die Microcarrier fünf Minuten lang durch vortexen gewaschen und für 15 Minuten bei RT inkubiert. Nach dieser Sterilisation wird der Überstand vorsichtig abgenommen und die Partikel dreimal mit je 1 ml sterilem DEPC-Wasser gewaschen. Nach dem dritten Waschschrift werden die Goldpartikel in 50 µl sterilem 50 % (v/v) Glycerin suspendiert, um eine Endkonzentration der Goldpartikel von 60 mg/ml zu erhalten. Diese Goldsuspension wurde stets frisch zubereitet.

DNA-Beladung der Microcarrier

Die Goldsuspension wird zunächst fünf Minuten gevortext. Unter ständigem Mischen werden nun die folgenden Bestandteile in der angegebenen Reihenfolge hinzugegeben:

DNA des Kontrollvektors mit 35S-GFP	5 µg
DNA des pBT10-GUS Vektors (enthält je eins der Cp28056-Promotor::GUS- Fusionskonstrukte)	5 µg
2,5 M CaCl ₂	50 µl
0,1 M Spermidin	20 µl

Anschließend wurde die Suspension fünf Minuten mit einem Vortexer gemischt, eine Minute bei RT inkubiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Die mit DNA beladenen Goldpartikel wurden mit 140 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, fünf Minuten mit einem Vortexer gemischt und anschließend eine Minute bei RT inkubiert. Nach dem Abnehmen des Überstands wurde dieser Waschschrift mit 100 % Ethanol wiederholt und die Goldpartikel abschließend in 30 µl Ethanol gelöst. Zuletzt wurden je 15 µl der Suspension ins Zentrum einer Trägerfolie (Makrocarrier) pipettiert.

Vorbereitung des Blattmaterials

Für das Bombardment wurden jeweils die mittelgroßen Blätter von vier Wochen alten *C. plantagineum*-Pflanzen aus Sterilkultur verwendet und mit der Oberseite nach oben im Zentrum von ½ MS-Medium-Platten ausgelegt. Die bedeckte Fläche betrug etwa 5 cm².

Bombardment

Für die biolistische Transformation wurde eine Heliumdruck-betriebene Partikelkanone des Modells PDS-1000/He Biolistic Particle Delivery System (Bio-Rad, München, D) verwendet.

Vor dem Bombardment wurden alle Zubehörteile für das Bombardment sterilisiert. Sobald das Ethanol aus der Suspension mit den beschichteten Microcarriern evaporiert war, wurden die Zubehörteile nach Angaben des Herstellers in dem Gerät zusammengebaut und mit dem Beschuss des Blattmaterials begonnen.

Es wurde dabei ein Vakuum von 28 Zoll Quecksilber (3,6 MPa) erzeugt und ein Druck von 1350 PSI aufgebaut. Das Blattmaterial wurde in einer Entfernung von 6 cm von der Ausgangsposition der Microcarrier positioniert.

2.27 Erzeugung kompetenter Agrobakterien

Für eine Vorkultur werden 3 ml YEB_{Rif}-Medium mit einer Bakterienkolonie inokuliert und für 14 – 16 Stunden 28°C bei 200 – 250 U/min angezogen. Die gesamte Vorkultur wird in 50 ml YEB_{Rif}-Medium gegeben und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert (etwa 8 Stunden). Im nächsten Schritt werden die Zellen für 30 Minuten auf Eis inkubiert und im Anschluss bei 5000 U/min und 4 °C für 10 Minuten abzentrifugiert danach nacheinander in folgenden (sterilen) Lösungen gelöst:

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

1 ml 10 % (v/v) Glycerin

Zwischen den Waschschritten wird wie zuvor zentrifugiert.

Im letzten Schritt wird die erhaltene Lösung in 40 µl Aliquote aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Aufbewahrung erfolgt bei – 80 °C.

2.28 Stabile Transformation mittels Agrobakterien

Um *A. thaliana* wt Pflanzen stabil mit einem Zielgen zu transformieren werden die knospenden Pflanzen in eine Lösung mit *Agrobakterien* eingetaucht, die das einzubringende Gen auf einem geeigneten Vektor (hier pBIN19) in sich tragen. Da der Fruchtknoten von *Arabidopsis thaliana* zu Beginn der Blütenentwicklung offen und über die Narbe zugänglich ist, können die Bakterien in diesem Stadium in den Fruchtknoten eindringen und den weiblichen Gametophyten transformieren. So können bis zu 0,7% der Samen transformiert werden.

Durchführung:

5 ml YEB-Medium mit 100 µg Rif/ml und 50 µg Kan/ml werden mit einer Kolonie transformierter *Agrobakterien* angeimpft. Diese Vorkultur wird über Nacht bei 28°C und 200 U/min angezogen. Mit der Vorkultur wird die Hauptkultur (300 ml YEB-Medium mit 100 µg Rif/ml und 50 µg Kan/ml) angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 – 0,7 kultiviert. Die Bakterienlösung wird mit 0,05% Silwet L-77 versetzt und in einen 500 ml Becher gegeben. Jetzt können die Blüten der *Arabidopsis*-Pflanzen für etwa 20 Sekunden in die Lösung getaucht werden. Im Anschluss werden die Pflanzen über Nacht mit einer Plastiktüte mit einigen kleinen Luftlöchern bedeckt und liegend in die Langtagskammer gebracht. Schließlich wurden die Pflanzen bis zur Samengewinnung kultiviert.

2.29 Samen: Sterilisation, Aussaat, Vernalisation und Selektion

Um transgene Samen von nicht transgenen Samen unterscheiden zu können müssen diese steril auf selektivem Medium (MS_{Kan}) ausgesät werden.

Durchführung:

Eine kleine Menge an Samen wird unter der Sterilbank in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und für eine Minute mit 100 % Ethanol inkubiert. Anschließend erfolgt eine 15-minütige Inkubation mit 70 % Ethanol. Während der Inkubationszeiten wird das Reaktionsgefäß kontinuierlich invertiert. Nach der Sterilisation wird dreimal mit sterilem ddWasser gewaschen. Zum Trocknen werden die Samen auf steriles Filterpapier pipettiert. Die getrockneten Samen können dann auf die MS_{Kan}-Platten gestreut werden. Zur Vernalisation werden die Platten 2 Tage abgedunkelt in die Kühlkammer (4°C) gestellt und erst im Anschluss in die Klimakammer mit Kurztagsbedingungen gebracht.

Nach etwa 2 Wochen können die transformierten Keimlinge gut von den nicht transformierten unterschieden werden. Die transgenen Pflanzen sind Kanamycin-resistent, daher können sie auf dem selektiven Medium normal wachsen und haben eine grüne Färbung, während die nicht transgenen Keimlinge gelb werden und absterben.

2.30 GUS Färbung – Qualitativer GUS Assay

Um das Expressionsmuster eines Gens zu studieren kann der dazugehörige Promotor mit dem für die β-Glucuronidase kodierenden Gen als Reportergen fusioniert werden. Das GUS-Enzym katalysiert die Spaltung des Substrats X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronid) zu einem Produkt (dichloro-dibromo-indigo) das einen blauen Niederschlag bildet. So kann die Promotoraktivität in situ sichtbar gemacht werden.

Durchführung:

Junge Blätter oder Keimlinge transgener Pflanzen werden für 4 bis 24 Stunden bei 37°C mit der X-Gluc-Färbelösung inkubiert. Zuvor erfolgt eine ein-minütige Vakuuminfiltration des

Pflanzenmaterials mit der Färbelösung. Nach der Inkubationszeit muss das Pflanzenmaterial so lange mit 80% Ethanol (v/v) bei 80°C entfärbt werden, bis die grünen Blattpigmente entfernt sind. Auf dem so entfärbten Pflanzenmaterial ist die blaue GUS-Färbung gut erkennbar.

GUS-Färbelösung (200 ml)

50 ml NaH₂PO₄ Puffer pH 7, 50 ml dest. Wasser, 2 ml 10 % (v/v) Triton-X-100 (finale Konzentration 0,1 %); Auf 200 ml auffüllen; 100 mg X-Gluc-Salz in DMF lösen und zugeben (10 mg X-Gluc-Salz pro 20 ml Puffer; 100 µl DMF pro 10 mg Salz)

2.31 Quantitative GUS Messung – MUG Assay

Man kann die Aktivität des Enzyms β-Glucuronidase in einem pflanzlichen Gewebe quantitativ bestimmen. Dazu misst man mit einem Fluorometer die zunehmende Fluoreszenz des Produkts 4-MU bei der enzymatischen Umsetzung des Substrats 4-MUG zu 4-MU in einem aus dem Gewebe gewonnenen Proteinextrakt. Zudem wird der Proteingehalt der Probe bestimmt. Aus den gewonnenen Messwerten kann man die Enzymaktivität errechnen.

Durchführung:

Das Pflanzenmaterial wird in flüssigem Stickstoff aus dem - 80°C Gefrierschrank genommen. Zwei gehäufte Spatelspitzen des Materials werden mit 300 µl Extraktionspuffer versetzt und gevortext. Dann werden die Proben bei 14.000 g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Je 15 µl Überstand werden mit 15 µl 4-MUG (1mM) gemischt und für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Zusätzlich werden 15 µl des Extraktionspuffers mit 15 µl 4-MUG vermischt und inkubiert (Kontrolle). Nach 15 Minuten werden die Proben auf Eis gestellt. 5 µl werden entnommen und in 2 ml Stopp-Puffer (0,2 M Na₂CO₃) gegeben. Anschließend werden die Proben weitere 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Wie zuvor werden die Proben auf Eis gestellt, 5 µl entnommen und in 2 ml Stopp-Puffer gegeben. Für die Einstellung des Fluorometers werden zwei Blanks vorbereitet. Blank 1 mit 2 ml Stopp-Puffer und Blank 2 mit 2 ml Stopp-Puffer und 20 µl 4-MU (10 µM). Für die Blanks und die zu messenden Proben werden 2 ml Küvetten mit 4 durchsichtigen Seiten verwendet. Zum blanken des Fluorometer wird Blank 1 eingesetzt, die Range auf 0 RFE (relative Fluoreszenz Einheiten) einstellen und kalibriert. Danach wird Blank 2 eingesetzt und Range auf 5000 RFE eingestellt. Jetzt können Proben und Kontrollen gemessen werden. Zur Proteingehaltsmessung werden je 5 µl pro Probe (bzw. Extraktionspuffer als Leerwert) in 1 ml 20 % Bradford-Reagenz geben, 5-10 Minuten inkubiert (für alle Proben gleich) und bei OD₅₉₅ gemessen.

2.32 Genome Walking

Genome Walking (Genomwandern) wird dazu verwendet Informationen über die Sequenz in direkter Nachbarschaft eines bekannten DNA Stücks zu erhalten. Mit Hilfe dieser Methode können zum Beispiel Promotorregionen oberhalb einer bekannten Protein kodierenden Sequenz sequenziert werden. Das Prinzip des Genome Walkings ist einfach. Mit verschiedenen Restriktionsenzymen wird die DNA die für das Genome Walking ausgewählt wurde, in Stücke geschnitten. Die entstandenen Stücke werden an spezielle Adaptorsequenzen gebunden. Mit Hilfe von Primern die an die Adaptorsequenz binden und genspezifischen Primern kann anschließend eine PCR durchgeführt werden. Als Ergebnis bekommt man ein oder meist mehrere unterschiedlich große PCR-Produkte, die in einen geeigneten Vektor (zum Beispiel pJET1.2/blunt) kloniert und sequenziert werden können.

Das Genome Walking erfolgte mit Hilfe des GenomeWalker™ Universal Kit von Clontech und nach Anweisung des Nutzerhandbuchs.

2.33 Ion-Leakage Test

Der Ion-Leakage (Ionen Leck) Test wird dazu verwendet das Ausmaß von Schädigungen an pflanzlichen Membranen zu bestimmen. Je größer die Schädigungen sind, desto mehr Ionen können in das umgebende Medium austreten. Dadurch erhöht sich die Leitfähigkeit des Mediums. Diese kann gemessen werden.

Durchführung:

- Drei Blätter pro Pflanze werden an der Basis des Blattstils abgetrennt, gründlich abgewaschen und in ein 15 ml Falcon mit 7 ml doppelt destilliertem Wasser gegeben und gut verschlossen für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Es ist darauf zu achten saubere Handschuhe zu tragen, die Blätter vorsichtig zu handhaben, um sie nicht zu verletzen und sie gut abzutropfen bevor sie in die Probengefäße gegeben werden

- Die Leitfähigkeit wird gemessen
- Die Gefäße werden erneut gut verschlossen um Verdunstung zu vermeiden und bei 80 °C für 30 Minuten inkubiert
- Die Gefäße werden auf Raumtemperatur abkühlen gelassen, danach wird die Leitfähigkeit gemessen.
- Die relative Ion-Leakage wird errechnet, indem das Ergebnis der ersten Leitfähigkeitsmessung durch das Ergebnis der zweiten Leitfähigkeitsmessung geteilt wird

2.34 Lipid Peroxidation

Malondialdehyd (MDA) ist ein Endprodukt der Lipidperoxidation die durch oxidativen Stress in Pflanzen ausgelöst wird. Der Nachweis von MDA erfolgt mit Thiobarbitursäure (TBS). MDA und TBS reagieren quantitativ zu einem rosafarbenen Pigment, dessen Menge photometrisch nachgewiesen werden kann.

Reagenzien:

- 0,1 % Trichloressigsäure (TCE)
- Lösung I: 20 % TCE, 0,01 % Butylhydroxytoluol (BHT)
- Lösung II: Lösung I, 0,65 % Thiobarbitursäure (TBS)

20 bis 60 mg in flüssigem Stickstoff gemörsertem Pflanzenmaterial werden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml kalter 0,1 %iger TCE versetzt. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 4°C und 16.000 g wird der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen von Lösung II versetzt. Nach mehreren Invertierungen wird das Reaktionsgefäß für 25 min bei 95°C inkubiert. Zum abstoppen der Reaktion wird das Reaktionsgefäß auf Eis überführt und anschließend wie zuvor zentrifugiert. Der Überstand wird in eine Küvette überführt und die Absorption bei 440 nm (Zucker), 532 nm (produziertes Pigment) und 600 nm (Trübung der Lösung) gemessen. Zum kalibrieren wird 0,1 % TCE verwendet.

Die MDA-Äquivalente in nm/ml werden wie folgt berechnet:

$$MDA_{eq} = \left[\frac{(Abs_{532} - Abs_{600}) - [(Abs_{440} - Abs_{600}) * 0,0571]}{157000} \right] * 10^6 \parallel$$

Die MDA-Äquivalente entsprechend der Verwendeten Menge an Pflanzenmaterial in g z.B. für Frischgewicht (FW) in nm/g werden wie im Folgenden berechnet:

$$MDA_{eq} \frac{nmol}{gFW} = MDA_{eq} \frac{nmol}{ml} * \frac{1ml}{gFW} \parallel$$

2.35 SDS Gele

Trenngel (12%)

2,88 ml H₂O
2,34 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
3,60 ml Acrylamid 30 %
90 µl 10 % (v/v) SDS
90 µl 10 % (w/v) APS
3,6 µl TEMED

Sammelgel (4%)

2,16 ml H₂O
375 µl 1 M Tris-HCl, pH 6,8
405 µl Acrylamid 30 %
30 µl 10 % (v/v) SDS
30 µl 10 % (w/v) APS
2,5 µl TEMED

1 x SDS Laufpuffer

25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0.1 % SDS

2 x SDS Probenpuffer

4 % SDS; 20 % Glycerin; 120 mM Tris-HCl, pH 6.8; 0.01 % Bromphenolblau

Das Sammelgel und darauf das Trenngel werden zwischen zwei mit einem Gummi abgedichteten Glasplatten gegossen. Zur Formung der Taschen für die Proben wird ein Kamm verwendet der bis zur vollständigen Polymerisation des Gels im Gel verbleibt. Der Gellauf erfolgt in einer mit 1x Laufpuffer gefüllten Kammer. Die Proben werden vor der Beladung der Geltaaschen mit SDS-Probenpuffer versetzt. Proben und Marker müssen zuvor für 5-10 Minuten bei 95 °C aufgekocht werden. Für den Gellauf wird zunächst eine Spannung von 10 mA pro Gel angelegt. Sobald die Proben das Trenngel erreicht haben, kann die Spannung auf 20 mA pro Gel erhöht werden.

2.36 Coomassie-Färbung

Das SDS-Gel wird für 45 – 60 Minuten bei RT und unter leichtem Schütteln in Fixierlösung inkubiert. Anschließend wird der Fixierer abgegossen und das Gel dreimal für je 10 Minuten mit Wasser gewaschen. Nun muss das Gel für mehrere Stunden oder ON in der Färbelösung inkubieren. Abschließend wird das Gel mit Wasser gewaschen, bis die gewünschte Farbintensität erreicht ist.

Färbe Stammlösung:

100 g/l Ammoniumsulfat, 1% (v/v) Phosphorsäure, 0,1 % (w/v) Coomassie G250

Fixierer:

10 % (v/v) Essigsäure, 40 % (v/v) Methanol

Färbelösung:

4 Teile Färbe Stammlösung und 1 Teil Methanol

2.37 Ponceau Färbung

Für die Ponceau-Färbung wird die Membran etwa 20 Minuten gefärbt und danach vorsichtig mit Wasser abgewaschen, bis die Proteinbanden gut sichtbar sind. Der Marker kann jetzt auf der Membran markiert werden.

Ponceau-Färbung:

3 % TCE (w/v) und 0.2 % (w/v) Ponceau S in Wasser (frisch angesetzt)

2.38 Protein Blot

Ein Stück Nitrocellulosemembran und zwei Stücke Filterpapier werden in der Größe des SDS-Gels zugeschnitten. Von der Membran wird zur späteren Orientierung die rechte obere Ecke

abgeschnitten. Die Träger-Kassette wird in ein mit kaltem Towbin-Puffer gefülltes Vorbereitungsgefäß gelegt. Ein Schwamm wird mit Puffer angefeuchtet und in die Kassette eingelegt. Ein Filterpapier wird angefeuchtet und auf den ersten Schwamm gelegt. Darauf folgt das SDS-Gel. Im Anschluss die ebenfalls angefeuchtete Membran und nun wieder Filterpapier und darauf ein zweiter Schwamm. Zwischen den Schritten werden Luftblasen mit einer Walze ausgerollt. Die Kassette wird geschlossen und in die Blottkammer eingesetzt (rot zu rot). Abschließend wird die Kammer mit kaltem Towbinpuffer gefüllt und in kalter Umgebung und unter Rühren bei 70 Volt laufen gelassen.

Die geblottete Membran kann in TBST eingeschweißt bis zur Immunodetektion gelagert oder direkt über Nacht in Blockierlösung inkubiert werden.

Transfer buffer (Towbin et al., 1979):

25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol; vorgekühlt

2.39 Immundetektion von Proteinen

Vor der Immundetektion muss die Membran für mindestens eine Stunde in Blockierlösung inkubieren. Im Anschluss wird die Blockierlösung entfernt und 50 Milliliter des primären Antikörpers (1:500 oder 1:1000 mit Blockierlösung verdünnt) zugegeben und für eine Stunde bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Der Antikörper kann danach bei -20 °C aufgehoben und bis zu viermal wiederverwendet werden. Die Membran wird mit TBST gewaschen (1*spülen, 1* 15 Minuten, 3*5 Minuten). Der sekundäre Antikörper (anti-Rabbit) wird 1:5000 mit Blockierlösung verdünnt, hinzugegeben und 45 Minuten inkubiert. Danach wird erneut wie zuvor mit TBST gewaschen. Zur Detektion des Chemilumineszenzsignals werden 0.7 ml Detektionslösung 1 mit 0.7 ml von Detektionslösung 2 gemischt und auf Plastikfolie vorgelegt. Die Membran wird mit Whatman-Papier trocken getupft, mit der Proteinseite nach unten auf die Lösung gelegt und für eine 1 Minute inkubiert. Abschließend wird überschüssige Lösung mit Whatman-Papier entfernt. Die Membran kann nun mit der Proteinseite nach oben in den Chemilumineszenzdetektor gelegt werden.

TBS:

20 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl

TBST:

TBS + 0.1% v/v Tween-20

Blockierlösung:

TBST + 4% (w/v) non-fat dry-milk powder.

2.40 Überexpression von Proteinen

Vor der Induktion der *E. coli* BL21 Zellen, die das Zielgen für die Proteinüberexpression im Vektor pet28a trugen, wurden 20 ml LB_{Kan} Medium mit den entsprechenden Bakterien inokuliert und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurde ein Teil der Übernachtskultur in ein größeres Volumen überführt und bei 37°C und 250 U/min bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5 – 0.6 angezogen. 1 ml der Kultur wurde vor der Induktion entnommen und als Kontrolle verwendet. Die restliche Kultur wurde für 15 Minuten bei 26°C und 180 U/min weiter inkubiert und anschließend mit IPTG versetzt, so dass dieses eine finale Konzentration von 1 mM hatte. Proben wurden nach 1,5 und 3 Stunden entnommen. Die Proben wurden abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Pellets zur Aufbewahrung bei -20 °C eingefroren.

2.41 Anzucht und Untersuchung der Überexpressionslinien

Nach dem floral dip mit Agrobakterien die den Vektor pBIN19-35S-CpGRP1 trugen, wurden von den gedippten Pflanzen die Samen gewonnen und auf MS_{Kan}-Medium selektiert und genotypisiert. Die Selektion ergab 13 transgene Pflanzen und somit 13 unabhängige Linien (2 – 6 und A, C, D, F, G, I, J, K, L). Von jeder dieser Pflanzen wurden wiederum die Samen gewonnen und ausgesät. Dieser Versuch wurde in Kooperation mit einer Masterstudentin (Cathrin Lanzrath) durchgeführt. Jeder von uns arbeitete mit je 9 Pflanzen pro Linie plus 9 Pflanzen für den Wildtyp Col0. Die Pflanzen mit denen ich gearbeitet habe werden im Folgenden als Set B bezeichnet, die Pflanzen mit denen Cathrin gearbeitet hat als Set C. Die Pflanzen von Set B waren auf selektivem Medium angezogen worden. Set C auf Erde. Die Keimung erfolgte unter Kurztagsbedingungen (8 h Licht bei 22 °C und 16 h Dunkelheit bei 20 °C). Für Set C (siehe unten) wurde beobachtet, ob es bezüglich des Keimungszeitpunkts Unterschiede zwischen den Linien gibt. Eine Woche nach der Keimung wurden die Keimlinge ins Gewächshaus gebracht und dort auf Erde vereinzelt. Gewässert wurden die Pflanzen nach Bedarf. Belichtung und Temperatur ergab sich durch die Wetterkonditionen. Bei zu geringer Sonneneinstrahlung wurden die Pflanzen künstlich beleuchtet, bei starker Sonneneinstrahlung durch Sonnensegel geschützt um optimale Anzucht und Wachstumsbedingungen zu gewährleisten. Alle Pflanzen wurden vor Beginn der Experimente genotypisiert, negativ getestete Pflanzen aussortiert. Ergebnisse der Sets wurden getrennt ausgewertet und verglichen. Die Daten beider Sets gemeinsam auszuwerten war nicht möglich, da die Pflanzen auf unterschiedlichen Medien angezogen wurden und Set C später ausgesät wurde als Set B.

Ein Teil der Pflanzen jeder Linie wurden nach etwa vier Wochen zur Gewinnung von Pflanzenmaterial für RNA und Proteinextraktion verwendet, die übrigen Pflanzen verblieben bis zum Ende ihres Lebenszyklus im Gewächshaus und wurde zur Samengewinnung genutzt. Innerhalb der Zeit in der Die Pflanzen im Gewächshaus wuchsen, wurden verschiedene Pa-

parameter wie Durchmesser der Blattrosette, Wuchshöhe der primären Infloreszenz, Zahl der Verzweigungen (sekundäre Infloreszenzen), der Tag der Knospenbildung und der Tag der Blütenbildung bestimmt.

3 Ergebnisse

3.1 Proteinmenge von CpGRP1 in *C. plantagineum* nach ABA- und Mannitolbehandlung

Aus den Ergebnissen vorhergehender Experimente (siehe **Abschnitt 1.5**) ist bekannt, dass die Aktivität des Promotors von CpGRP1 durch Trockenstress erhöht wird. In den Blättern der Pflanze wird dadurch mehr CpGRP1-Transkript und analog dazu mehr CpGRP1-Protein produziert. In den Wurzeln wurde weder Transkript noch Protein nachgewiesen. Weiter konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von *C. plantagineum* mit 0,1 mM ABA eine Abnahme der Transkriptmenge bewirkt. Eine Behandlung mit 0,8 M Mannitol bewirkt innerhalb der ersten 24 Stunden eine Zunahme der Transkriptmenge. Nach 48 Stunden ist die Transkriptmenge wieder deutlich geringer. Die Ergebnisse von RT-PCR, quantitativer PCR und RNA-Blots stimmen in ihrer dahingehenden Aussage überein (Giarola et al. 2015).

Ergänzend wurden Protein-Blots durchgeführt. Wie in **Abbildung 15** zu sehen, wurden die Proben der gewässerten Kontrollpflanzen im Gel neben den Proben der mit ABA- und Mannitollösung behandelten Pflanzen aufgetragen und anschließend geblottet. Die geblottete Membran wurde nacheinander mit drei verschiedenen Antikörpern detektiert. Die erste Immunodetektion erfolgte mit dem für CpGRP1 spezifischen Antikörper (28056) und zeigt in den mit ABA behandelten Pflanzen eine geringere Proteinmenge als in den Kontrollpflanzen. Die Pflanzen die mit 0.8 M Mannitollösung gewässert wurden, zeigen dagegen eine größere Menge an CpGRP1-Protein.

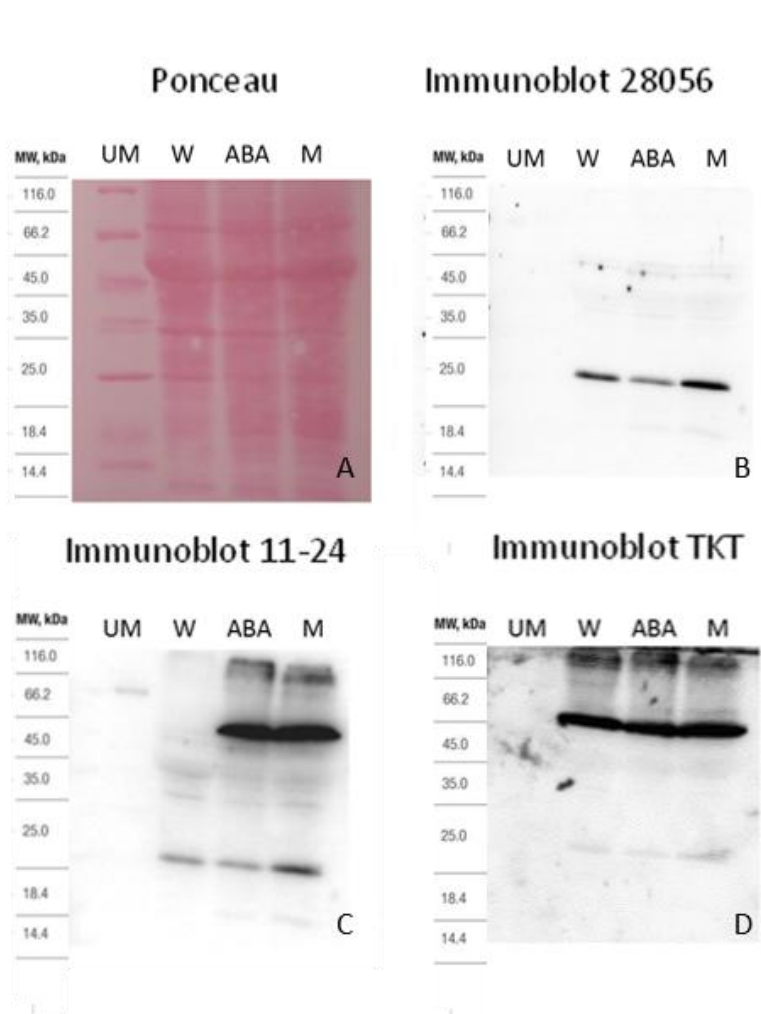


Abbildung 15: Detektion von CpGRP1 Protein

Es wurde aus Blättern isoliertes Protein verwendet. Die abgebildete Membran (A) wurde zunächst mit dem Antikörper gegen CpGPR1 (28056) detektiert (B), danach als Kontrolle für eine erfolgreiche ABA-Behandlung mit dem Antikörper gegen das ABA-induzierbare Gen CDeT11-24 (C) und zuletzt als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung mit dem Antikörper gegen das konstitutiv exprimierte Gen TKT3 (Transketolase3) (D). Die Expositionszeit betrug jeweils zehn Minuten. UM = Ungefärbter Marker W = Wasser ABA = 0,1 mM Abscisinsäure M = 0.8 M Mannitol

Um die Aussagekraft dieser Ergebnisse einschätzen zu können, wurde dieselbe Membran anschließend mit dem Antikörper gegen CDeT11-24 und zuletzt mit dem Antikörper für TKT3 behandelt und detektiert. CDeT11-24 ist ein LEA-ähnliches Protein aus *C. plantagineum* und wird durch ABA induziert (Velasco et al. 1998). Daher lässt sich damit überprüfen, ob die Behandlung der Proben mit ABA korrekt durchgeführt wurde (van den Dries et al. 2011). Nach der Detektion der Membran mit dem Antikörper gegen CDeT11-24 zeigen sich zwei deutliche Banden für die Proben der mit ABA und Mannitol behandelten Pflanzen auf der für das Protein typischen Höhe nahe der 66.2 kDa Bande. TKT3 ist die Abkürzung für das Enzym Transketolase 3, isoliert aus *C. plantagineum*. Dieses wird konstitutiv in verschiedenen Geweben und unter verschiedensten physiologischen Bedingungen exprimiert (Bernacchia et al. 1995). Daher wurde das Protein in diesem Experiment verwendet, um eine gleichmäßige Be-

ladung mit Proben zu überprüfen. Alle Proben zeigen in der Detektion mit dem für TKT3 spezifischen Antikörper eine deutliche Bande.

3.2 Die Lokalisation des Proteins CpGRP1

3.2.1 Transiente Transformation von *C. plantagineum* mit CpGRP1

3.2.1.1 Particle Gun Bombardment

Für die transiente Transformation von *C. plantagineum* Blättern durch Particle Gun Bombardment wurde das Konstrukt 35S-CpGRP1-roGFP (siehe **Abschnitt 2.3**) verwendet. Dieses enthält einen starken, konstitutiv exprimierten 35S-Promotor, die für CpGRP1 kodierende Gensequenz und direkt anschließend und im Leserahmen die für roGFP kodierende Sequenz. Die Aufnahmen der transformierten Zellen wurden mit einem Laser Scanning Mikroskop angefertigt.

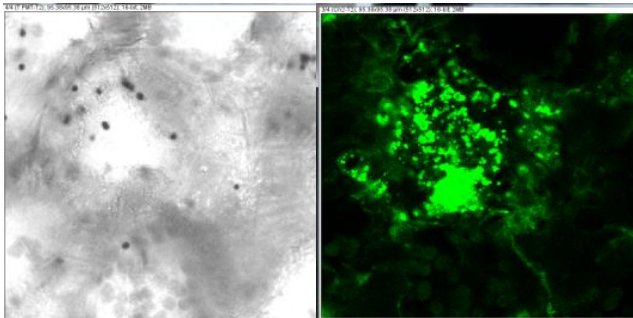


Abbildung 16: Aufnahmen einer transient transformierten *C. plantagineum* Blatzelle

Beide Aufnahmen zeigen dieselbe Zelle in gleicher Orientierung, links im Hellfeld, rechts nach der Anregung durch den Laser.

In **Abbildung 16** sind repräsentative Aufnahmen einer der transformierten Zellen zu sehen. Die linke Aufnahme zeigt die Zelle im Hellfeld. Man kann die Zellwand und einige schwarze Punkte im Zellinneren erkennen. Dies sind die mit Vektor-DNA beschichteten Goldkugeln, die durch das Bombardment in die Zelle geschossen wurden. Die rechte Abbildung zeigt die grüne Fluoreszenz des angeregten roGFPs. Da das grün fluoreszierende Protein an CpGRP1 gebunden ist, erlaubt die Lokalisation von GFP Rückschlüsse auf die Lokalisation von CpGRP1. Die Aufnahme zeigt die stärkste Fluoreszenz im Bereich des Zellkerns und in vesikelähnlichen Strukturen im Inneren der Zelle, die sich bis zur Zellwand ausbreiten. In hoher Vergrößerung wird sichtbar, dass nur die Hülle der Vesikel grün erscheint. Eine Bewegung der vesikulären Strukturen konnte in der Live-Aufnahme nicht beobachtet werden.

3.2.1.2 FAST Assay

Für den FAST-Assay wurde dasselbe Konstrukt verwendet wie für das Particle Gun Bombardment (siehe **3.1.1.1**). Im Versuch wurden 5 Tage alte *A. thaliana* Keimlinge, 12 Tage

alte *A. thaliana* Keimlinge und junge *C. plantagineum* Pflanzen aus der laboreigenen Sterilkultur verwendet. Alle Pflanzen wurden in gleicher Weise mit den transgenen Agrobakterien inkubiert.

Für *C. plantagineum* zeigte sich keine GFP-Fluoreszenz.

Die *A. thaliana* Keimlinge zeigten teilweise schwache Fluoreszenz, wobei das Ergebnis bei den jüngeren Keimlingen besser ausfiel. Die Aufnahmen zeigen Fluoreszenz von runden, möglicherweise vesikulären Strukturen (**Abbildung 17**).

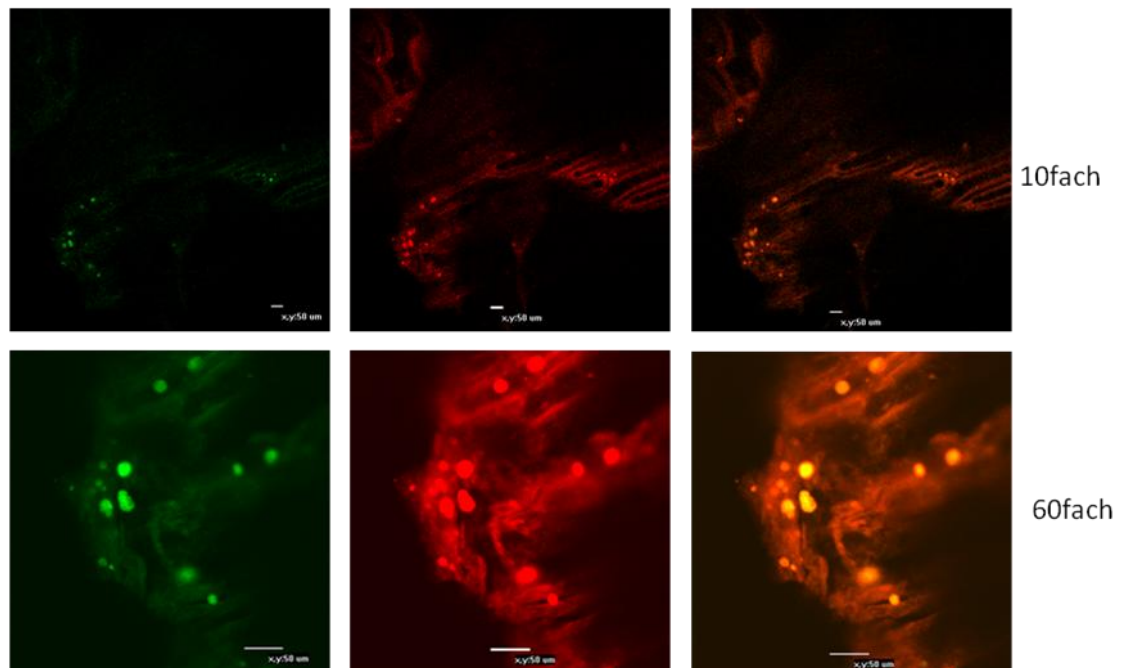


Abbildung 17: Aufnahme transient transformierter *A. thaliana* Keimlinge

Laser Scanning Mikroskopische Aufnahmen 12 Tage alter *A. thaliana* Keimlinge bei 10facher und 60facher Vergrößerung. Die linken Aufnahmen zeigen die GFP-Fluoreszenz. Die mittleren Aufnahmen zeigen die rote Färbung, die durch die Autofluoreszenz der Chloroplasten entsteht. Rechts sind beide Aufnahmen überlagert.

3.2.2 Stabile Transformation mit CpGRP1 - Transgene Linien

Zur Erzeugung stabiler transgener Linien wurden *A. thaliana* Pflanzen mittels floral Dip (siehe **Abschnitt 2.28**) in eine Lösung mit transgenen Agrobakterien, die den Vektor 35S-CpGRP1-roGFP enthielten, transformiert. Es erwies sich allerdings als sehr schwierig die transgenen Keimlinge anzuziehen. Trotz wiederholter Versuche starben fast alle Pflanzen bis zum Erreichen des Achtblattstadiums ab. Letztendlich war es möglich zwei separate Linien aufzuziehen. Die Linien erhielten die Bezeichnung A 1.1 und A 1.2. Sie zeigen einen deutlichen Phänotyp wie in **Abbildung 18 und 19** zu sehen ist. Die Pflanzen sind wesentlich kleiner als Wildtyppflanzen und entwickeln wellig aussehende echte Blätter. Die Keimblätter erscheinen normal entwickelt. Linie A 1.1 ist etwas kleiner und empfindlicher als Linie A 1.2. Die F2 Generation

der Linien A 1.1 und A 1.2 zeigt eine unterschiedlich starke Ausprägung des beschriebenen Phänotyps und nur die Pflanzen mit einem schwächeren Phänotyp produzierten Samen.



Abbildung 18: *A. thaliana* wt vs *A. thaliana* Überexpressionslinie (A 1.2)

Im linken Topf sind zwei Wildtyppflanzen zu sehen, im rechten Topf zwei transgene Pflanzen der Linie A 1.2. Die Pflanzen sind gleich alt und wurden unter gleichen Bedingungen angezogen.



Abbildung 19: Verschiedene GFP-Linien im Vergleich

Von links nach rechts sind Linie A 1.1, A 1.2, C 2.1 und C 2.2 zu sehen. Linie A 1.1 und A 1.2 sind mit dem Konstrukt 35S-CpGRP1-roGFP transformiert worden, Linie C 2.1 und C 2.2 mit dem Konstrukt C2-CpGRP1-roGFP. Die Pflanzen sind gleich alt und wurden unter gleichen Bedingungen angezogen

Da die Anzucht der Überexpressionslinien zunächst scheiterte, wurden Linien mit einem anderen Promotor erzeugt. Dazu wurde anstelle des 35S-Promotors der C2-Promotor verwendet. Dieser Promotor ist nicht konstitutiv aktiv, sondern wird durch ABA und Trockenstress induziert. Zudem wird unter Kontrolle des C2-Promotors (siehe **Abschnitt 2.3**) weniger Genprodukt erzeugt als unter der Kontrolle des 35S-Promotors. Die transgenen C2-Linien sehen aus wie der Wildtyp und lassen sich unproblematisch anziehen (siehe **Abbildung 18 und 19**). Sie sind dementsprechend deutlich größer und pflegeleichter als die Überexpressionslinien (**Abbildung 20**).



Abbildung 20: Nahaufnahme von einer Pflanze der Linie A 1.2 neben einer Pflanze der Linie C 2.1

Die Pflanzen sind gleich alt und wurden unter gleichen Bedingungen angezogen

Unter dem Laser-Scanning Mikroskop zeigten die Linie A 1.2 und C 2.1 unterschiedliche fluoreszierende Strukturen wie die **Abbildungen 21 bis 23** zeigen. Die Linien in denen das CpGRP1-roGFP Fusionskonstrukt durch den 35S-Promotor überexprimiert wurde, zeigen die schon vorher beobachteten vesikulären Strukturen (siehe **Abschnitt 3.2.1.1. und 3.2.1.2**). Die Linien in denen der C2-Promotor vor die kodierenden Sequenzen der CpGRP1-roGFP Gene gesetzt wurde, wurden vor der Mikroskopie durch moderaten Trockenstress induziert. Sie zeigen keine globulären Strukturen. Die grüne Fluoreszenz ist hier im Bereich der Zellwand oder zumindest nahe bei dieser lokalisiert.

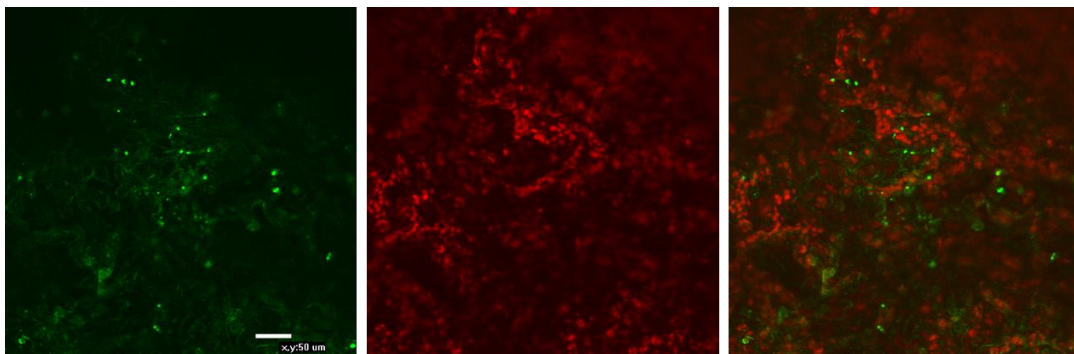


Abbildung 21: Laser Scanning Mikroskopische Aufnahmen der Linie A 1.2

(Blatt einer 4 Wochen alten Pflanze, ungestresst)

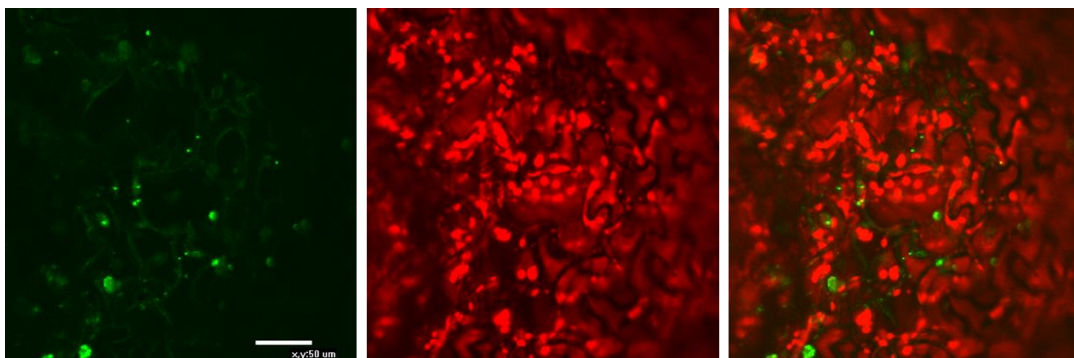


Abbildung 22: Laser Scanning Mikroskopische Aufnahmen der Linie A 1.2

(Blatt einer 4 Wochen alten Pflanze, ungestresst)

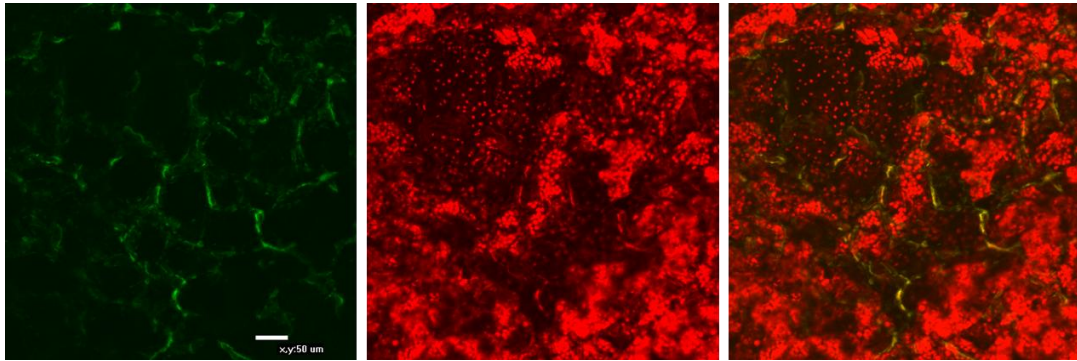


Abbildung 23: Laser Scanning Mikroskopische Aufnahmen der Linie C 1.2
(Blatt einer 4 Wochen alten Pflanze, moderater Trockenstress zur Induktion)

Vergleich der Transkriptmengen (RT-PCR)

Um zu überprüfen, ob der Phänotyp der A 1.2 Linien mit der Menge an gebildetem Transkript und somit möglicherweise auch der Menge an gebildetem Protein korreliert, wurde von mehreren Pflanzen (siehe **Abbildung 24**) der F2 Generation RNA extrahiert und Reverse Transkription und RT-PCRs durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde eine Probe von einer *A. thaliana* Wildtyp Pflanze verwendet.

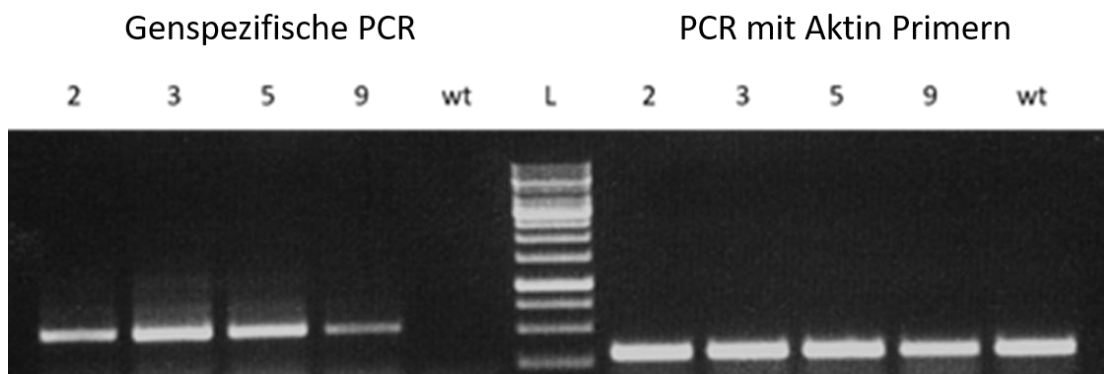


Abbildung 24: Ergebnisse der RT-PCR für A 1.2 Pflanzen

Links: Genspezifische PCR mit cDNA der Pflanzen 2,3,5 und 9 sowie einer *A. thaliana* Wildtyppflanze
Mitte: Größenstandard Rechts: PCR mit Aktin Primern und derselben cDNA.
Es wurde Blattmaterial zur RNA Extraktion verwendet.

Abbildung 24 zeigt das Ergebnis der durchgeführten PCRs. Pflanze 3 zeigt die größte Menge an PCR-Produkt, woraus sich schließen lässt, dass in dieser Pflanze die größte Menge an Transkript des CpGRP1 Gens gebildet wird. Pflanze 9 zeigte die schwächste Bande und enthält somit die geringste Menge an Transkript. Im Vergleich mit dem Phänotyp (siehe **Abbildung 25**) scheint eine größere Menge an Transkript (und somit potentiell auch eine größere Menge an Protein) mit einer geringeren Größe der Pflanzen zu korrelieren. Zudem zeigen die kleineren Pflanzen einen deutlicheren Blattphänotyp. Der Wildtyp zeigt keine Expression des Gens CpGRP1.

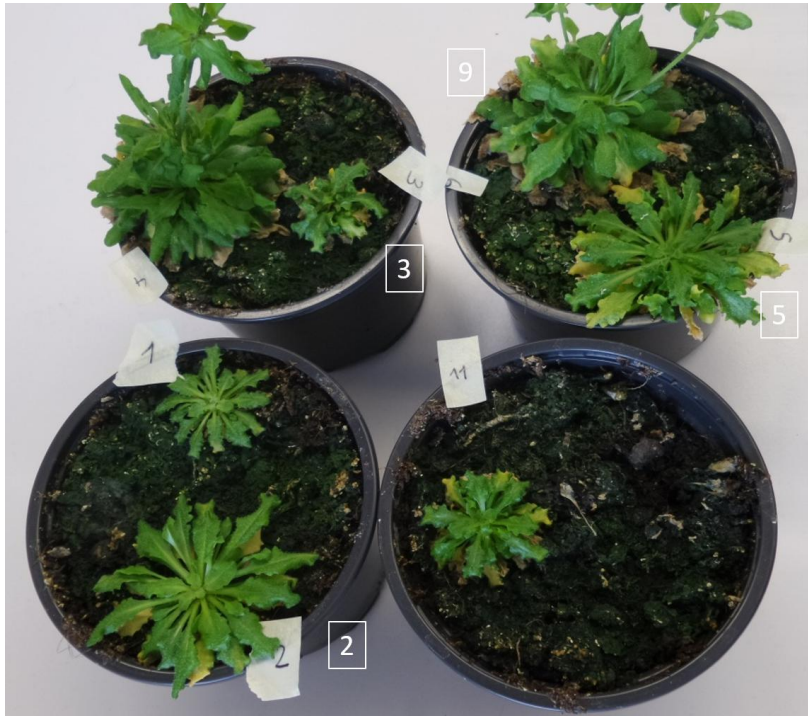


Abbildung 25: Transgene Pflanzen der Linie A 1.2

Die Pflanzen aus denen RNA extrahiert und cDNA für die PCRs synthetisiert wurden, sind mit Zahlen markiert (2,3,5,9).

3.3 Untersuchung des Promotors von CpGRP1 und der Promotoren der homologen Gene in *L. brevidens* und *L. subracemosa*

3.3.1 Trockenstressinduzierte Aktivität des CpGRP1 Promotors transient exprimiert in *C. plantagineum*

Promotorfragmente p370 und p584minus

Um die im Rahmen meiner Diplomarbeit gewonnenen Ergebnisse über die Aktivität verschiedener Teile des CpGRP1 Promotors weiter zu untersuchen (siehe **Abschnitt 1.6.3.1**) (Giarola, et al. 2015), wurden zusätzlich zu den bereits getesteten Promotorfragmenten p887, p584, p240 und p145 zwei weitere Promotorkonstrukte erzeugt, nämlich Promotorfragment p370 und p584minus. **Abbildung 26** zeigt eine grafische Darstellung aller untersuchten Promotorfragmente und der darin enthaltenen relevanten cis-Elemente.

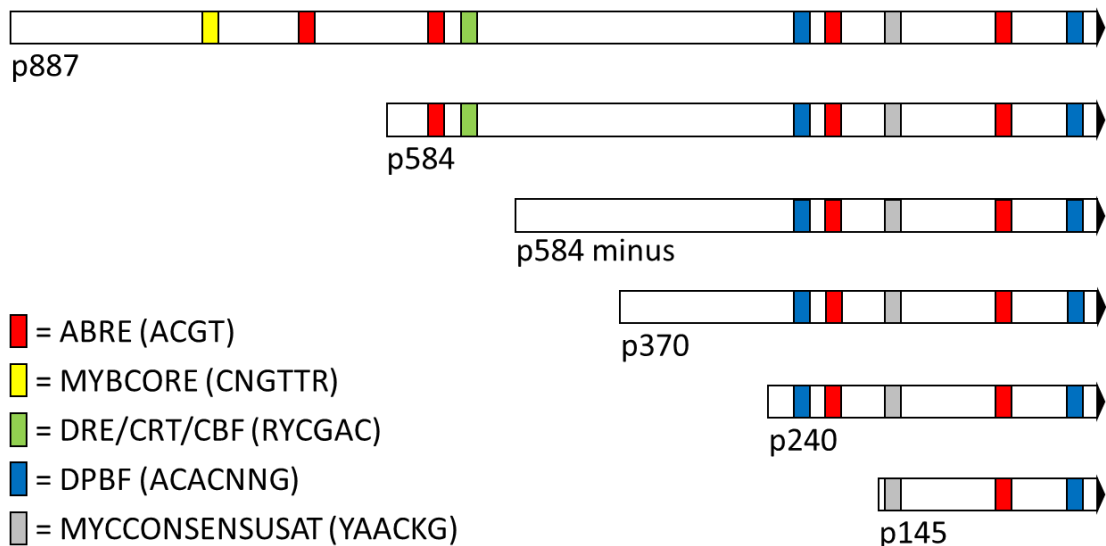


Abbildung 26: Promotorfragmente und Promotorelemente des CpGRP1 Promotors

Von oben nach unten sind die Promotorfragmente in absteigender Größe dargestellt. Die farbigen Kästen innerhalb der Fragmente symbolisieren die verschiedenen cis-Elemente. ABRE: Cis-Element aus dem *erd1* Promotor von *A. thaliana* der durch Etiolierung, ABA und Trockenstress induziert wird (Simpson et al. 2003). MYBCORE: Cis-Element das den MYB-Transkriptionsfaktor bindet (Lüscher & Eisenman 1990). DRE/CRT/CBF: Bindestelle für die Transkriptionsfaktoren DREB1 und DREB2 (Xue 2002)(Dubouzet et al. 2003). DPBF: Bindestelle b-ZIP Transkriptionsfaktoren (Kim et al. 1997). MYCCONSENSUSAT: Erkennungsmotiv für Myb-Transkriptionsfaktoren (Abe et al. 2003).

Die berücksichtigten cis-Elemente binden Transkriptionsfaktoren wie b-ZIP-Transkriptionsfaktoren (DPBF), MYB-Transkriptionsfaktoren (MYBCORE und MYCCONSENSUSAT) sowie DREBs (DRE/CRT/CBF) und für sie wurde eine Beteiligung an der pflanzlichen Trockenstressantwort beschrieben (Kim et al. 1997, Lüscher & Eisenman 1990, Xue 2002, Dubouzet et al. 2003) (siehe auch **Abschnitt 1.3.1** und <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>).

Das Promotorfragment p370 wurde, wie zuvor die Fragmente p887, p584, p240 und p145, mit dem für Luciferase kodierenden Reportergen (LUC) fusioniert und für die transiente Transformation von *C. plantagineum* Blättern durch particle gun bombardment verwendet. Es wurden je vier bombardments durchgeführt und der Mittelwert der vier Ergebnisse gebildet. Fragment p584minus wurde erzeugt um zu testen, ob das an Position -501 befindliche DRE-Element entscheidend für die Trockenstressresponsivität des Promotors ist. Zu diesem Zweck wurden 82 Basenpaare, die das DRE-Element enthalten deletiert. Fragment p584minus ist demnach 82 Basenpaare kürzer als p584. Um Fragment p584minus mit p584 zu vergleichen, mussten beide Fragmente mit GFP fusioniert werden, da der zuvor verwendete Chemilumineszenzdetektor defekt war. Es konnten also nicht wie zuvor Promotor-LUC Konstrukte verwendet werden. Die so erhaltenen Ergebnisse sind deshalb nicht direkt mit den mit Promotor-LUC Konstrukten erhaltenen Ergebnissen vergleichbar.

Ergebnisse p370

Die mit Wasser behandelten Proben zeigten eine Promotoraktivität von 98 %. Die mit Mannitol behandelten Blätter zeigten eine Aktivität von 18 % und die mit Trockenstress behandelten Blätter eine Aktivität von 52 %. Promotorfragment p370 wird demnach nicht durch Trockenstress aktiviert.

Tabelle 1 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse aller mit LUC-Fusionskonstrukten getesteten Promotorfragmente. Es wird deutlich, dass die kleinste Promotorfragment p145 und p240 insgesamt eine eher geringe Aktivität zeigen. Promotorfragment p370 zeigt Aktivität im ungestressten Zustand und eine Abnahme der Aktivität durch die Behandlung mit Trockenstress. Die Promotorfragmente p584 und p887 hingegen werden beide gleichermaßen stark durch Trockenstress aktiviert. Eine Behandlung der Pflanzen mit Mannitol verringert die Promotoraktivität in allen Fragmenten.

Tabelle 1: Aktivität verschiedener Promotorfragmente des CpGRP1 Promotors

Die Promotoraktivität ist in Prozent und als Mittelwert von vier Bombardments angegeben. Wasser wurde als Kontrolle verwendet.

Promotorfragment	Promotoraktivität in % nach Behandlung mit:		
	Wasser	Mannitol	Trockenheit
p887	77	54	147
p584	30	13	147
p370	98	18	52
p240	13	7	41
p145	1	3	3

Ergebnisse p584 vs. p584minus

Die Ergebnisse dreier Bombardments sind in **Abbildung 27** zusammengefasst. Durchschnittlich zeigte das 584 Nukleotide lange Promotorfragment p584 eine Aktivität von 115 %, während das 502 Nukleotide lange Fragment p584 minus (mit cis-Element Deletierung) eine durchschnittliche Aktivität von 87 % zeigt. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung kann man sagen, dass das Promotorfragment ohne DRE-Element tendenziell weniger deutlich durch Trockenstress induziert wird als das Promotorfragment mit DRE-Element.

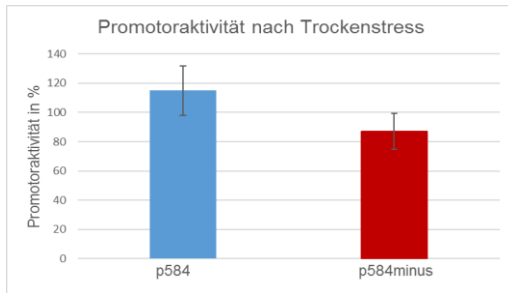


Abbildung 27: Vergleich der Promotoraktivität nach Trockenstress

In blau ist die relative, durchschnittliche Aktivität des Fragments mit DRE-Element dargestellt, in rot die relative, durchschnittliche Aktivität des Fragments ohne DRE-Element.

3.3.2 Untersuchung des entwicklungspezifischen Genexpressionsmusters von CpGRP1 durch *A. thaliana* Promotor-GUS Linien

Um das entwicklungspezifische Expressionsmuster von CpGRP1 zu untersuchen, wurden transgene *A. thaliana* Linien erzeugt. Dazu wurden Fragmente des Promotors von CpGRP1 mit dem GUS-Reportergen fusioniert. Zur Transformation der Pflanzen wurden zwei verschiedene Konstrukte verwendet. Das erste Konstrukt war eine Fusion aus dem mit 887 Nukleotiden längsten Promotorfragment plus 5'-UTR und der für GUS kodierenden Sequenz, das zweite Konstrukt bestand aus dem mit 584 Nukleotiden zweitlängsten Promotorfragment plus 5'-UTR und dem GUS-Gen.

Zusätzlich zur Untersuchung des entwicklungspezifischen Expressionsmusters des Gens CpGRP1 sollte durch Vergleich der erzeugten Linien getestet werden, ob Fragment p887 und p584 im Verlauf der pflanzlichen Entwicklung die gleiche Promotoraktivität zeigen. Für Fragment p887 wurden die Linien 1, 2 und 5 verwendet. Für Fragment p584 wurden Linie 18 und 19 verwendet.

Untersucht wurden Blätter, Stiele, Wurzeln, Blüten und Schoten. An den Tagen 5, 8, 12 und 19 nach der Aussaat wurden die Pflanzen der ersten Versuchsreihe für 24 Stunden GUS-gefärbt und unter dem Binokular untersucht. Da die GUS-Färbung nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden sehr intensiv ausfiel, wurden die Pflanzen der zweiten Versuchsreihe für 4 Stunden gefärbt, um Unterschiede in der Expressionsintensität zwischen verschiedenen Gewebetypen und Zeitpunkten besser darstellen zu können. Auch diesmal wurden die Pflanzen an den Tagen 5, 8 und 12 gefärbt. Da bei der ersten Versuchsdurchführung kein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen von Tag 12 und Tag 19 festgestellt wurde, wurde diesmal keine Färbung an Tag 19 vorgenommen.

Das Ergebnis für Blätter und Stiele ist in den **Abbildung 28 und 29** zu sehen. Nach der 24-stündigen GUS-Färbung (**Abbildung 28**) sind Keimblätter und ein Teil des Stiels nahe des Ansatzes der Wurzel in allen Linien an den Tagen 5 und 8 gefärbt. An Tag 12 zeigen sich Unterschiede zwischen den Linien. Während Linie p584-18 und Linie p887-2 keine Expression in den echten Blättern zeigt, weisen die drei übrigen Linien eine deutliche Färbung aller Blätter

- und somit Promotoraktivität - auf. Das Ergebnis an Tag 19 fällt analog zu dem an Tag 12 aus bis auf den Unterschied, dass die Färbung der Blätter bei Linie p887-5 eher schwach ausfällt.

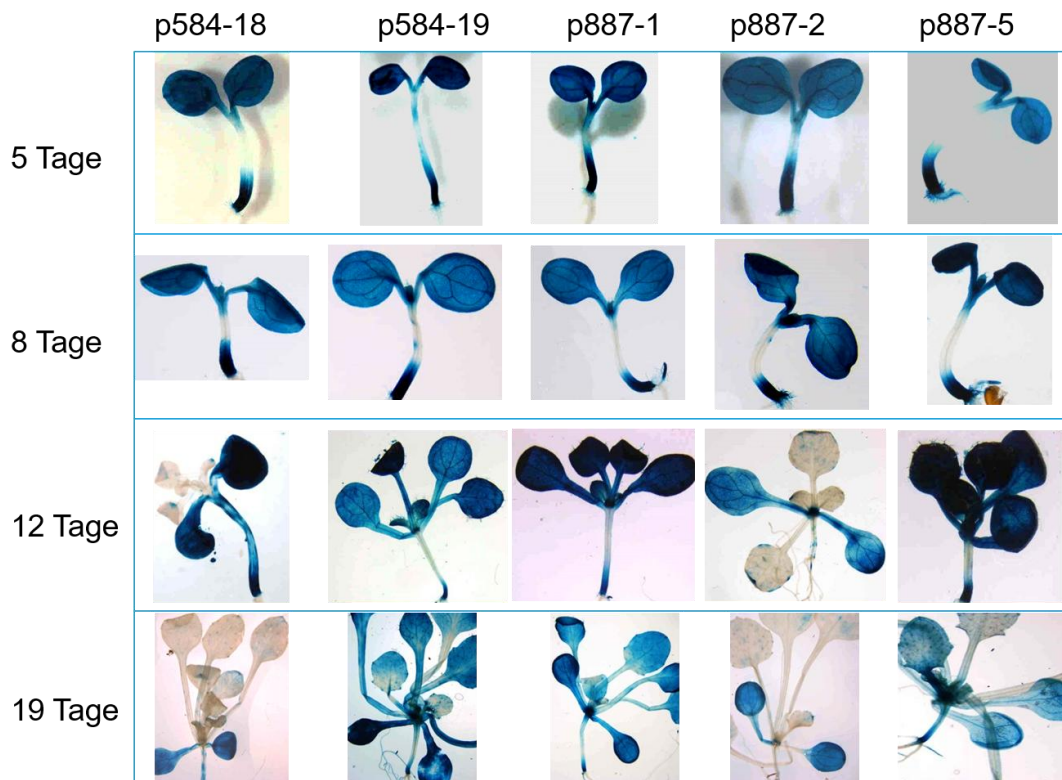


Abbildung 28 *A. thaliana* Promotor-GUS Linien, ungestresst, von MS_{Kan} Platten, 24 Stunden Färbung an 5, 8, 12 und 19 Tagen nach der Aussaat.

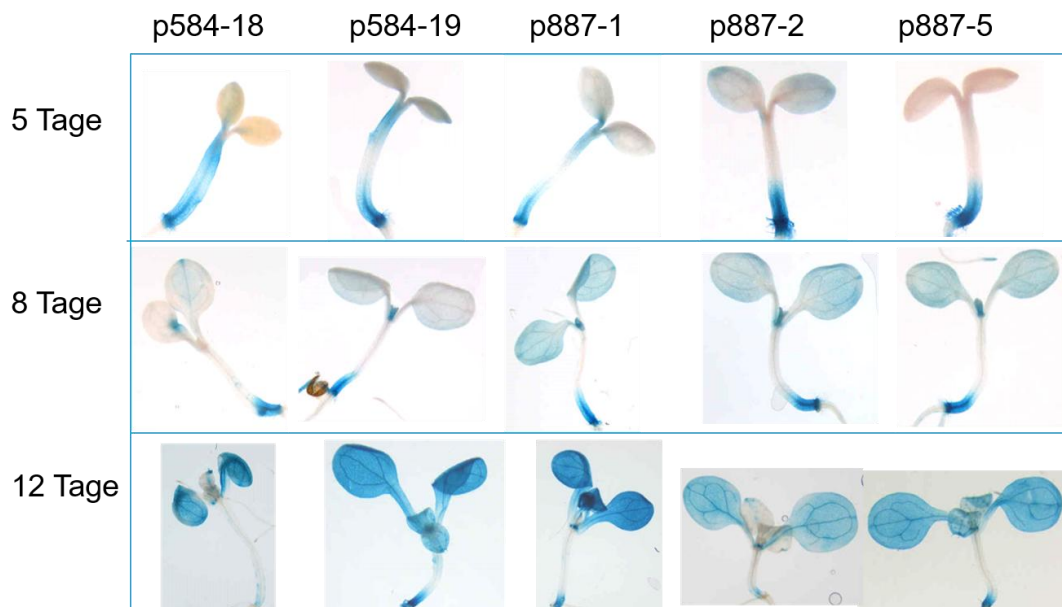


Abbildung 29: *A. thaliana* Promotor-GUS Linien, ungestresst, von MS_{Kan} Platten, 4 Stunden Färbung an 5, 8 und 12 Tagen nach der Aussaat.

Nach vierstündiger GUS-Färbung (**Abbildung 29**) zeigte sich eine Genexpression bei den 5 Tage alten Keimlingen nur im Bereich des Stils oberhalb der Wurzel. Dieser Bereich ist an den Tagen 8 und 12 ebenfalls gefärbt und zeigt somit eine durchgehende Expression des Reportergens. Die Keimblätter zeigen weder an Tag 5 noch an Tag 8 eine Expression. An Tag 12 sind die Keimblätter gefärbt. Die ersten beiden echten Blätter zeigen in den Linien p584-19, p887-1 und p887-2 Genexpression, in den Linien p584-18 und p887-5 hingegen nicht.

Zusammengefasst gilt, dass der unterste an den Beginn der Wurzel grenzende Teil der Pflanzen stets eine deutliche GUS-Expression zeigt. Die GUS-Expression in den Keimblättern ist schwächer ausgeprägt und dabei in 12 Tage alten Keimlingen stärker als in 8 und 5 Tage alten Keimlingen. GUS-Expression in den echten Blättern erfolgt in drei von fünf Linien (und zwar in den Linien p584-19, p887-1 und p887-5) und ist unabhängig von der Länge des Promotorfragments

Die in den **Abbildungen 30 und 31** gezeigten Aufnahmen der Wurzeln sind zusammen mit den bereits gezeigten Aufnahmen der Blätter der jeweils korrespondierenden Pflanze und Färbezeit entstanden und nur für eine bessere Übersicht getrennt dargestellt.

Die GUS-Färbung der Wurzeln zeigt, dass die CpGRP1-Promotorfragmente in den Linien p584-18 und p887-2 zu keiner Zeit aktiv sind. Linie p584-19, p887-1 und p887-5 zeigen an den Tagen 8, 12 und 19 in beiden Versuchen Promotoraktivität in den Wurzeln, besonders in den Wurzelspitzen und in sich neu bildenden Seitenwurzeln (**Abbildung 32 und 34**).

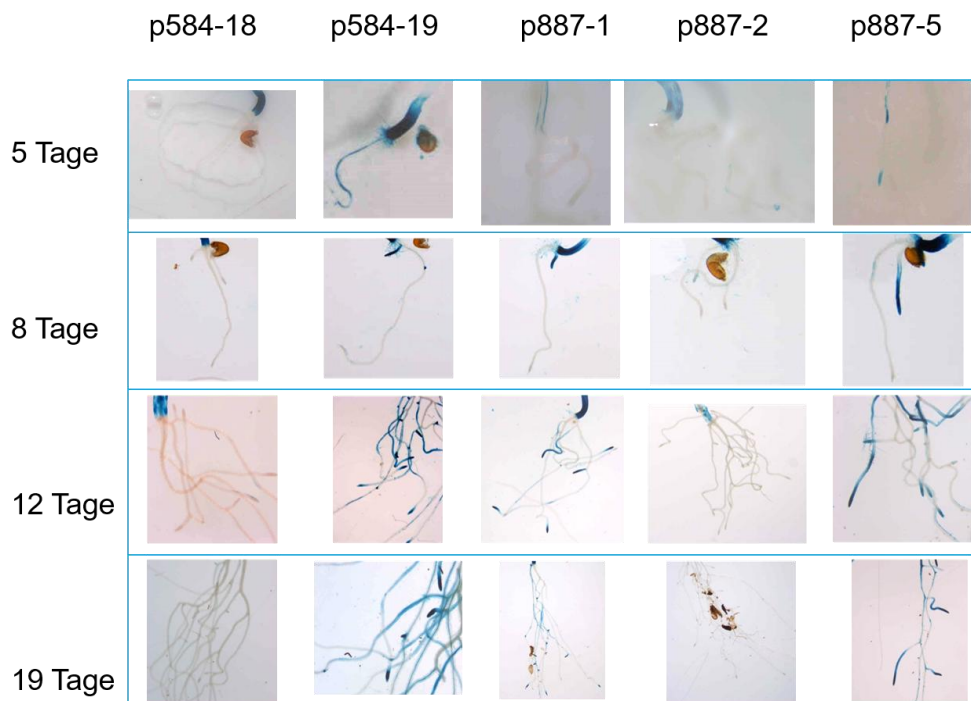


Abbildung 30: A. thaliana Promotor-GUS Linien, Wurzeln, 24 Stunden GUS-Färbung

Die Pflanzen wurden unbehandelt und intakt von selektiven MS_{Kan}⁻ Platten in die GUS-Färbelösung überführt. Die Färbung erfolgte für 24 Stunden. Die Tage bezeichnen die Zeit die seit der Keimung auf den MS_{Kan}⁻ Platten vergangen ist.

An Tag 5 ist die Genexpression in den Wurzeln hingegen schwächer ausgeprägt als später in der pflanzlichen Entwicklung (Tage 8, 12 und 19). Nach 4-stündiger Färbung zeigt keine der Linien an Tag 5 eine Färbung der Wurzeln. Nach 24 Stunden Färbung zeigen die Linien p584-19 und p887-5 GUS-Färbung und somit Promotoraktivität. Diese ist wiederum hauptsächlich in den lateralen Wurzelspitzen lokalisiert.

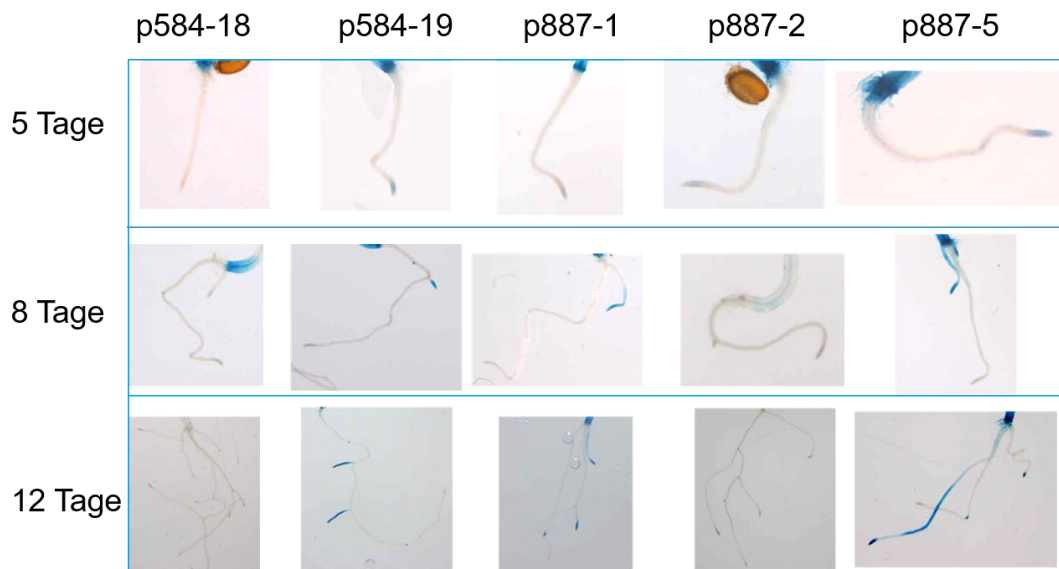


Abbildung 31: *A. thaliana* Promotor-GUS Linien, Wurzeln, 4 Stunden GUS-Färbung

Die Pflanzen wurden unbehandelt und intakt von selektiven MS_{Kan⁻}-Platten in die GUS-Färbelösung überführt. Die Färbung erfolgte für 4 Stunden. Die Tage bezeichnen die Zeit die seit der Keimung auf den MS_{Kan⁻}-Platten vergangen ist.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Genexpression an Tag 5 schwächer ist als an den Tagen 8, 12 und 19 und dass das Reporter gen nur in den Wurzelspitzen der Linien p584-19, p887-1 und p887-5 exprimiert wird.

Um zu testen, ob junge Pflanzenteile eine andere Genexpression zeigen als ältere Pflanzenteile, wurden innere (junge) und äußere (alte) Blätter von 4 Wochen alten *A. thaliana* GUS Pflanzen für 4 Stunden GUS-gefärbt. Es zeigten sich keine Unterschiede (**Abbildung 32**). Insgesamt fiel die Färbung schwach aus. Wie zuvor waren nur die echten Blätter der Linien p584-19, p887-1 und p887-5 gefärbt, allerdings in diesem Fall ausschließlich die Schnittstelle der Blattstiele und die Hydathoden (**Abbildung 32 und 34**) der Blätter.

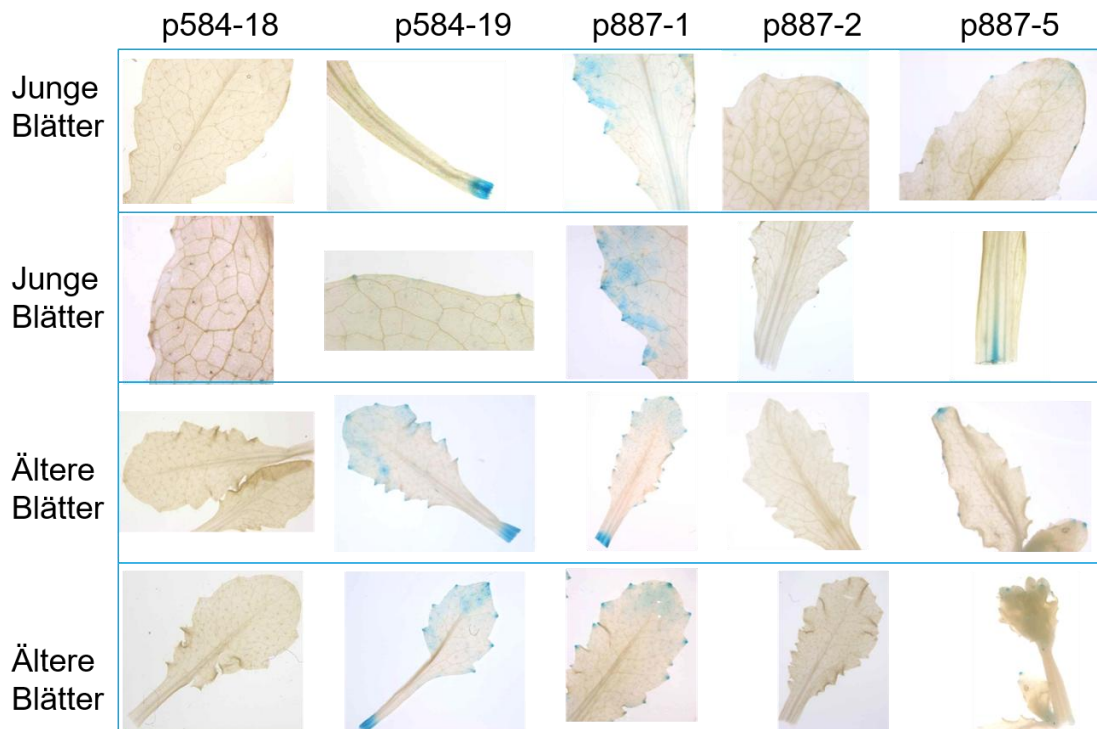


Abbildung 32: *A. thaliana* Promotor-GUS Linien, junge vs. alte Blätter, 4 Stunden GUS-Färbung

Die Pflanzen wurden auf selektiven MS_{Kan} Platten angezogen und nach drei Wochen auf Erde überführt. Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung waren sie 6 Wochen alt. Für die Färbung wurden die Blätter mit einer Schere abgetrennt und für 4 Stunden in GUS-Färbelösung gefärbt

Die Untersuchung von Blüten und Samenschoten zeigen dasselbe Expressionsmuster wie zuvor für Blätter und Wurzeln beschrieben. Während die Linien p584-19, p887-1 und p887-5 deutliche GUS-Färbung und somit Promotoraktivität und eine Expression des GUS-Gens zeigen, zeigen die Linien p584-18 und p887-2 keine GUS-Expression. In den Blüten aller GUS exprimierenden Linien sind die Kelchblätter und die Narbe des Gynözeum gefärbt. Linie p584 und Linie p887 zeigen zudem Genexpression in den Staubbeuteln des Andrözeums. In Linie p887-5 sind die Staubbeutel ungefärbt. Dies spiegelt die Tendenz wieder, dass die Genexpression in Linie p887-5 schwächer ist als in den Linien p584-19 und p887-1

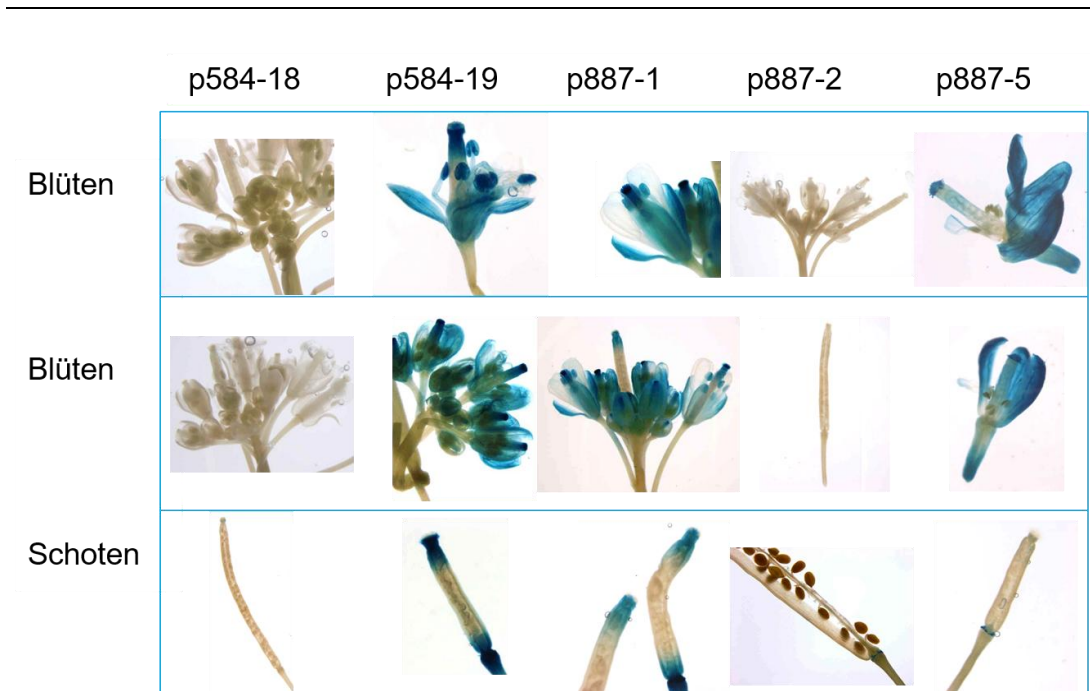


Abbildung 33: *A. thaliana* Promotor-GUS Linien, Blüten und Schoten

Die Pflanzen wurden auf selektiven MS_{Kan} Platten angezogen und nach drei Wochen auf Erde überführt. Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung waren sie 8 Wochen alt. Für die Färbung wurden Blüten und Schoten mit einer Schere abgetrennt und für 4 Stunden in GUS-Färbelösung gefärbt

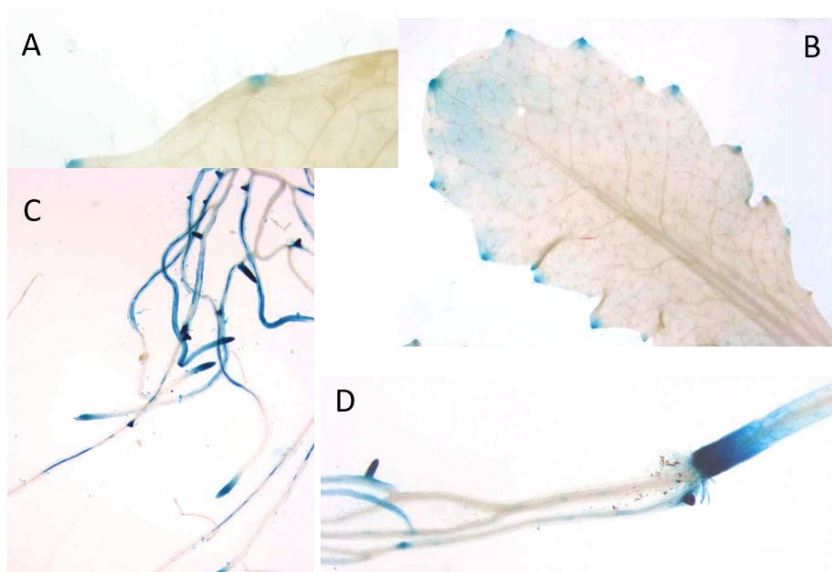


Abbildung 34: GUS-Expression Wurzelspitzen und Hydathoden

A & B: Beispielhafte Aufnahmen GUS-exprimierender Hydathoden **C & D:** Beispielhafte Aufnahmen GUS-exprimierender Wurzelspitzen

Qualitativ sind keine Unterschiede zwischen den Linien mit dem kompletten putativen Promotor (p877) und dem kürzeren Promotorfragment (p587) erkennbar.

Insgesamt können zwei verschiedene Expressionstypen beobachtet werden. Typ 1 zeigt Expression in den Blattprimordien, echten Blättern, Wurzelspitzen und Teilen der Blüte, während Typ 2 keine Expression in den entsprechenden Geweben zeigt. Linie p887-5 stellt einen

intermediären Phänotyp. Die Keimblätter und ebenso Blattprimordien zeigen in allen fünf Linien das gleiche Genexpressionsmuster (**Abbildungen 28, 29 und 35**). Der untere Teil des Blattstiels zeigt ebenfalls in allen Linien Genexpression. Eine Abweichung zeigt sich allerdings bei den 6 Wochen alten Pflanzen (**Abbildung 32**). Hier zeigen Linie p584-18 und Linie p887-2 keine Expression in diesem Bereich. Für die 8 Wochen alten Pflanzen kann dahingehend keine Aussage gemacht werden, da nur Blüten und Schoten untersucht wurden.

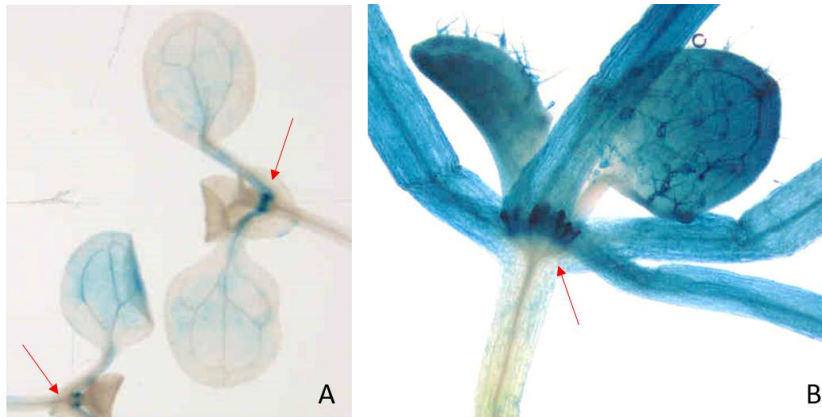


Abbildung 35: GUS-Expression in meristematischen Geweben

A: Pflanzen der Linie p887-5 nach 4 Stunden GUS-Färbung. **B:** Pflanze der Linie p587-19 nach 24 Stunden GUS-Färbung. Alle Pflanzen sind 12 Tage alt. Die Pfeile markieren Blattprimordien

3.3.3 Trockenstressinduzierte Aktivität des CpGRP1 Promotors in *A. thaliana* Promotor-GUS-Linien

3.3.3.1 Qualitativer GUS-Assay

Da bekannt ist, dass die Expression von CpGRP1 in *C. plantagineum* durch Trockenstress induziert wird, wurde getestet, ob das Gen in *A. thaliana* ebenfalls durch Trockenstress induzierbar ist. Dazu wurden zunächst Blätter der transgenen *A. thaliana* Pflanzen von der Pflanze abgetrennt, für 8 Stunden luftgetrocknet und im Anschluss GUS-gefärbt. Als Kontrolle wurden frische, turgeszente Blätter verwendet. Die Pflanzen waren 4 Wochen alt.

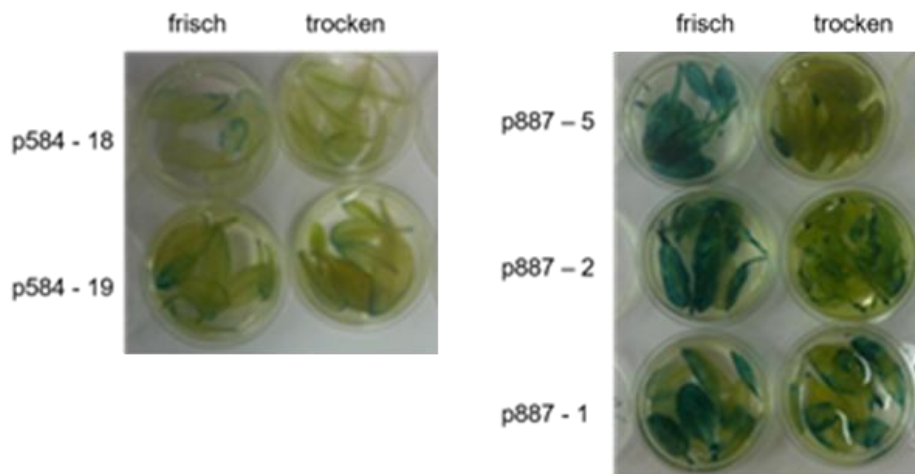


Abbildung 36: *A. thaliana* Promotor-GUS Linien, Trockenstress, auf Erde gewachsen, 4 Stunden GUS-Färbung

Wie in **Abbildung 36** zu sehen, zeigen die ausgetrockneten Blätter eine deutlich reduzierte GUS-Aktivität. Die Expression des Gens nach Trockenstress verhält sich demnach genau andersherum als in *C. plantagineum*. Zur Überprüfung des Ergebnisses wurde der Versuch im Anschluss mit veränderten Versuchsbedingungen wiederholt. Diesmal wurden ganze Pflanzen in Erde ausgetrocknet, indem das Wässern eingestellt wurde. Der Austrocknungsprozess dauerte 12 Tage bis ein für die *A. thaliana* Pflanzen tolerables Maß an Austrocknung überschritten wurde und die Pflanzen eingingen. Für jede ausgetrocknete Pflanze wurde eine Pflanze der gleichen Linie als gewässerte Kontrolle verwendet. Für jede Linie wurden drei Pflanzen verwendet. Die verwendeten Pflanzen waren zu Beginn des Versuchs 6 Wochen alt. Der Wassergehalt der Blätter wurde mit der Formel $(FG-TG)/TG$ bestimmt, wobei FG für Frischgewicht und TG für Trockengewicht steht. Auf eine Berechnung des relativen Wassergehalts $RWG = (FG-TG)/(TuG-TG)$, wobei TuG für Turgidgewicht steht) wurde verzichtet, da dieser für *A. thaliana* (anders als z.B. für *C. plantagineum*) nicht zuverlässig bestimmt werden kann. Für *A. thaliana* als trockenstresssensitive Spezies kann nicht unterschieden werden, ob die Blätter nach einer Wiederbewässerung noch vital sind und wieder turgeszent werden oder, ob die Blätter sich lediglich passiv mit Wasser vollsaugen.

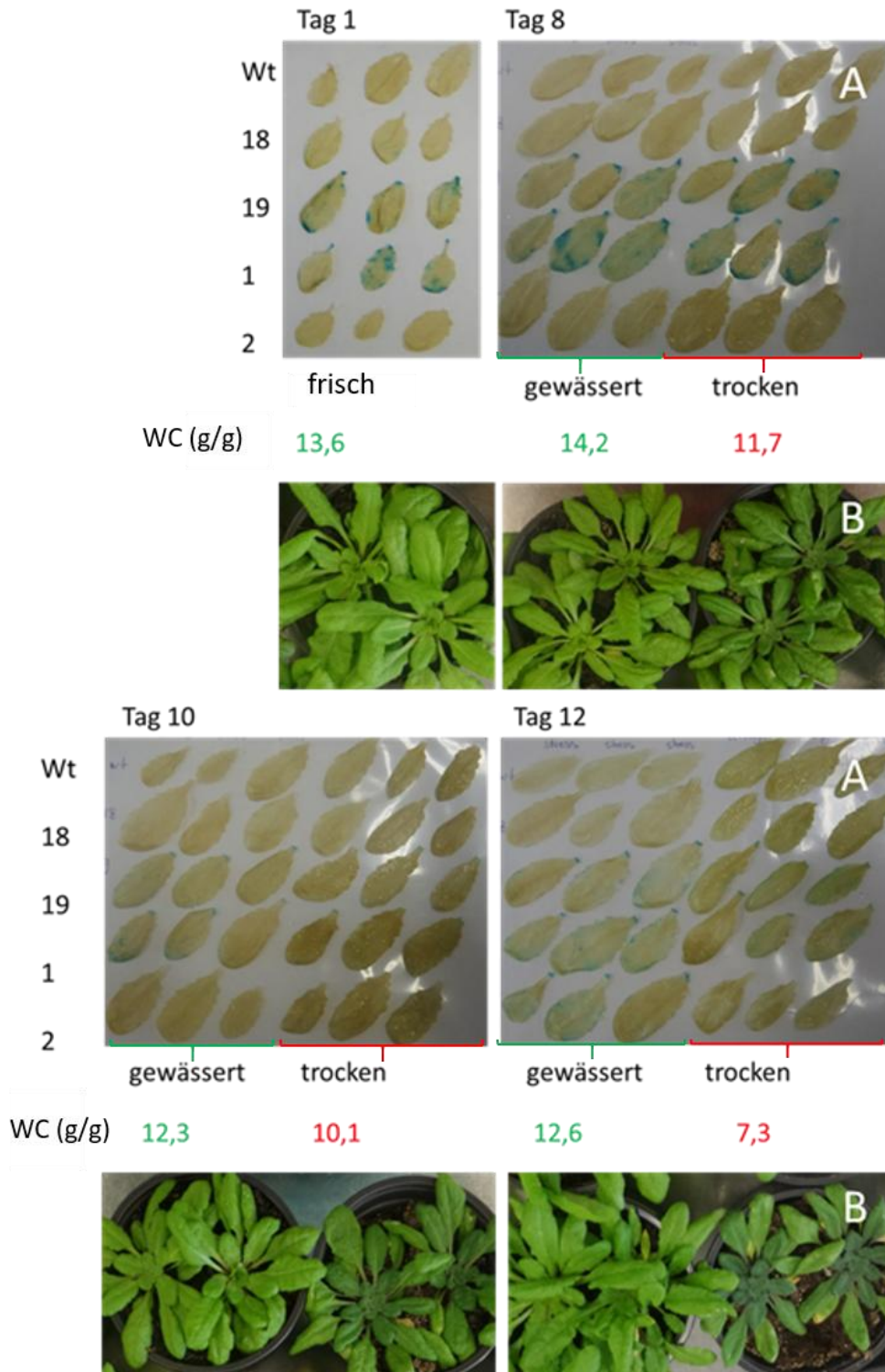


Abbildung 37: *A. thaliana* Promotor-GUS Linien, Trockenstress, auf Erde gewachsen, 4 Stunden GUS-Färbung

A: GUS-gefärbte Blätter der Linien p584-18, p584-19, p887-1, p887-2 und des Wildtyps an Tag 1, Tag 8, Tag 10 und Tag 12 des Versuchs. Für Tag 1 sind nur die Blätter dreier voll turgeszenter Pflanzen abgebildet. Für die übrigen Tage sind zunächst die Blätter dreier voll turgeszenter Pflanzen und rechts daneben die Blätter dreier trockengestresster Pflanzen abgebildet.

Unterhalb der Blätteraufnahmen steht der Wassergehalt (WC für water content = Wassergehalt, errechnet mit der Formel: $\frac{\text{Frischgewicht} - \text{Trockengewicht}}{\text{Trockengewicht}}$) der Versuchspflanzen. Der Wassergehalt der Kontrollpflanzen ist in grün dargestellt, der der ausgetrockneten Pflanzen in rot.

B Repräsentative Fotos der Versuchspflanzen

Wie in **Abbildung 37** zu sehen, zeigen erneut nur die Linien p584-19 und p887-1 Genexpression. Eine Ausnahme macht hier nur Linie p887-2 an Tag 12 – die Kontrollpflanzen zeigen hier GUS-Färbung an der Schnittstelle des Blattstiels. Im Folgenden werde ich daher nur auf die Unterschiede in der Genexpression den Linien p584-19 und p887-1 eingehen.

Die frischen Pflanzen und die Pflanzen an Tag 8 zeigen GUS-Expression in den Blättern und an den Schnittstellen der Blattstiele. Die Austrocknung der Pflanzen ist zu diesem Zeitpunkt moderat. Im Versuch sank der Wassergehalt der *A. thaliana* Blätter sank von 13,6 g/g zu Beginn des Versuchs auf 11,2 g/g. Im Vergleich mit den gewässerten Kontrollpflanzen mit einem Blattwassergehalt von 14,2 g/g ist mit dem bloßen Auge kein signifikanter Unterschied erkennbar. An Tag 10 und 12 der Austrocknung haben die Blätter der trockengestressten Pflanzen einen Wassergehalt von 10,1 g/g und 7,3 g/g im Vergleich zu den gewässerten Kontrollpflanzen mit einem Wassergehalt von 12,3 g/g und 12,6 g/g. Die nach 10 bzw. 12 Tagen genommenen Proben zeigen nur an den Schnittstellen der Blattstiele GUS-Expression - nicht aber im Blatt. Eine Induktion der Genexpression von CpGRP1 unter Kontrolle des nativen Promotors unter Trockenstress kann nicht gezeigt werden. Dies steht mit den Ergebnissen des vorherigen Experiments in Einklang.

3.3.3.2 Quantitative Messung der GUS-Aktivität nach Trockenstress

Da ähnliche Level an GUS-Expression visuell nicht zu unterscheiden sind, wurde zusätzlich ein quantitativer GUS-Assay durchgeführt. In diesem Versuch wird die Aktivität des Enzyms β -Glucuronidase gemessen (siehe **Abschnitt 2.31**).

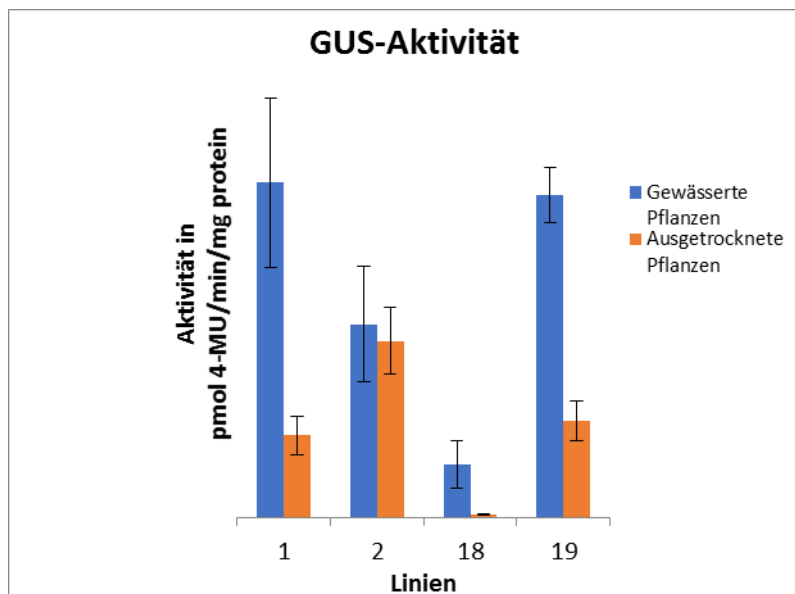


Abbildung 38: Quantitative Messung der GUS-Aktivität nach Trockenstress

Die GUS-Aktivität wurde im Diagramm als Mittelwert aus drei Messungen pro Linie und Austrocknungszustand angegeben. Für die Quantitative Messung wurden die Linien p887-1, p887-2, p584-18 und p584-19 verwendet.

Die Linien p887-1 und p584-19 zeigen im frischen Zustand eine deutlich höhere GUS-Aktivität als die Linien p887-2 und p584-18. Die GUS-Aktivität in allen Linien nimmt in Folge von Trockenstress ab, bei drei der vier Linien signifikant (**Abbildung 38**). Die durch die quantitative Messung erhaltenen Ergebnisse stimmen mit denen der qualitativen Auswertung überein. Linie p887-2 zeigt allerdings in diesem Versuch eine höhere GUS-Expression als Linie p584-18. Dieser Unterschied wurde zuvor durch die optische Beurteilung der GUS-Färbung nicht deutlich.

3.3.4 Expressionsmuster von CpGRP1 in *C. plantagineum* und der homologen Gene in *L. brevidens* und *L. subracemosa* und Beschaffenheit der Promotoren

Die Sequenzierungen des Transkriptom aus Blattmaterial der drei untersuchten Spezies – *C. plantagineum*, *L. brevidens* und *L. subracemosa* - in verschiedenen Stadien der Austrocknung, gibt Aufschluss über die Häufigkeit mit der ein bestimmtes Transkript in einem bestimmten Austrocknungsstadium vorkommt (Bartels, unveröffentlichte Daten). Einen Überblick über die Ergebnisse gibt **Abbildung 39**. Während die Transkriptmenge abgelesen vom CpGRP1 Gen in *C. plantagineum* im Verlauf der Austrocknung zunimmt und im voll ausgetrockneten Zustand ein Maximum erreicht, ist der Anstieg für das homologe Gen in *L. brevidens* sehr moderat. Die Transkriptmenge des homologen Gens in *L. subracemosa* nimmt sogar ab. Vergleicht man die Menge an vorhandenem Transkript nach der Wiederbewässerung sieht man, dass nur in *C. plantagineum* in diesem Zustand mehr Transkript vorhanden ist als im frischen Zustand. In *L. brevidens* ist weniger Transkript vorhanden als im frischen, gewässerten Zustand. Für *L. subracemosa* konnte keine Wiederbewässerung durchgeführt werden, da die trockenstresssensitive Spezies durch die Austrocknung eingeht.

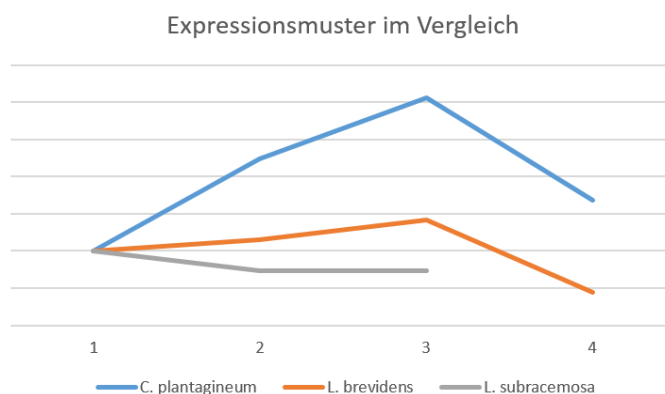


Abbildung 39: Expressionsmuster von CpGRP und homologen Genen

Die Zahlen eins bis vier stehen für die vier Stadien in denen Blattmaterial für die Transkriptomsequenzierung gesammelt wurde. 1 = Frisch 2 = Frühe Austrocknung 3 = Späte Aus-

trocknung 4 = Wiederbewässerung. Die Geraden veranschaulichen die Zu- bzw. Abnahme an Transkript in Relation zum Frischzustand. Blau = *C. plantagineum* Orange = *L. brevidens* Grau = *L. subracemosa*

Die durch Transkriptomsequenzierung erhaltenen Aussagen über das anzunehmende Expressionsmuster der drei Spezies im Verlauf der Trockenstressantwort wurden experimentell überprüft. **Abbildung 40** zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse. Die Zunahme der Transkriptmenge durch Trockenstress in *C. plantagineum* wurde durch RT-PCR, quantitative PCR und RNA-Blot bestätigt (von den Driesch, 2012) (Giarola 2015). In der Abbildung ist das Ergebnis des RNA-Blots für CpGRP1 (Giarola 2014) zu sehen (oben). Die Expression von *L. brevidens* und *L. subracemosa* wurde durch Reverse Transkriptase PCR untersucht (Mitte und unten, Adelman, 2015).

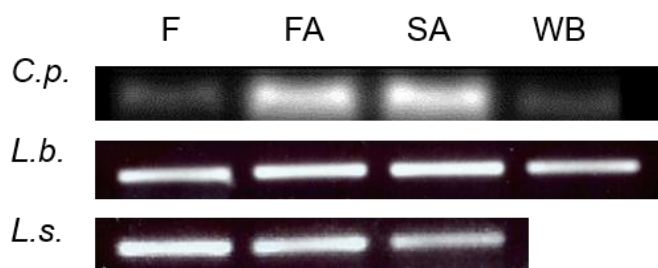


Abbildung 40: Expressionsmuster im Verlauf der Trockenstressantwort

Oben: Ergebnis des RNA-Blots für *C. plantagineum* (Giarola, V. et al. 2015) Mitte: Ergebnis der RT-PCR für *L. brevidens* (Adelman 2015, unveröffentlichte Daten) Unten: Ergebnis der RT-PCR für *L. subracemosa* (Adelman 2015, unveröffentlichte Daten) C.p. = *Craterostigma plantagineum* L.b. = *Lindernia brevidens* L.s. = *Lindernia subracemosa* F = frisch FA = frühe Austrocknung SA = späte Austrocknung WB = wiederbewässert

Wie **Abbildung 40** zeigt, stimmen die Ergebnisse der experimentellen Überprüfung mit den Ergebnissen der Sequenzierung des Transkriptoms überein. Für *C. plantagineum* ist ein deutlicher Anstieg der Transkriptmenge durch Trockenstress erkennbar. Bei *L. brevidens* ist der Anstieg der Transkriptmenge sehr moderat und schwer erkennbar. Allerdings ist hier – anders als bei *C. plantagineum* - bereits in der Probe von frischen, voll turgeszenten Pflanzen eine deutliche Bande erkennbar. Die RNA der Pflanze im wiederbewässerten Zustand produziert eine etwas schwächere Bande. Die Transkriptmenge hat abgenommen. In *L. subracemosa* ist in den unbehandelten Pflanzen ebenfalls in etwa gleich viel Transkript zu finden wie während der frühen Austrocknung. Während der späteren Austrocknung nimmt die Menge an Transkript ab.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Transkriptmenge in *C. plantagineum* deutlich durch Trockenstress beeinflusst wird. In *L. brevidens* ist nach **Abbildung 40** im frischen Zustand mehr Transkript vorhanden als in frischen *C. plantagineum* Pflanzen. Die Transkriptmenge nimmt aber durch Trockenstress nur gering zu. *L. subracemosa* hat ebenfalls möglicherweise im frischen Zustand mehr Transkript als frische *C. plantagineum* Pflanzen, die Transkriptmenge wird allerdings durch Trockenstress nicht positiv beeinflusst, sondern nimmt vielmehr ab.

Hier stellt sich die Frage, wie der Promotor von *C. plantagineum* im Gegensatz zu den Promotoren der homologen Gene in *L. brevidens* und *L. subracemosa* beschaffen ist, um eine trockenstressinduzierte Transkription des CpGRP1-Gens auslösen zu können.

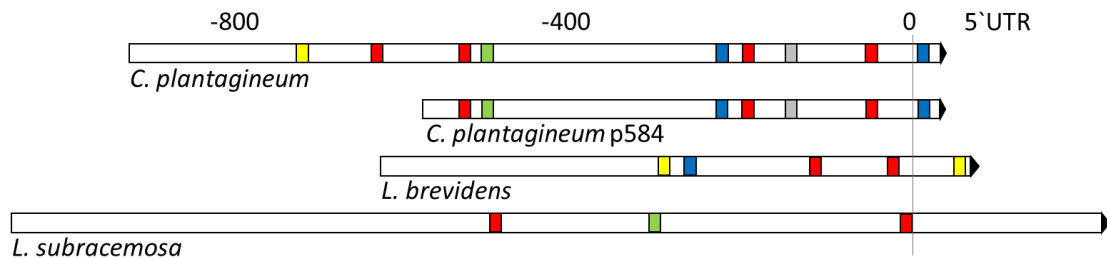


Abbildung 41: Vergleich der Promotoren von CpGRP1, LbGRP1 und LsGRP1

Die Abbildung zeigt die sequenzierten Bereiche stromaufwärts der kodierenden Region der homologen Gene CpGRP1, LbGRP1 und LsGRP1 und ausgewählte Promotorelemente. Zusätzlich ist das Promotorfragment p584 des *C. plantagineum* Promotors abgebildet. Dieses Fragment wird so bezeichnet, da es ohne UTR 584 Nucleotide lang ist. Die in den Promotoren gefundenen Promotorelemente sind farblich markiert. Rot = ABRE (ACGT), gelb = MYBCOR (CNGTTR), grün = DRE/CRT/CBF (RYCGAC), blau = DPBF (ACACNNG), grau = MYCCONSUSAT (YAACKG). Siehe hierzu auch **Abschnitt 3.3.1**. Die oberen drei Promotoren bzw. Promotorfragmente von *C. plantagineum* bzw. *L. brevidens* sind trockenstressinduzierbar, während der Promotor von *L. subracemosa* nicht trockenstressinduzierbar ist.

Zu diesem Zweck habe ich die Promotorsequenzen der Gene LbGRP1 und LsGRP1, die zu CpGRP1 homolog sind, durch Genome-Walking und anschließende Sequenzierung gewonnen. Das Ergebnis ist in **Abbildung 41** schematisch und in **Abbildung 42** mit der konkreten Nucleotidabfolge dargestellt. Auf den ersten Blick fällt auf, dass der aus *L. subracemosa* isolierte Promotor deutlich weniger cis-Elemente enthält, die mit einer Trockenstressinduzierbarkeit des Promotors in Verbindung gebracht werden, als die Promotoren von CpGRP1 und LbGRP1 (siehe **Abbildung 41**). Während der Promotorbereich von *C. plantagineum* zwischen -584 und dem Start der kodierenden Sequenz sieben dementsprechende Elemente enthält, hat der Promotor von *L. brevidens* im gleichen Bereich fünf Elemente und der von *L. subracemosa* nur drei. Vergleicht man die Dichte mit der allgemeine Promotorelemente - wie zum Beispiel verschiedene TATA- und CAT-Boxen - im Promotor vorhanden sind, schneidet der Promotor von *L. subracemosa* allerdings ebenfalls am schlechtesten ab. Während in den Promotoren von *C. plantagineum* und *L. brevidens* alle 42 bzw. 37 Nucleotide ein solches Promotorelement zu finden ist, liegt im Promotor von *L. subracemosa* nur alle 49 Nucleotide eine solches vor (Siehe **Abbildung 42** und **A.2.1** für Details zu verschiedenen CAT- und TATA-Boxen). Eine Liste aller in der Datenbank PLACE gefundenen cis-Elemente in den drei verglichenen Promotoren findet sich im Anhang (A.2.3).

C. plantagineum Promotor

```
Atttctgacatgacacatgtatataaaactttttcaattaggtattatgtgtagatgtcaaatggttttcccttgatttaattttttcttg  
atctcttaccatcatattctcaaaacaaaacaatttgatgcaagataaggggtctatgagctgttgagaatgctcaaaaatgtttatag  
ttgatgatgatgacacgcattgtgaaacctatgggaaaagctaaaacgtattaaaagccatagtagaaataagtagaaaagcggcatat  
aaaagtctagcatggaggtaacttaggacatgattaataatcgaatcaccaagatattaccgtacttctactaatgacaactgccc  
acattttttctgataaataagcactgctactgactcctccaatcattgcatattatgataaacataaactacggagtggaatatacggat  
ggcctacaaatggaagtaaatcatttctcaaccagcaaaaagccccatgcaagaaaataacatgtagagaggactcacaaatcctgtagg  
gacagttgactgttcgtacttctttattaccattacagatccgatcatatctccatctaggctaaagatattatagacacacgcacatat  
ataatattataaggcgggagcagtggaacttttttaattatataactcaatcatttaagacaaccaaggccaactaaacagagtagtagtggt  
attaagatcaatcgatcgatcatatcttcttttagcttctccgtctataaataggggcgaaacgcaggtcttttagttccacgcaaatctaa  
gtacaacaaaaacatcgaataaaacacacacattgtaagtg
```

L. brevidens Promotor

```
Atcatatatgatcaaaccctgtaagaaagctattccatgataagaacactcattttcgtatgaagaaggaaatcagcactaatgctaaa  
ctaaaacatgccagagactgcaaccacatgcaagacattaatgcatatctcattcatgacctatataataacgattatatacaaat  
aaataaaggatggccaagaagtaaatattcatttcttggaactcctatctataagtttggctccactcagttgattttttttcagct  
tcacaaacttttgtatggaacactatattagaacacaaatagaacagacatctcaccctcttattatcaaatatgttatataca  
tttcgactctcaacaagatagtaaagacgacatgtattaacataaatacgtatggagtgagtagactatataacagactgtgtcca  
ctcaacagccaacacactgccaataagatatcaatcatgtaactcttcttatcttagcttaataatcaagtcctctccatcataa  
agatagaaaatataatctcctaaactcacaacaaaacagttataaatg
```

L. Subracemosa Promotor

```
Caatataagtaaggcttgaaactgagaataaaaaacctgaaaactttatgaccaactttcacaatgttttagtactaatcctatgtaaaagct  
tctgtaataagttgttatgaagatttcgatgtttcgtattttctgtagagtaactcagtaatgctccccattacatagcacaacagatag  
tttaagcatatgataaaaaatataatgattatattctcaggactgagaacatggttcgaccatggagctcgggtgagaaggctctccatcctac  
gaagtttggctgatcgcgaagctttctgtaagttatcgactcgttctatgtatgttaacttcgacgagcggctagaccaaagtgtcgat  
tggatctttatcttctcctcataactgcatggaatgaactacgatactttccttaaggactgatgtaagaaaaaagcatttacaca  
gtgctctcatcagaatggttattcttacagttcattttctgatacaaaatgatataaaaaaacatgtaataaagttaattttccacaaataa  
gcgttagattattactgataaataaaaacatgtaagatcactccgagacatcttcggcctatgatagtgaaaggacaacctcatggca  
taatctcaatccatggcatttatactcgcgacataaaacggtgggcccgaagggaagtaaaaattaattctcatctgcatgcatgccc  
catgcaagtaaaaagtagacccatcaataaatccattgggacagtttgctgctgttttttttatttattacagtataatgattccatcca  
gaccatctcttgacgtgaagtatatatgtatagatataaataatggacgggggtggacttttttaattatatacactcattcatt  
aagacagtgctcagtcattatatactcacaacgcaactataaaacagtagtccgtattaatagaagatcgataatcatatcatatct  
tatctctgattctccatcataaatacagacagagaattgagttcttagcccacagcaaaaataagtaaaaaggtcgtctataatg
```

Abbildung 42: Die homologen Promotoren und ihre cis-Elemente

Von oben nach unten ist hier die Nukleotidsequenz der drei homologen Promotoren aus *C. plantagineum*, *L. brevidens* und *L. subracemosa* zu sehen. Die in den Promotoren gefundenen Promotorelemente sind farbig markiert. Rot = ABRE (ACGT), gelb = MYBCOR (CNGTTR), grün = DRE/CRT/CBF (RYCGAC), blau = DPBF (ACACNNG), dunkelgrau = MYCCONSUSAT (YAACKG). Elemente die allgemein oft in Promotorregionen gefunden werden, wie z.B. die TATA-Box sind hellgrau unterlegt. Die Unterstreichungen markieren die 5'-UTR.

Vergleicht man die Sequenzen der drei Promotoren untereinander paarweise, so ergibt sich keine besonders große Ähnlichkeit zwischen ihnen. Zur Bestimmung dieser Ähnlichkeiten wurde ein online verfügbares 'tool' genutzt, das für den Vergleich von Nukleotidsequenzen gedacht ist und den Needleman-Wunsche Algorithmus verwendet (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html). Während Promotor- und 5'-UTR-Sequenz der trockenstresstoleranten Arten *C. plantagineum* und *L. brevidens* zu 45 % übereinstimmen, ist die Ähnlichkeit der Promotoren zwischen *C. plantagineum* und der trockenstressesensitiven Spezies *L. subracemosa* mit 52 % sogar etwas größer. Die geringste Ähnlichkeit besteht zwischen den Promotoren von *L. brevidens* und *L. subracemosa*. Berücksichtigt man im Vergleich nur die Promotorregion ohne UTR entsteht das gleiche Bild (siehe **Tabelle 2**).

Tabelle 2: Ähnlichkeit der Promotoren untereinander

Durch ein vergleichendes Alignment der verschiedenen Promotorsequenzen können Ähnlichkeiten ermittelt und in % ausgedrückt werden kann (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html).

Ähnlichkeit mit UTR			Ähnlichkeit ohne UTR		
	Lb	Ls		Lb	Ls
Cp	45 %	52 %	Cp	42 %	47 %
Lb		38 %	Lb		38 %

Durch ein Alignment der Promotoren mit einem weiteren 'tool' (*promotorwise* - <http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/promoterwise/>) können die verglichenen Sequenzen auf mögliche vorhandene Promotorelemente untersucht werden. Das Programm gab im Ergebnis zahlreiche Abschnitte an, die zwischen beiden Promotoren identisch sind und möglicherweise Bindestellen für Transkriptionsfaktoren darstellen (**Abschnitt A.2.3**). Nach einem Vergleich der Sequenzen mit den in PLACE gespeicherten Einträgen zeigt sich aber, dass alle Sequenzen Stücke enthalten, die so auch in bereits beschriebenen cis-Elementen enthalten sind. Beispielhaft ist im Folgenden ein Teil des Ergebnisses der Analyse des Abschnitts -584 und -370 aus dem Promotor von CpGRP1 im Vergleich mit der Promotorsequenz des Gens LbGRP1 wiedergegeben. Der Abschnitt -584 bis -370 wurde gewählt, da er der Abschnitt ist, in dem mit größter Wahrscheinlichkeit bisher nicht beschriebene cis-Elemente liegen, die bei Trockenstress induzierend wirken (**Abschnitt 4.3.1**). Eines der potentiellen neuen Elemente in diesem Abschnitt hat die Sequenz (tattaagat). Gibt man diese in PLACE ein erhält man kein Ergebnis. Die Sequenzen tattaa und aagat hingegen ergeben jeweils mehrere Treffer. So wurde die Sequenz tattaa als Teil einer längeren Sequenz aus der Maispflanze gefunden, die für die Expression des mitochondrialen atp1-Gen Promotors essenziell ist (Rapp & Stern 1992). Weiterhin wurde die Sequenz in einer aus der Sojabohne und einer aus der Süßkartoffel isolierten Promotorsequenz gefunden. In der Sojabohne bindet die Sequenz einen für Wuzelknöllchen spezifischen Transkriptionsfaktor (Jensen et al. 1988). In der Süßkartoffel ist sie Teil einer TATA-Box in der Promotorregion des Sporamin-A-Gens (Ohta et al. 1991). Für die Sequenz aagat gibt es fünf Treffer. Zwei davon betreffen Vorgänge die spezifisch in Wurzelknöllchen von Sojabohnen (Vieweg et al. 2004) bzw. Sojabohnen, Ackerbohnen und Schneckenklee ablaufen (Stougaard et al. 1990). Der dritte Treffer bezieht sich auf den Promotor des hprA-Gens aus der Gurke und wird mit Cytokinin- und Lichtresponsivität in Verbindung gebracht (Jin et al. 1998). Die vierte Sequenzübereinstimmung ergibt sich mit einem GATA-Motiv aus dem Promotor, der die Phloem-spezifische Expression eines Reis-Virus vermittelt (Yin et al. 1997). Die fünfte Sequenzübereinstimmung findet sich im cab2-Gen Promotor aus *A. thaliana*. Es handelt sich erneut um ein GATA-Motiv, das in diesem Fall hoch konserviert ist und als I-Box bezeichnet wird. Die Funktion dieses Elements wird in Zusammen-

hang mit lichtinduzierter Expression und Regulation der circadianen Uhr gebracht (Anderson et al. 1994). Dieses stellt sich derart auch bei allen anderen untersuchten Abschnitten dar.

Query: 769 TAGTGGCGTATTAAGATCAATCGATC--G-ATCATATCTTTATCTTTTAG 814
 C TA TG C **TATTAAGAT** ATC ATC G A C TATCTTATCTT TAG
 Sbjct: 504 TACTGCCATATTAAGATATATCAATCATGTAACGTATCTTTATCTTATAG 552

Entry	Identifier	Accession number	Date (operation) author	Description	Keywords	Species	Sequence	Reference
Show	CONSERVED11NTZI	S000301	10-Feb-2000 (last modified) seki	Conserved 11 nt sequence found in the maize (Z.m.) mitochondrial atp1 promoter; Located between -5 and +6; Essential for the expression;	mitochondria; atp1;	maize (Zea mays)	ACGIATATAAAA	references
Show	ELEMENT1GMLBC3	S000319	7-Sep-2000 (last modified) seki	"Element 1" found in the promoter of soybean (G.m.) leghaemoglobin lbc3 gene; Binding site of nuclear extract from soybean nodules; Located at -223 to -246; Element 1 and Element 2 (S000320) bind to the same nodule specific factor; Element 1 and Element 2 share a common motif; See S000320;	nodule; leghaemoglobin; lbc3; root;	Soybean (Glycine max)	GATATATTAATATTTT	references
Show	TATABOX3	S000110	17-Jun-1997 (last modified) kehi	"TATA box"; TATA box found in the 5'upstream region of sweet potato sporamin A gene;	TATA; sporamin;	sweet potato (Ipomoea batatas);	TATTAAT	references

Entry	Identifier	Accession number	Date (operation) author	Description	Keywords	Species	Sequence	Reference
Show	CGF1ATCAB2	S000213	11-May-2006 (last modified) kehi	CGF-1 binding site in the Arabidopsis (A.t.) cab2 gene promoter; CGF-1=CAB GATA Factor 1; Found at -74 to -42; Contains a highly conserved, repeated GATA motif termed l-box (see S000124, S000199); For GATA motif, see S000039; The binding specificity of CGF-1 appears to be related to GT-family of DNA-binding proteins; For a compilation of related GT elements and factors, see Villain et al. (1996);	CGF; cab; cab2; CGF-1; GT; leaf; shoot;	Arabidopsis thaliana;	GATAAAGATTACTTCZ	references
Show	CYTOSITECSHPRA	S000261	14-Oct-1999 (last modified) kehi	13 bp sequence of unknown function found in cucumber (C.s.) hydroxypyruvate reductase (hprA) gene promoter; Protein binding site; Required for cytokinin responsiveness; See S000260 (AS1LIKECSHPRA) found in the same region; Also involved in light responsiveness; see also S000260;	cytokinin; as-1; light;	cucumber (Cucumis sativus)	AAGATTGATTGAG	references
Show	NODCON1GM	S000461	24-April-2005 (last modified) kehi	One of two putative nodulin consensus sequences; See also S000462 (NODCON2GM);	nodulin	Glycine max (soybean)	AAAGAT	references
Show	OSE1ROOTNODULE	S000467	24-April-2005 (last modified) kehi	One of the consensus sequence motifs of organ-specific elements (OSE) characteristic of the promoters activated in infarcted cells of root nodules; See	leghemoglobin; Lb29; root; nodule; arbuscule;	Vicia faba; Medicago truncatula; Chirona max;	AAAGAT	references

Show 15 Items Page 1 of 1 Displaying 1 to 5 of 5 items

Abbildung 43: Analyse putativer Promotorelemente mit PLACE

Die Abbildung zeigt das Ergebnis welches nach Eingabe der Sequenz tattaa bzw. aagat in die Abfrageleise der Datenbank PLACE (seit 2016 unter http://togodb.biosciencedbc.jp/togodb/view/place_main#en) ausgegeben wird. Zwar produziert die vollständige Sequenz (tattaagat) die zwischen dem Promotor von CpGRP1 und LbGRP1 konserviert ist kein Ergebnis, wohl aber diese beiden kleineren Teilstücke des konservierten Bereichs. Im Ergebnis angegeben werden Bezeichnung der Sequenz, numerische Bezeichnung der Sequenz in der Datenbank, Datum der letzten Änderung des Eintrags durch den Autor, Beschreibung, Schlüsselwörter, Spezies aus der die Sequenz stammt, die Sequenz selbst und Referenzen.

3.4 Erzeugung und Untersuchung von CpGRP1-Überexpressionslinien

Die Überexpression eines Gens in einer gut charakterisierten Modellpflanze wie *A. thaliana* kann dazu beitragen die Funktion des Gens zu verstehen. Zeigt die transgene Pflanze im Vergleich zum Wildtyp veränderte Eigenschaften so können diese mit dem eingebrachten Gen in Verbindung gebracht werden. Zu diesem Zweck wurde das Gen CpGRP1 unter der Kontrolle des CaMV35-Promotors in *A. thaliana* überexprimiert (Siehe **Abschnitt 2.3**). Die in der Folge erhobenen Daten beziehen sich auf Keimung, Durchmesser, Wuchshöhe, Anzahl von Verzweigungen, Blütezeitpunkt und Wurzellänge der transgenen Linien im Vergleich mit dem Wildtyp. Zudem wurden die Pflanzen mit Trockenstress behandelt und danach das Ionenleck (**Abschnitt 2.33**) und die Lipidperoxidation (**Abschnitt 2.34**) gemessen, um zu sehen ob die Überexpression von CpGRP1 in den transgenen Pflanzen zu einer Verbesserung der Trockentoleranz führt. Es wurden zwei Batches an Pflanzen angezogen. Batch B wurde einige Tage vor Batch C zur Anzucht ins Gewächshaus überführt. Während Batch B auf selektivem MS-Medium ausgesät wurde, wurde Batch C auf Erde ausgesät. Vor der Wachstumsphase im Gewächshaus wurden alle Pflanzen auf Erde überführt. Für jede transgene Linie (3, 4, 5, 6, A, C, D, F, G, I, (J), K, L) wurden je Batch 9 Pflanzen (drei pro Pflanztopf) angezogen.

Zu beachten ist weiter, dass nur Batch C die Linie J enthält, da die Keimlinge dieser Linie in Batch B die ersten Tage nicht überstanden hatten. **Abbildung 44** zeigt Batch B der Pflanzen an den Tagen 1, 8 und 17. Die Arbeiten an den Überexpressionslinien sind in Kooperation mit der Masterstudentin C. Lanzrath durchgeführt worden. Von B. Kampmann durchgeführt: Herstellung der Überexpressionslinien und Gewinnung der Samen. Von C. Lanzrath durchgeführt: Proteingele und Proteinblots sowie Lipidperoxidationstest. Die anderen Arbeiten sind gemeinsam durchgeführt worden.

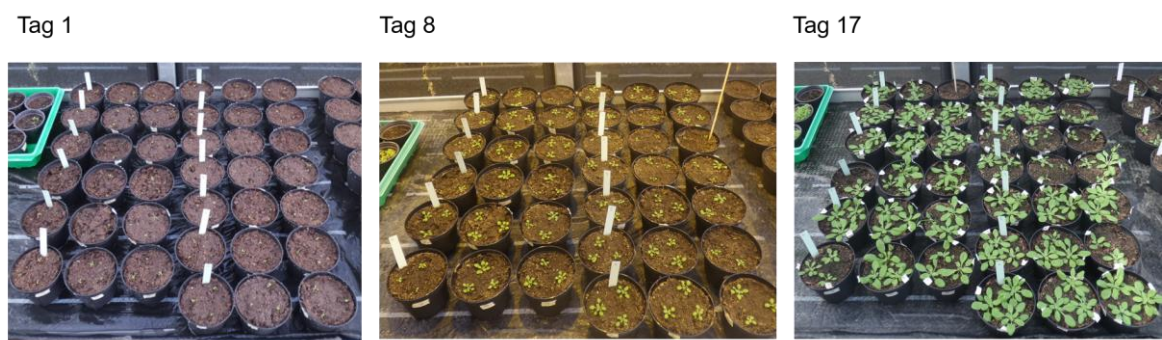


Abbildung 44: Die Versuchspflanzen, Set B

Die Fotos zeigen jeweils 9 Pflanzen der F2-Generation jeder Linie (3, 4, 5, 6, A, C, D, F, G, I, J, K, L). Es wurden zwei Sätze an Pflanzen verwendet (B für Barbara und C für Cathrin) die etwas zeitversetzt ausgesät wurden. Die Fotos zeigen die Entwicklung der Pflanzen beispielhaft für die Tage 1, 8 und 17.

3.4.1 Genotypisierung

Bevor die putativ transgenen *A. thaliana* Pflanzen zur Datengewinnung und für Experimente genutzt wurden, wurde für jede einzelne Pflanze eine Genotypisierungs-PCR durchgeführt,

um sicherzustellen, dass eine Insertion des CpGRP1 Gens vorliegt. Ebenso wurde sichergestellt, dass in den Wildtyppflanzen kein Insert vorhanden ist. Siehe dazu **Abbildung 45**. Das Vorhandensein einer Bande bedeutet, dass das Insert durch die PCR nachgewiesen werden konnte.

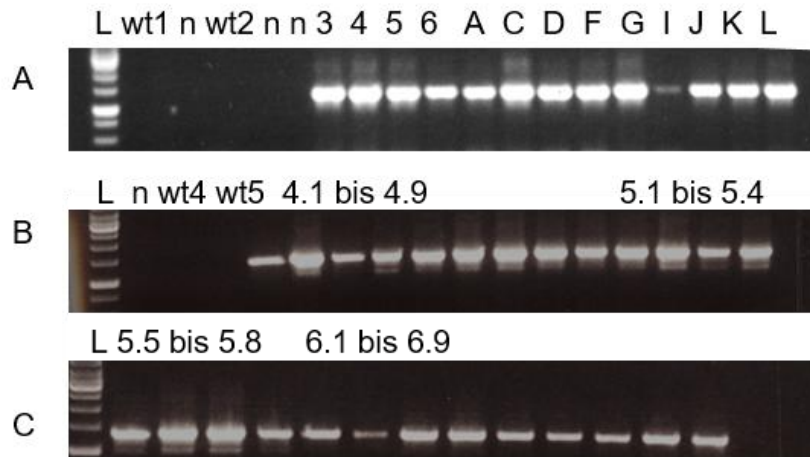


Abbildung 45: Genotypisierungs PCR

Beispielbilder zu den durchgeführten Genotypisierungs-PCRs. Reihe A zeigt ein PCR-Ergebnis für drei Negativkontrollen (n) zwei Wildtyppflanzen (wt1 und wt2) und 13 unabhängigen Linien der F1-Generation (3, 4, 5, 6, A, C, D, F, G, I, J, K und L). Die Reihen B und C zeigen einen kleinen Teil der PCR-Ergebnisse die bei der Genotypisierung der Pflanzen der F2-Generation entstanden sind. Hier sind Testergebnisse für 2 Wildtyplinien (wt4 und wt5) und für Pflanzen der Linien 4, 5 und 6 zu sehen (alle positiv). Getestet wurde auf Insertion des Cp-GRP1 Gens. Keine Bande bedeutet, dass durch die PCR keine Insertion von CpGRP1 nachgewiesen werden konnte (wt1, wt2, wt4, wt5 und Negativkontrollen).

Wie **Abbildung 45** beispielhaft zeigt sind die verwendeten Linien positiv für eine Insertion von CpGRP1. Die zuvor getesteten Linien 1, 2, B, E und H waren negativ und wurden im Experiment nicht verwendet.

3.4.2 Keimung

Zur Keimung wurden die transgenen Samen auf feuchter Erde ausgesät und in die Kurztags-Klimakammer gestellt. Wie die Übersicht in **Abbildung 46** verdeutlicht keimt die Mehrheit aller Pflanzen bis Tag 3. Nur die Pflanzen der Linien J und K brauchten 3 respektive 4 Tage bis zur Keimung, während die Pflanzen der Linie F bereits an Tag 2 keimten.

Linie	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
wt	nein	nein	nein	ja	ja	ja
A	nein	nein	nein	ja	ja	ja
C	nein	nein	nein	ja	ja	ja
D	nein	nein	nein	ja	ja	ja
F	nein	nein	ja	ja	ja	ja
G	nein	nein	nein	ja	ja	ja
I	nein	nein	nein	ja	ja	ja
J	nein	nein	nein	nein	ja	ja
K	nein	nein	nein	nein	nein	ja
L	nein	nein	nein	ja	ja	ja
3	nein	nein	nein	ja	ja	ja
4	nein	nein	nein	ja	ja	ja
5	nein	nein	nein	ja	ja	ja
6	nein	nein	nein	ja	ja	ja

Abbildung 46: Keimung Überexpressionslinien

Übersicht der Keimungszeitpunkte für wt und transgene Linien. Der Wildtyp und die Mehrheit aller transgenen Linien ist an Tag drei nach der Aussaat auf Erde gekeimt, während Linie F schon an Tag 2 gekeimt war und Linie J und K bis Tag 3 bzw. 4 brauchten.

3.4.3 Durchmesser, Wuchshöhe und Verzweigungszahl

Betrachtet man Durchmesser, Wuchshöhe und Verzweigungszahl der Pflanzen in Batch B zeigt sich, dass 5 Linien (A, C, F, 4 und 6) an beiden Messzeitpunkten einen signifikant größeren Durchmesser erreichen als der Wildtyp. Linie K hat am 9 Mai Pflanzen mit einem signifikant größerem Durchmesser als der Wildtyp, dies ist am 12 Mai aber nicht mehr der Fall. Was die Wuchshöhe angeht zeigt lediglich Linie L an ersten Messzeitpunkt eine signifikant geringere Wuchshöhe als der Wildtyp. Insgesamt ist die Standardabweichung groß. Betrachtet man die Anzahl an Verzweigungen zeigen Linie C und Linie 4 am 12 Mai eine signifikant größere Zahl an Verzweigungen als der Wildtyp. Auch was die Zahl der Verzweigungen angeht ist die Standardabweichung groß.

Betrachtet man Durchmesser, Wuchshöhe und Verzweigungszahl der Pflanzen in Batch C so ergeben sich für Wuchshöhe und Verzweigungszahl signifikante Unterschiede zwischen den Wildtyppflanzen und den transgenen Pflanzen. Was die Wuchshöhe angeht, zeigt Linie J eine in Relation zum Wildtyp signifikant reduzierte Wuchshöhe, und zusätzlich einen tendenziell geringeren Durchmesser, während viele der anderen transgenen Pflanzen ähnlich hoch wachsen wie der Wildtyp und tendenziell eine gleichgroße oder größere Blattrosette entwickeln. Neben Linie J fällt Linie F auf, da Pflanzen dieser Linie einen tendenziell niedrige Wuchshöhe zeigen, als der Wildtyp und zu Beginn des Wachstums (9 Mai) signifikant weniger Verzweigungen aufweisen. Auch die Pflanzen der Linie J zeigen zunächst eine signifikant geringere Anzahl an Verzweigungen. Bei beiden Linien relativiert sich dieser Unterschied zum Wildtyp jedoch im Fortschritt der pflanzlichen Entwicklung, so dass am letzten Tag der Messung (17 Mai) keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen den Linien bestehen, was die Verzweigungszahl betrifft.

Fast man die Ergebnisse beider Batches zusammen, so zeigt sich, dass die Mehrheit der transgenen Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp ähnlich gut oder besser entwickelt ist, während lediglich die Pflanzen der Linie J auffällig klein sind und langsam wachsen. Die Ergebnisse für

Linie F sind nicht schlüssig, da sich die Pflanzen dieser Linie in Batch B sehr gut entwickeln, während sie in Batch C eher schlechter entwickelt sind als die Mehrheit der anderen Pflanzen.



Abbildung 47: Batch B – Durchmesser, Wuchshöhe, Verzweigungen

Die Diagramme zeigen den Durchmesser, Wuchshöhe und die Zahl der Verzweigungen als Durchschnittswert aller Pflanzen einer Linie im Vergleich zum Wildtyp an zwei Zeitpunkten (9 Mai und 12 Mai) für Batch B. Signifikante Ergebnisse im Vergleich mit dem Wildtyp sind mit einem Stern markiert.

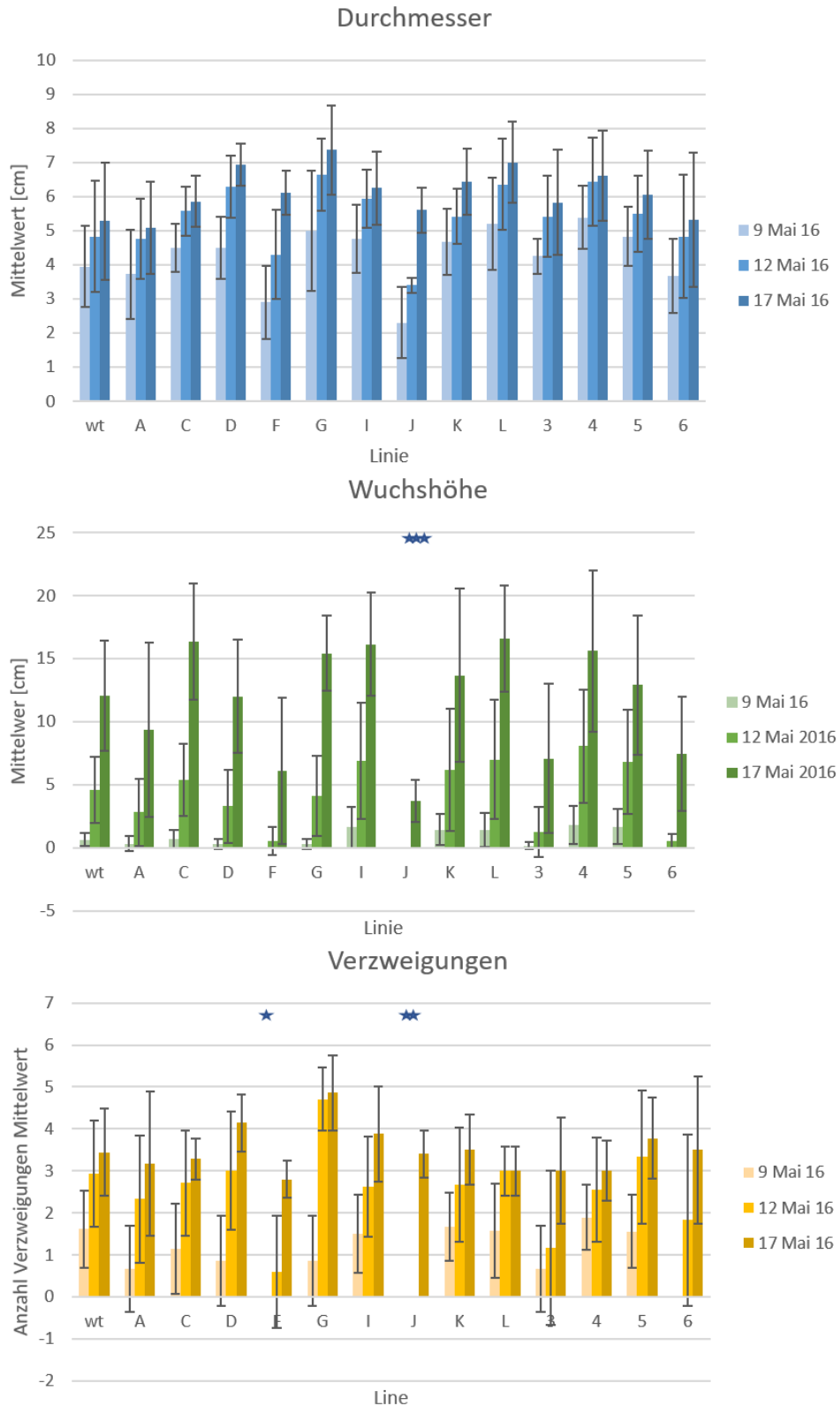


Abbildung 48: Durchmesser, Wuchshöhe und Verzweigungen

Die Diagramme zeigen den Durchmesser der Blattrosette, die Wuchshöhe der Pflanzen und die Anzahl der Verzweigungen pro Pflanze als Durchschnittswert aller Pflanzen einer Linie im Vergleich zum Wildtyp an drei Zeitpunkten (9. Mai, 12. Mai und 17. Mai) für Batch C. Signifikante Ergebnisse im Vergleich mit dem Wildtyp sind mit einem Stern markiert.

3.4.4 Blütenstand, Blütenbildung

Betrachtet man die Entwicklung von Entwicklung von Knospen und Blüten bei den Pflanzen aus Batch B (**Abbildung 49**), so zeigt der Wildtyp am ersten Tag der Beobachtung 80 % Pflanzen mit Knospen und 40 % Pflanzen mit Blüten. Nur die Pflanzen der Linie K zeigen sich an diesem Tag ähnlich weit in Ihrer Entwicklung. Zwar tragen nur rund 55 % der Pflanzen Knospen, dafür haben aber schon über 40 % der Pflanzen Blüten gebildet. Alle anderen Linien weisen einen geringeren Anteil blühender Pflanzen auf. Drei Tage später tragen alle Pflanzen der Linien wt, A, F, G, I, K, 3, 4, 5 und 6 Blüten. Linie C hat rund 85 % blühende Pflanzen, Linie D rund 70 % und Linie L knapp über 60 %. Beachtet man auch die Menge an vorhandenen Pflanzen mit Knospen so sind die Linien A, C, K, 5 und 6 am 12 Mai auf einem ähnlichen Entwicklungsstand der Blüte wie der Wildtyp.

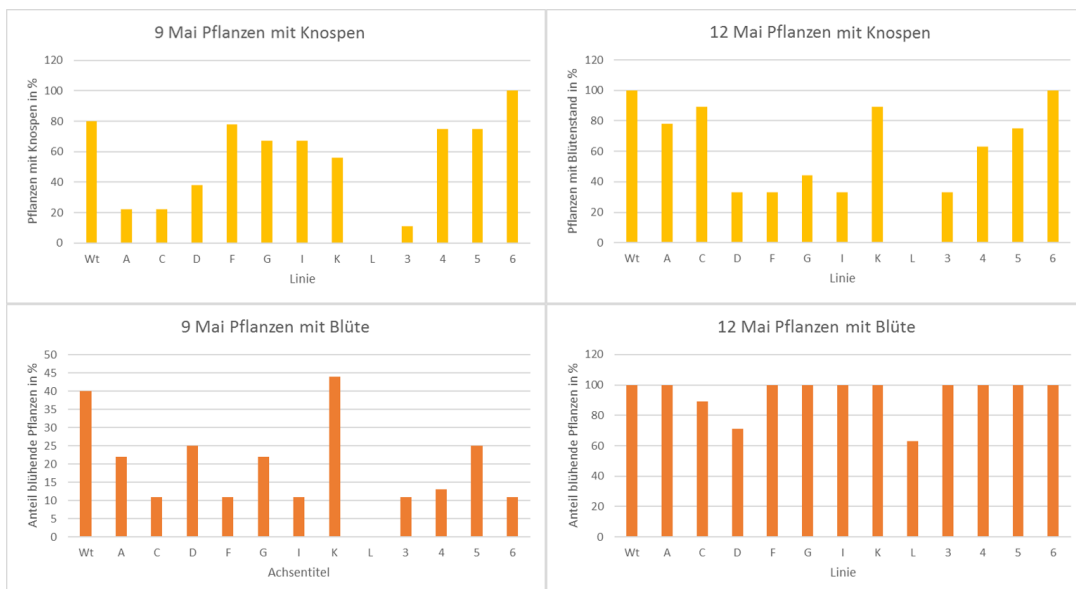


Abbildung 49: Blütenbildung Batch B

Die Diagramme zeigen den prozentualen Anteil an Pflanzen mit Knospen (gelb) bzw. Blüten (rot) an zwei Zeitpunkten (9. Mai und 12. Mai) für jede Linie.

Betrachtet man Batch C (**Abbildung 50**) so zeigt Linie 4 am ersten Tag der Beobachtung eine etwas schnellere Entwicklung der Blüte als der Wildtyp. Während für den Wildtyp etwas 78 % der Pflanzen Knospen, aber keine der Pflanzen Blüten tragen, zeigt Linie 4 in ebenfalls 78 % der Pflanzen Knospen und in 10 % der Pflanzen schon Blüten. Die Linien I, K, L und 5 zeigen an diesem Tag eine Entwicklung die der des Wildtyps ähnlich ist, während die übrigen Linien (A, C, D, G und 3) weniger oder im Fall von F, J und 6 keine Knospen zeigen. Drei Tage später haben sich der Wildtyp und Linie 4 und 5 in ihrer Entwicklung angeglichen, während Linie C und I einen größeren Anteil an blühenden Pflanzen ausweisen. Die übrigen Linien haben einen geringeren Anteil an blühenden Pflanzen oder weisen im Fall der Linien D, F, J, K, 3

und 6 noch keinerlei Blüten auf. Weitere 5 Tage später blühend alle Pflanzen des Wildtyps und der Linien A, C, D, G und L. Die übrigen Pflanzen blühen zu rund 78 % oder mehr, mit Ausnahme von Linie J die zwar an allen Pflanzen Knospen, jedoch noch keinerlei Blüten entwickelt hat.

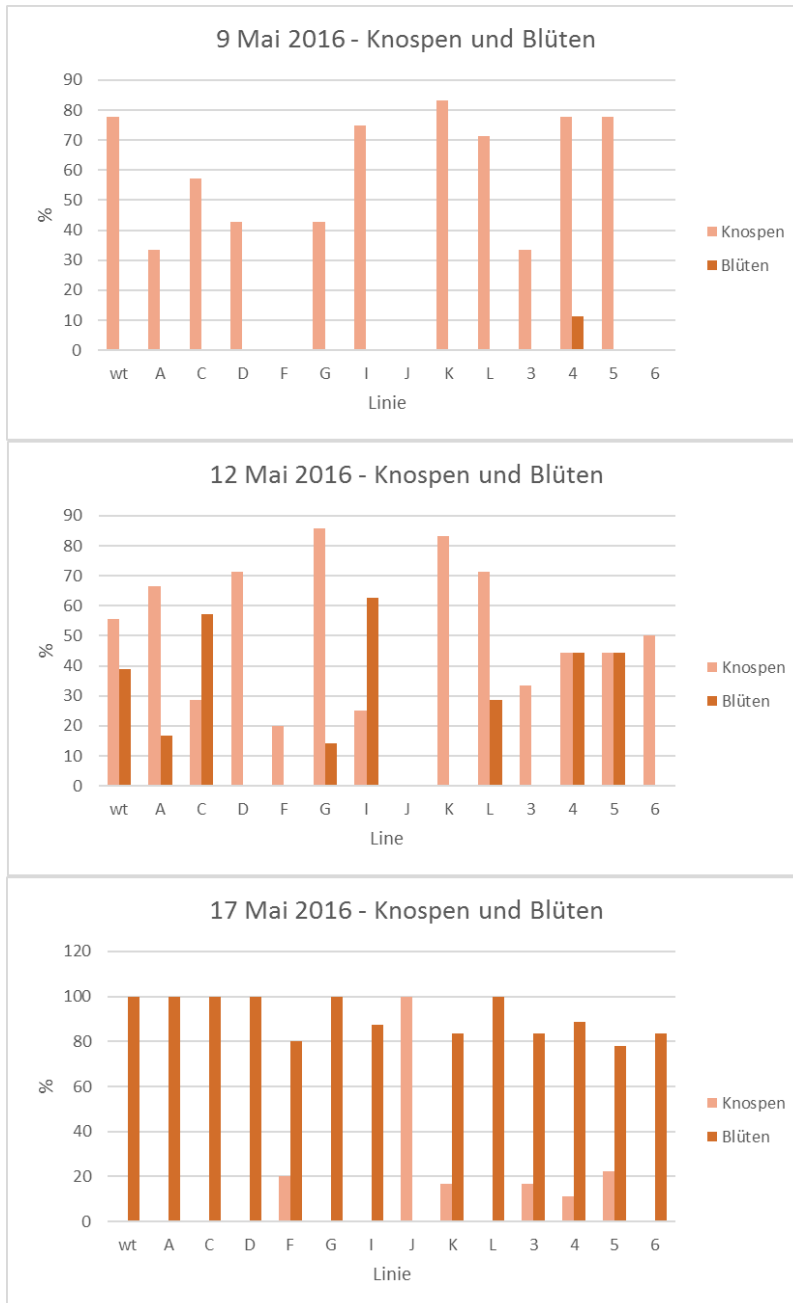


Abbildung 50: Blütenbildung Batch C

Von oben nach unten wird der prozentuale Anteil an Pflanzen mit Knospen (pink) und Blüten (rot) an drei Zeitpunkten (9 Mai, 12 Mai, 17 Mai) für jede Überexpressionslinie und den Wildtyp dargestellt.

Betrachtet man die Diagramme (**Abbildung 49 und 50**) im Überblick, so scheinen einige der transgenen Linien etwas langsamer in der Entwicklung der Infloreszenz, es ist aber für die Mehrheit der Linien kein klarer Trend erkennbar. Lediglich Linie 3 und Linie J zeigen durchge-

hend eine verzögerte Knospen- und Blütenbildung, wobei dieser Phänotyp bei den Pflanzen der Linie J sehr viel ausgeprägter ist.

3.4.5 Wurzellänge

Um die Wurzelarchitektur der *A. thaliana* Pflanzen gut betrachten und vermessen zu können wurden die Pflanzen auf MS-Platten angezogen die aufrecht aufgestellt wurden. Nach 14 Tagen wurde die Länge der Wurzeln gemessen. Wie man auf **Abbildung 51** sieht zeigen sich Unterschiede in der Wurzellänge und in der Gestalt der Wurzel, so sind die Wurzeln von Linie F und Linie 6 zum Beispiel deutlich länger als die von Linie J oder auch die der Wildtyp-Pflanzen. Auch fällt ins Auge, dass einige Linien Pflanzen mit deutlich verzweigteren Wurzeln haben als andere, so haben die Pflanzen des Wildtyps und der Linie J zum Beispiel deutlich verzweigtere Wurzeln als die Pflanzen der Linie G, F und 6.

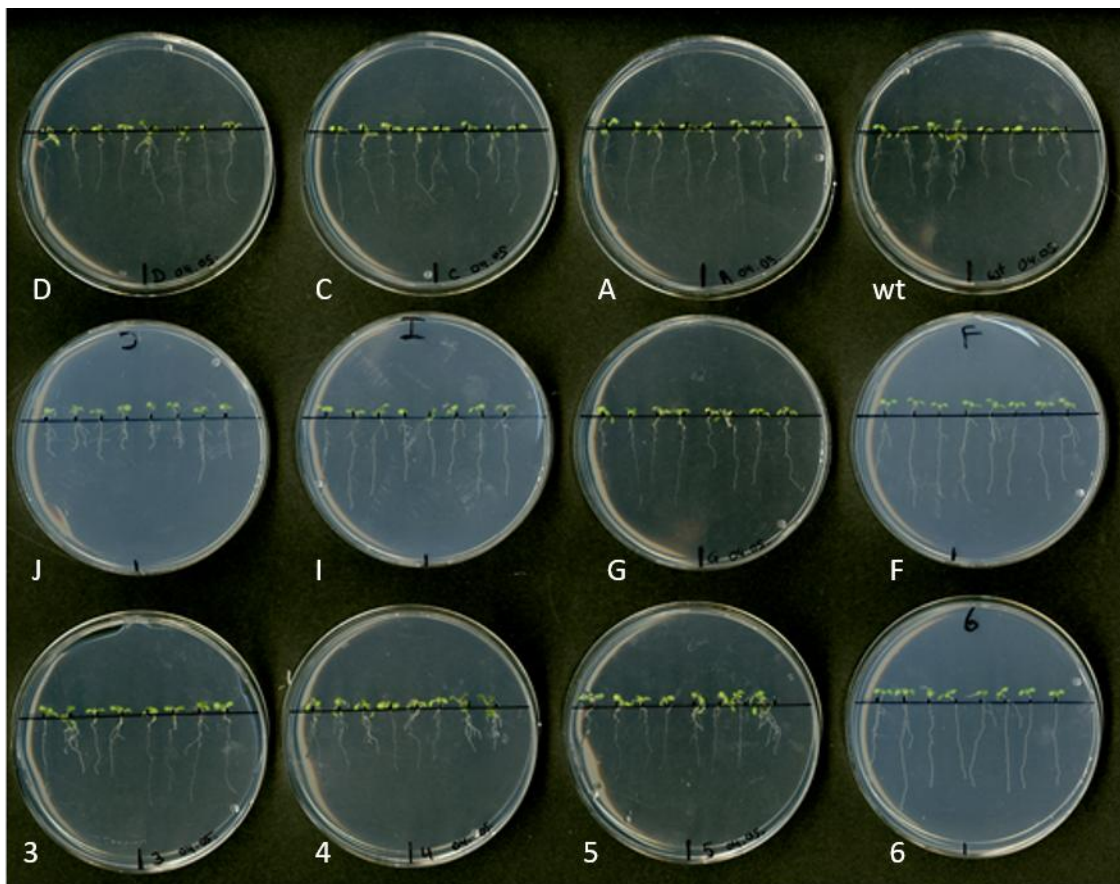


Abbildung 51: Wurzelarchitektur Überexpressionslinien

Pflanzen des *A. thaliana* Wildtyp und von 11 Überexpressionslinien 14 Tage lang angezogen auf MS-Agar.

Betrachtet man die Ergebnisse der Wurzelmessung statistisch so ergeben sich einige signifikante Ergebnisse (siehe **Abbildung 52**).

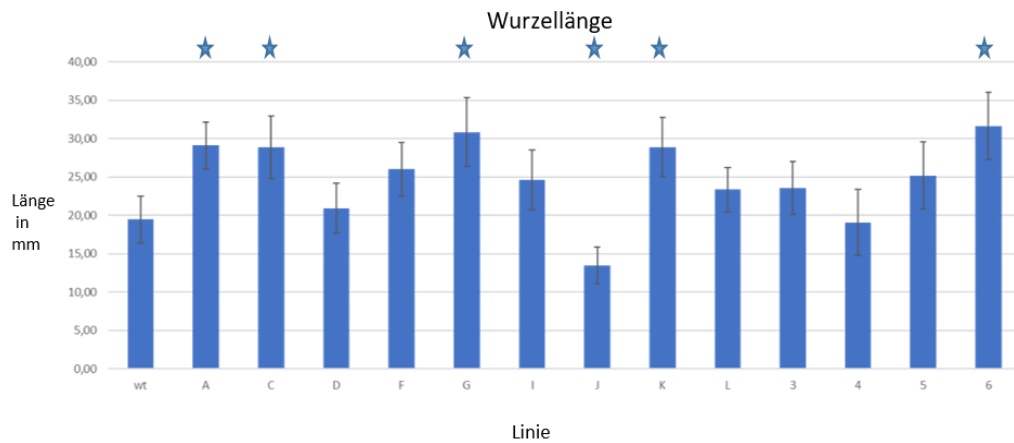


Abbildung 52: Wurzellänge Überexpressionslinien

Diese Abbildung zeigt die durchschnittliche Wurzellänge der *A. thaliana* Wildtyppflanzen und der CpGRP1-Überexpressionslinien in mm. Die Standardabweichung ist eingezeichnet. Signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern markiert.

Im Vergleich zum Wildtyp entwickeln die Pflanzen der Linien A, C, G, K und 6 eine signifikant längere Wurzel, während die Pflanzen der Linie J eine signifikant kürzere Wurzel ausbilden.

3.4.6 RNA-Quantifizierung

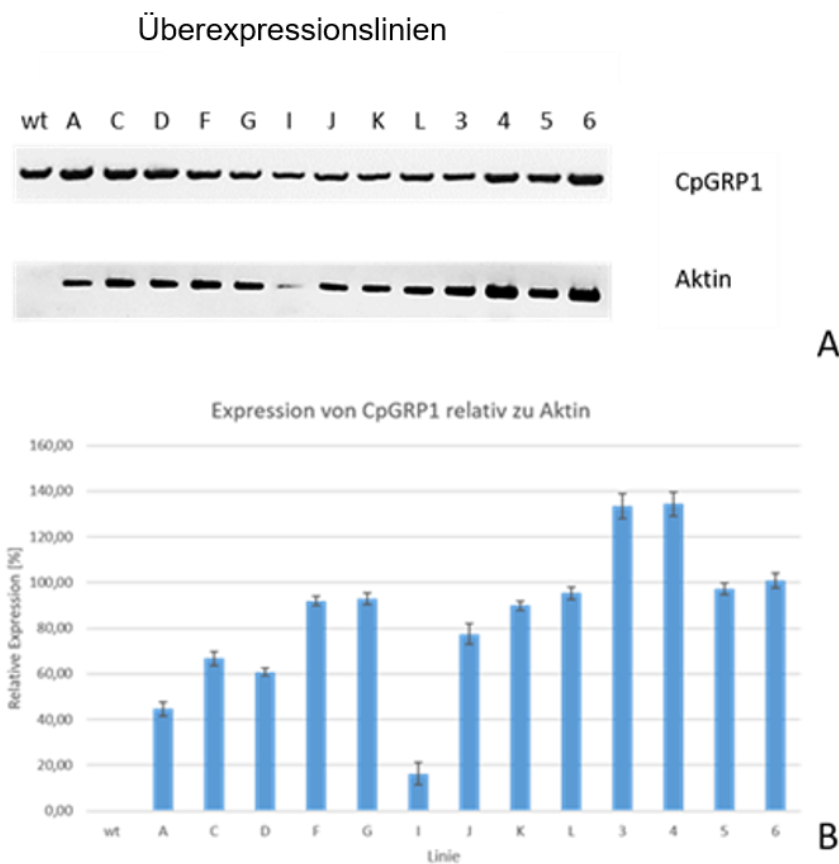


Abbildung 53: Expression von CpGRP1 in den Überexpressionslinien – RNA

A: Ergebnis der reversen Transkriptase PCR mit genspezifischen Primern und Primern für Aktin für jede Linie – Agarosegel

B: Expression des Gens CpGPR1 in Relation zur Expression von Aktin.

Um die Menge an expriemierter mRNA in den Überexpressionslinien zu bestimmen wurde durch reverse Transkription cDNA synthetisiert und davon eine PCR mit für das Housekeeping-Gen Aktin bzw. CpGRP1 spezifischen Primern durchgeführt. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 53** dargestellt. Während der Wildtyp wie erwartet keine Expression des Gens CpGRP1 zeigt, ist in allen Überexpressionslinien Transkript vorhanden. Die jeweilige Menge kann mit dem Programm ImageJ aus der Relation der Bandenstärke von CpGRP1 zu der Bandenstärke von Aktin ermittelt werden. Dies ist notwendig, da die Aktinbanden nicht alle die gleiche Intensität haben, was bedeutet, dass die Beladung mit cDNA nicht gleich war. Durch die Verwendung eines relativen Wertes wird dieser Fehler ausgeglichen. Es zeigt sich, dass die Linien 3 und 4 eine relativ große Menge an Transkript produzieren, die Linien F, G, J, K, L, 5 und 6 eine mittlere Menge und die Linien A, C, D und I eine eher geringe Menge, was besonders im Fall der Linie I auffällig ist.

3.4.7 Protein Quantifizierung

Auf ein erstes Testgel (**Abbildung 54**) wurde Gesamtprotein von je einer Pflanze von wt, Linie 3, Linie 4 Linie D, Linie F und Linie G geladen und mit dem Antikörper gegen CpGRP1 detektiert. Die experimentell ermittelte Laufhöhe von CpGRP1 liegt bei 28 kDA (persönliche Konversation S. Krey, A. Sergeva und V. Giarola). Dieses Molekulargewicht entspricht dem Gewicht auf dessen Höhe ein Dimer des CpGRP1-Proteins laufen würde. Dies ist die Form in der CpGRP1 normalerweise detektiert werden kann. Das monomere Protein hat ein *in silico* vorhergesagtes Molekulargewicht von 15,2 kDA. Für alle auf das Testgel geladenen Proben ergibt sich eine Bande auf der Höhe von etwa 60 kDA und eine Bande auf der Höhe von 28 kDA. Für die Pflanze der Linie D detektiert der Antikörper gegen CpGRP1 zudem eine Bande auf der Höhe von etwa 14 kDA. Die Banden auf der Höhe von etwa 60 kDA sind ein bekanntes Artefakt (persönliche Konversation A. Sergeva und V. Giarola) und finden sich auch in Immunoblots mit dem Prä-Immunsrum von CpGRP1 (siehe **Abbildung 57**). Die Banden auf der Höhe von 28 kDA wurden bisher immer dem Protein CpGRP1 zugeordnet (persönliche Konversation A. Sergeva und V. Giarola). Banden auf einer Höhe von etwa 14 kDA werden der monomere Form des Proteins CpGRP1 zugeordnet, können aber aus unbekanntem Gründen sehr selten detektiert werden. Eine Quantifizierung der Proteinmenge ist leider nicht gelungen.

CpGRP1 Antikörper 1:5000

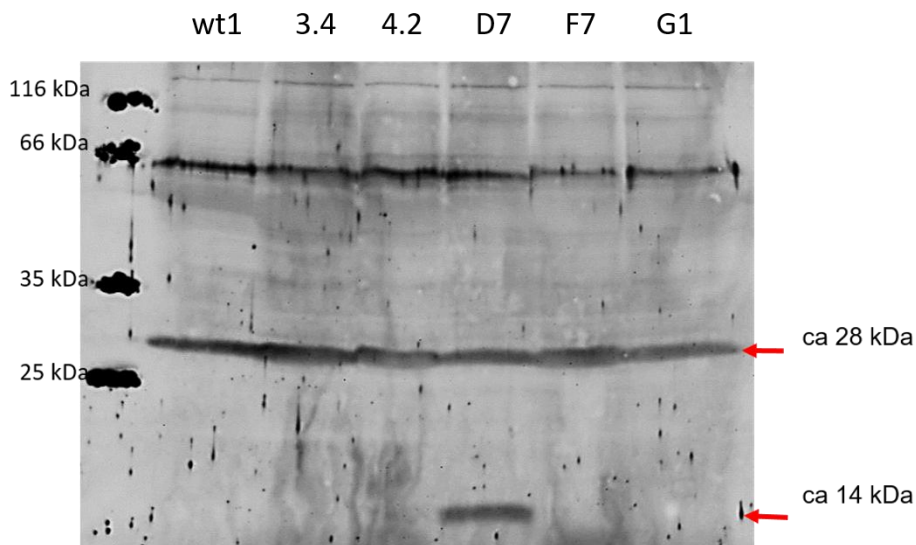


Abbildung 54: Immunodetektion des CpGRP1 Proteins

Detektion des CpGRP1 Proteins mit einem polyklonalen Antikörper. Für diesen Blot wurde das Gesamtprotein einer Wildtyppflanze (wt1) und exemplarisch das Gesamtprotein von fünf Überexpressionslinien (3,4,D,F,G) aufgetragen. Die Laufhöhe des monomeren Proteins CpGRP1 wird bei 14 kDa erwartet. Die üblicherweise beobachtete Laufhöhe liegt bei 28 kDa. Die Bande auf der Höhe von etwa 60 kDa ist ein bekanntes Artefakt.

Die Auswertung des Testgels ergab demnach, das CpGRP1 in allen Linien- den *A. thaliana* Wildtyp eingeschlossen – detektiert werden konnte. Da dieses Ergebnis unerwartet war, vermuteten wir eine Fehlbeladung, eine Verunreinigung der Proteinprobe des Wildtyps oder ein Überschwappen bzw. Diffusion der benachbarten Probe in die Laufbahn des Wildtyps. Um diese Hypothese zu testen wurde ein weiteres Gel zusätzlich zu der zuvor verwendeten Wildtypprobe und den Proben der Überexpressionslinien D, F und G mit Gesamtprotein einer zweiten Wildtyppflanze und Gesamtprotein extrahiert aus *L. brevidens* und *C. plantagineum* beladen, geblottet und wie zuvor immunodetektiert (**Abbildung 55**). Erneut zeigt sich eine Bande die CpGRP1 zuzuordnen ist in wt1 und Überexpressionslinien sowie zusätzlich in wt2 und *L. brevidens* sowie *C. plantagineum*. Der verwendete Antikörper detektiert offenbar die Isoformen zu CpGRP1 in *A. thaliana* und *L. brevidens*, wobei jede der drei Isoformen auf einer etwas anderen Höhe detektiert wird.

CpGRP1 Antikörper 1:5000

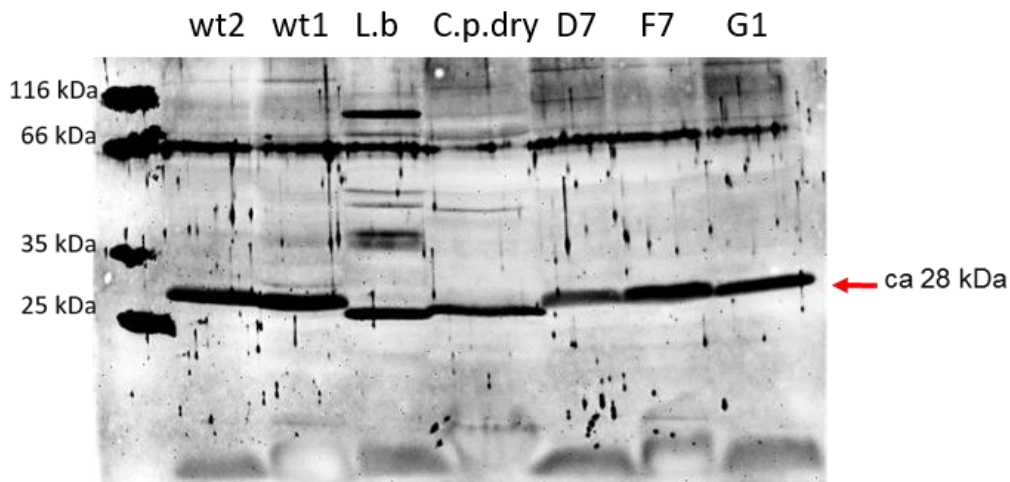


Abbildung 55: Immunodetektion *L.brevidens* und *C. plantagineum*

Für diese Immunodetektion mit dem polyklonalen Antikörper gegen CpGRP1 wurde neben dem zuvor verwendeten *A. thaliana* Wildtyp (wt1) ein weiterer Wildtyp (wt2) verwendet und ergänzend zu den drei Proben der CpGRP1-Überexpressionslinien (D, F, G) Gesamtprotein von *L. brevidens* und *C. plantagineum* aufgetragen. Die Laufhöhe von CpGRP1 liegt bei 28 kDa. Die Bande auf der Höhe von etwa 60 kDa ist ein bekanntes Artefakt.

Erneut zeigt sich eine Bande die CpGRP1 zuzuordnen ist in wt1 und Überexpressionslinien sowie zusätzlich in wt2 und *L. brevidens* sowie *C. plantagineum*. Der verwendete Antikörper detektiert offenbar die Isoformen zu CpGRP1 in *A. thaliana* und *L. brevidens*, wobei jede der drei Isoformen auf einer etwas anderen Höhe detektiert wird. Vor der Erzeugung von CpGRP1-Überexpressionslinien wurde der Antikörper nur für Proteinextrakte aus *C. plantagineum* verwendet und dies war nicht bekannt.

3.4.8 Ionen-Leck-Test

Da CpGRP1 sehr wahrscheinlich eines der Gene ist, die dazu beitragen die erfolgreiche Trockenstressantwort in *C. plantagineum* zu ermöglichen, wurden die *A. thaliana* -CpGRP1-Überexpressionslinien darauf hin getestet, ob sie Trockenstress besser tolerieren können als *A. thaliana*-Wildtyppflanzen. Zu diesem Zweck wurden Blattmaterial gut gewässerter und für 10 Tage ungewässerter Pflanzen für einen Ionen-Leck Test (siehe **Abschnitt 2.33**) und einen Lipid-Peroxidationstest (siehe **Abschnitt 2.34** und **Abschnitt 3.4.9**) verwendet. Die Messungen des relativen Wassergehalts (RWC, **Abschnitt 2.1**) (**Abbildung 56 A**) ergeben für die gut gewässerten Pflanzen einen relativen Wassergehalt von Durchschnittlich 86 % und für die ungewässerten Pflanzen einen relativen Wassergehalt von Durchschnittlich von 48 %. Misst man die Konduktivität im Medium das die Blätter umgibt so zeigt sich, dass alle mit Trockenstress behandelten Pflanzen eine höhere Konduktivität aufweisen (**Abbildung 56 B**). Dies ergibt sich durch die größere Menge an Ionen die durch trockenstressgeschädigte Zellmembranen in das umgebende Medium austreten können. Das Ausmaß der Konduktivität erlaubt

somit Rückschlüsse auf den Zustand des untersuchten pflanzlichen Gewebes. Während alle Pflanzen Schädigungen durch die Trockenstressbehandlung zeigen, sind diese zwischen den verschiedenen Linien unterschiedlich stark ausgeprägt (**Abbildung 56 C**). Sieben (A, C, F, J, L, 5 und 6) der CpGRP1-Überexpressionslinien zeigen eine signifikant schlechtere Konduktivität nach Trockenstress als die Wildtyppflanzen, ihr Gewebe hat die Austrocknung demnach deutlich besser überstanden. Die Pflanzen der Linien I und 4 schneiden im Gegenteil signifikant schlechter ab als die Wildtyppflanzen, während die verbleibenden fünf Linien keinen signifikanten Unterschied zeigen.

3.4.9 Lipid-Peroxidation

Für den Lipidperoxidationstest wurde Blattmaterial von *A. thaliana*-Wildtyp und Überexpressionslinien verwendet, die analog zu den Pflanzen die für den Ionenlecktest verwendet wurden gewässert bzw. ausgetrocknet wurde. Der durchschnittliche relative Wassergehalt dieser Pflanzen lag gewässert bei 87 % und nach der Trockenphase bei 58 % (**Abbildung 57 A**). Die im Test gemessenen MDA-Äquivalente geben Aufschluss über das Ausmaß der oxidativen Degradation von Lipiden. Diese Lipiddegradation wird in der pflanzlichen Zelle durch oxidativen Stress ausgelöst, der wiederum durch die Austrocknung entsteht. Die Pflanzen aller getesteten Linien zeigen nach der Trockenstressbehandlung ein größeres Ausmaß an Lipidperoxidation als im gut gewässerten Zustand (**Abbildung 57 B**). Eine signifikant geringere Lipidperoxidation im Vergleich zum Wildtyp ergibt sich für die Linien C, D, F, J, L und 6 während die Linien I, K und 3 signifikant schlechter abschneiden als der Wildtyp. Die Linien C, D, F, J, L und 6 überstehen Trockenstress demnach besser als der Wildtyp (**Abbildung 57 C**).

A	RWC	frisch	trocken
	Wt	89,47%	53,42%
	A	85,25%	58,94%
	C	89,89%	44,20%
	D	88,29%	43,78%
	F	81,14%	53,96%
	G	81,11%	44,26%
	I	91,16%	40,82%
	J	81,66%	47,78%
	K	85,51%	49,46%
	L	90,64%	41,10%
	3	86,41%	48,91%
	4	86,31%	44,58%
	5	83,24%	47,83%
	6	88,15%	53,39%

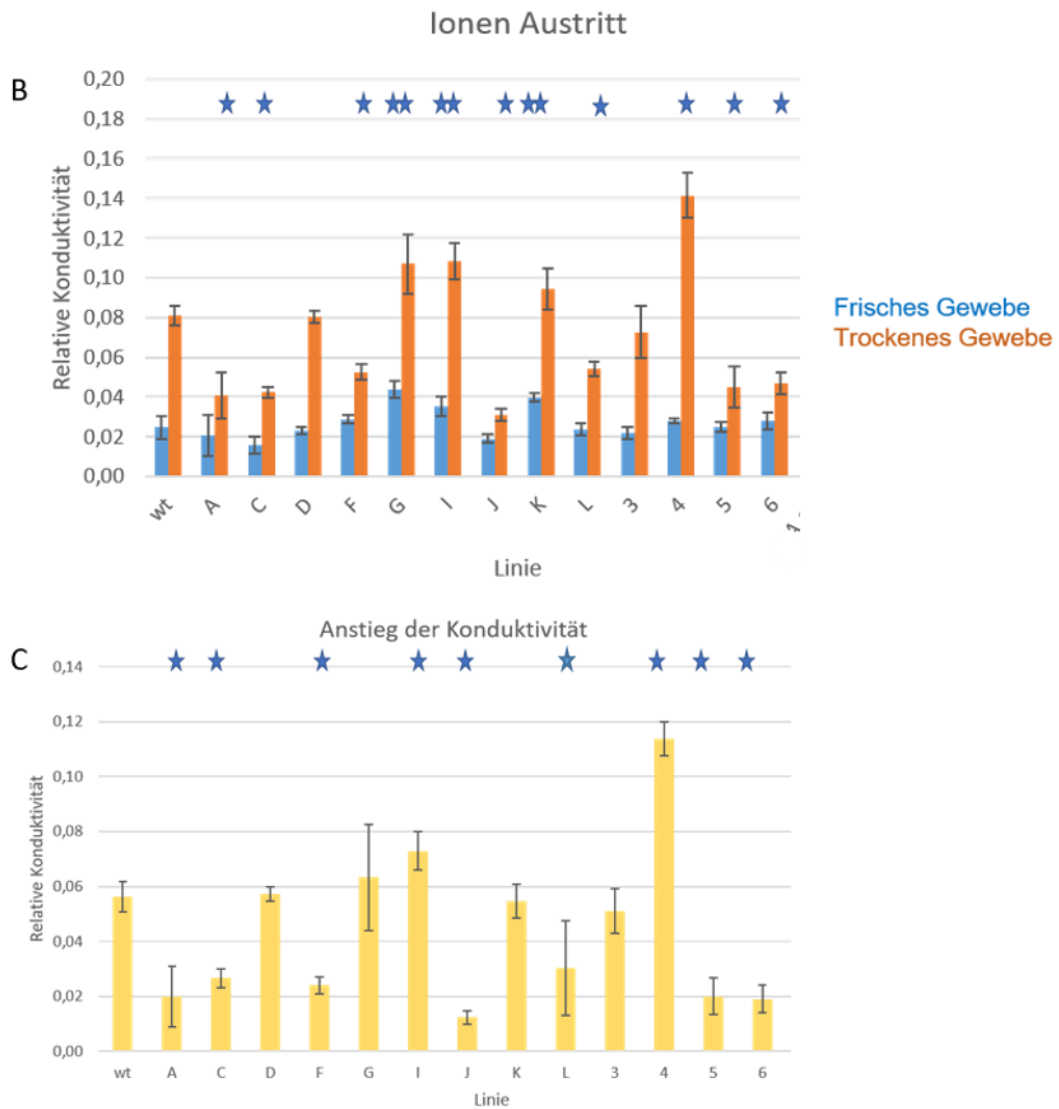


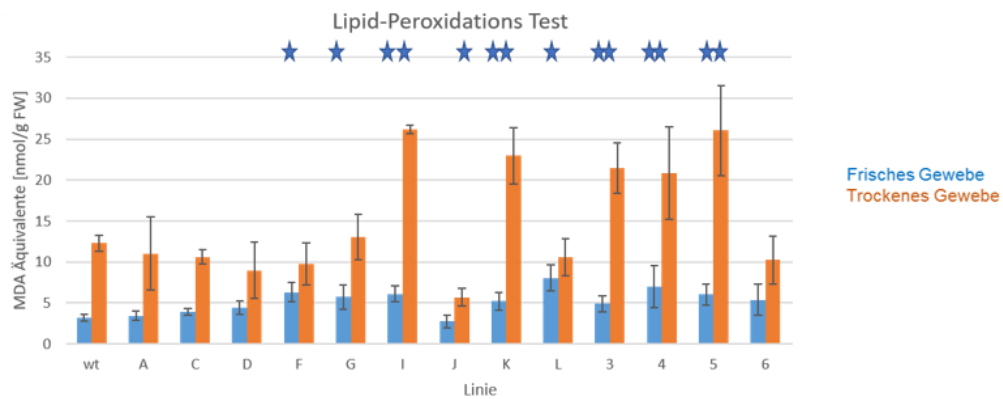
Abbildung 56: Ionenleck-Test

A: Relativer Wassergehalt der Versuchspflanzen frisch und trocken B: Relative Konduktivität des Blattgewebes im frischen und im trockenen Zustand. Signifikante Ergebnisse im Vergleich mit dem Wildtyp sind mit einem Stern markiert. C: Relativer Anstieg der Konduktivität im Vergleich mit dem Wildtyp. Signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern markiert.

A

RWC	frisch	trocken
wt	88,72%	63,67%
A	83,21%	64,02%
C	86,36%	67,18%
D	88,91%	64,84%
F	83,45%	55,08%
G	85,66%	63,03%
I	88,64%	51,01%
J	85,22%	43,26%
K	87,10%	54,37%
L	89,12%	46,12%
3	87,34%	56,25%
4	88,52%	55,76%
5	84,41%	55,30%
6	89,35%	62,23%

B



C

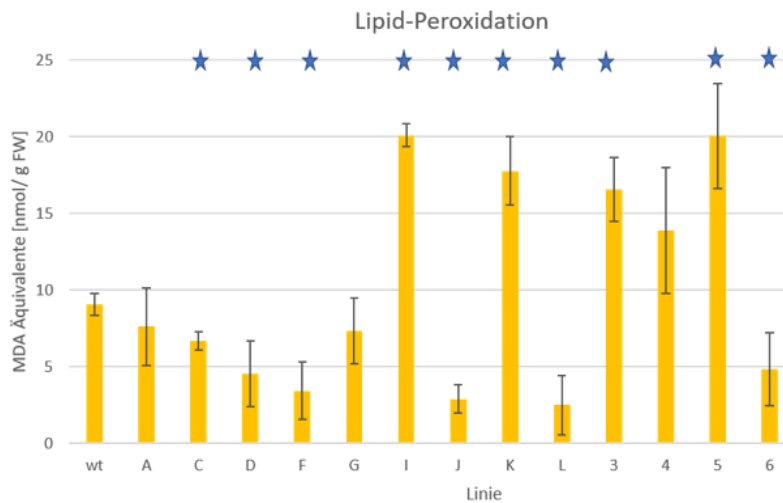


Abbildung 57: Lipid Peroxidation

A: Relativer Wassergehalt der Versuchspflanzen frisch und trocken B: Lipidperoxidation des Blattgewebes im frischen und im trockenen Zustand. Signifikante Ergebnisse im Vergleich mit dem Wildtyp sind mit einem Stern markiert. C. Anstieg der Lipidperoxidation im Vergleich mit dem Wildtyp. Signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern markiert.

3.4.10 Übersicht CpGRP1-Überexpressionslinien

Möchte man beurteilen, ob ein Gen potentiell dazu geeignet ist durch seine Überexpression in Nutzpflanzen deren Trockenstresstoleranz zu verbessern, müssen verschiedene Parameter berücksichtigt werden. Einerseits sollten die Pflanzen durch die Überexpression des artfremden Gens nicht in Wachstum und Entwicklung beeinträchtigt werden. Zum anderen sollte ein positiver Effekt auf die Trockenstresstoleranz in einer geeigneten Modellpflanze (wie z.B. *A. thaliana*) demonstriert worden sein. In Tabelle 3 sind im Hinblick darauf relevante Ergebnisse zusammengefasst.

Tabelle 3: Zusammenfassung Performance Überexpressionslinien

In der Tabelle sind Parameter wie Rosettendurchmesser, Wuchshöhe, Ionenleck nach Trockenstress und Lipidperoxidation nach Trockenstress für die CpGRP1-Überexpressionslinien zusammengefasst. + = Signifikant besser als der Wildtyp - = Signifikant schlechter als der Wildtyp

Linie	Durchmesser	Wuchshöhe	Ionenleck	Lipidperoxidation
3				-
4	+		-	
5			+	-
6	+		+	+
A	+		+	
C	+		+	+
D				+
F	+		+	+
G				
I			-	-
J	-	-	+	+
K				-
L		-	+	+

Die Linien 6, C und F schneiden in der Übersicht am besten ab (Siehe **Abbildung 58**). Sie zeigen eine ähnliche Wuchshöhe wie der Wildtyp und weisen sogar einen signifikant größeren Durchmesser der Blattrosette auf, während sie nach Trockenstress sowohl im Ionenlecktest als auch im Lipidperoxidationstest deutlich geringere Gewebeschäden aufweisen als die Wildtyppflanzen.

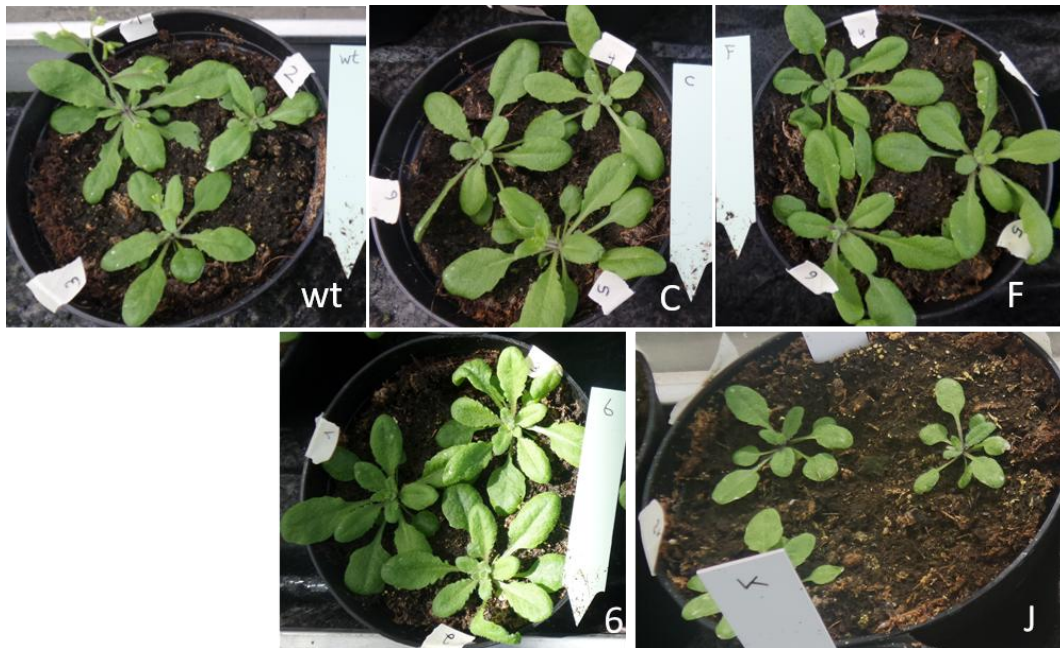


Abbildung 58: Überexpressionslinien Phänotyp

In Abbildung sind Pflanzen des Wildtyps und der Überexpressionslinien 6, C, F (Linien mit besonders gut entwickelten Pflanzen, die eine erhöhte Trockenstresstoleranz zeigen) und J (Linie mit Pflanzen die eine deutlich verlangsamte Entwicklung und einen kleinen Wuchs sowie eine erhöhte Trockenstresstoleranz aufweisen) am Tag 17 nach der Vereinzeln zu sehen.

Linie A ist ebenfalls gut entwickelt und zeigt ein geringeres Ionenleck als der Wildtyp, im Lipidperoxidationstest ergaben sich allerdings keine signifikanten Ergebnisse. Linie D ist ähnlich gut entwickelt wie der Wildtyp und zeigt eine geringere Lipidperoxidation als der Wildtyp, allerdings keine relevanten Ergebnisse im Ionenleck-Test. Die übrigen Linien zeigen entweder keinerlei signifikante Unterschiede zum Wildtyp oder negative Veränderungen Wachstum und/oder Trockenstressresistenz betreffend. Weitere untersuchte Parameter wie Anzahl der Verzweigungen, Entwicklung des Blütenstands. Keimungszeitpunkt und Länge der Wurzeln sind aus verschiedenen Gründen zunächst nicht zu den für eine Bewertung relevanten Parametern hinzugefügt worden. Im Fall der Sprossverzweigungen ergaben sich nur wenige signifikante Ergebnisse und es ist unklar, ob diese Eigenschaft einen Einfluss auf die Entwicklung oder den Ertrag potentieller Zielpflanzen haben kann. Was die Entwicklung des Blütenstands angeht, ist eine schnellere oder langsamere Entwicklung nicht unbedingt mit besseren oder schlechteren Erträgen verbunden. Da die Pflanzen aller Linien eine normal erscheinende Anzahl von Knospen und Blüten entwickelten und eine Schwankung der Blütenbildung nur einen oder zwei Tage betrifft scheinen in diesem Hinblick alle Linien angemessen gut veranlagt. Eine Ausnahme bildet Linie J die insgesamt sehr klein ist und eine deutlich verlangsamte Entwicklung zeigt (siehe **Abbildung 58**). Im Hinblick auf die Samenkeimung ist die Situation ähnlich. Die Pflanzen fast aller Linien sind bis zum dritten Tag nach der Aussaat gekeimt und verhalten sich somit wie der Wildtyp. Lediglich die Linien J und K zeigen eine um einen bzw. zwei Tage verzögerte Keimung. Diese Eigenschaft muss aber nicht mit einer insgesamt schlechteren oder langsameren Entwicklung der Pflanzen in Zusammenhang stehen ebenfalls gibt es

keinen direkten Zusammenhang mit dem potentiellen Ernteertrag einer Pflanze. Was die Länge der Wurzeln angeht scheint ein möglicher Zusammenhang zwischen der Überexpression von CpGRP1, der Wurzellänge und einer guten Entwicklung sowie der Befähigung zu Austrocknungstoleranz der Pflanzen zu bestehen. So gibt es Überschneidungen bei den Linien A, C und 6. Diese zeigen sowohl eine signifikant längere Wurzel als der Wildtyp, als auch eine gute Entwicklung und eine verbesserte Austrocknungstoleranz. Andererseits gibt es Linien mit signifikant längeren Wurzeln die keine verbesserten Eigenschaften zeigen (Linie G und Linie K). Demnach kann dieser Parameter nicht für eine Beurteilung herangezogen werden. Zumal im Zuge der Betrachtung der Wurzeln auffiel, dass einige der Linien deutlich verzweigtere Wurzel zeigen als andere. Eine Integration dieser Beobachtung in die Auswertung war im Rahmen des Experiments jedoch nicht möglich, müsste aber für eine Beurteilung berücksichtigt werden, da auch diese veränderte Beschaffenheit der Wurzelarchitektur entscheidenden Einfluss auf die Pflanze haben dürfte. Zwischen den Ergebnissen der semiquantitativen Bestimmung der RNA-Menge in den CpGRP1-Überexpressionslinien und den Ergebnissen der Phänotypischen Charakterisierung ergibt sich kein schlüssiger Zusammenhang.

4 Diskussion

4.1 Proteinexpression von CpGRP1 in *C. plantagineum* wt – ABA- und Mannitolbehandlung

Die in **Abschnitt 3.1** zusammengefassten Ergebnisse zeigen, dass die Menge an CpGRP1 Protein in den Blättern nach einer Behandlung der Pflanze mit Abscisinsäure abnimmt. Eine inkorrekte Durchführung der ABA-Behandlung kann als Erklärung ausgeschlossen werden, da CDeT11-24 eine durch ABA ausgelöste Induktion zeigt. Dass – wie bereits bekannt - auch die Menge des Transkripts CpGRP1 nach ABA-Behandlung abnimmt, deutet darauf hin, dass die Regulation der Menge an gebildetem CpGRP1-Protein auf Ebene der m-RNA erfolgt. Da weniger Transkript vorhanden ist, wird weniger Protein synthetisiert. Eine solche Verringerung der Transkriptmenge kann durch eine Verminderung der Transkriptionseffizienz erreicht werden. Die Regulation der Transkriptionseffizienz erfolgt durch im Gen-Promotor enthaltene *cis*-Elemente sowie Enhancer bzw. Silencer. Die Kontrolle der Promotoraktivität erfolgt dabei zu meist durch positive Regulation. Gezielte Repression eines Promotors ist deutlich seltener (Lewin's Genes XI, S. 549 – 577). Dennoch scheint in diesem Fall eine durch die Abscisinsäurebehandlung ausgelöste negative Regulation am Promotor zu erfolgen. Die Repression eines Promotors kann auf verschiedenen Wegen erreicht werden. So können Repressoren mit aktivierenden Transkriptionsfaktoren um deren Bindestelle am Promotor konkurrieren, oder diese durch Acetylierung oder Phosphorylierung so modifizieren, dass sie nicht mehr an ihr Ziel binden können. Auch die Verdichtung des Chromatins durch von Repressoren ausgelöste Deacetylierung von Histonen kann die Transkription eines Gens unterbinden (Gaston & Jayaraman 2003). Ergebnis ist in allen Fällen die Produktion einer geringeren Transkriptmenge.

Denkbar ist ebenso eine negative Beeinflussung der Transkriptmenge durch ncRNA (small noncoding RNA), die möglicherweise durch die Zunahme der ABA-Konzentration vermehrt produziert oder rekrutiert werden. RNA, die nicht in ein Protein übersetzt wird, kann viele andere Funktionen übernehmen. Dazu gehört die Modulation der Stabilität von m-RNA, so dass diese schneller degradiert wird, wodurch sich die Transkriptmenge verringert (Mattick & Makunin 2006). NcRNA bindet dazu durch Basenpaarung an die Ziel m-RNA und kann diese so verändern, dass sie für RNAsen zugänglicher ist und somit schneller abgebaut werden kann (Storz et al. 2004).

Eine Behandlung von *C. plantagineum* mit 0.8 M Mannitol bewirkt eine vorübergehende Hochregulation der Transkription, die mit der Produktion von Protein einhergeht, welches auch nach 48 Stunden noch nachgewiesen werden kann. Die Hochregulation der Transkription kann durch eine Zunahme an aktivierenden Transkriptionsfaktoren am Promotor erreicht werden, die die Bindungsaffinität der Polymerase zum Promotor und die erfolgreiche Promotor-Clearance steigern, so dass mehr Transkript produziert wird (Maniatis et al. 1987)(Narayan et al. 1994) (Chen & Rajewsky 2007). Ebenso kann die Stabilität der m-RNA erhöht werden, so

dass mehr Transkript akkumuliert. Die Stabilität einer RNA kann zum Beispiel von sogenannten ARE (Adenosin-Uridin-rich elements) und den an diese bindenden Faktoren kontrolliert werden. Sind ARE vorhanden, so sind sie meist in der 3'-UTR der m-RNA selbst kodiert und können stabilisierend oder destabilisierend wirken (Ross 1996) (Wilusz et al. 2001) (Shen & Malter 2015).

Die nach Ablauf der 48 Stunden erfolgte Herunterregulation der Transkription des CpGRP1 Gens erfolgt möglicherweise durch Produktinhibition. Das bedeutet, dass die Transkription durch die 'Wahrnehmung' des jetzt deutlich erhöhten Levels an m-RNA und/oder produziertem Protein gesenkt wird (Singh 2011). Wahrnehmung bedeutet in diesem Fall, dass das Produkt – also die m-RNA oder das Protein - direkt oder über einen Mediator - an den Genpromotor bindet und so als reprimierender Transkriptionsfaktor wirksam wird.

4.2 Die Lokalisation des Proteins CpGRP1

4.2.1 Transiente Transformation von *C. plantagineum*

Durch *in silico* Analyse der Aminosäuresequenz des Gens CpGRP1 mit WoLF Psort wird ein N-Terminales Signalpeptid und eine apoplastische Lokalisation des Proteins vorhergesagt (Horton et al. 2007). Vorhergehende Particle Gun Bombardments von Zwiebelzellen mit verschiedenen CpGRP1-GFP Konstrukten, zeigten globuläre, grün fluoreszierende Strukturen im Bereich der Plasmamembran und nach erfolgter Plasmolyse im apoplastischen Spalt und an der Zellwand (Giarola et al. 2015). Zudem konnte CpGRP1 in Zellwandextrakten nachgewiesen, sowie eine Interaktion von CpGRP1 mit einer WAK-Kinase (*C. plantagineum* wall-associated kinase 1) gezeigt werden (Giarola et al. 2015). Eine Lokalisation des Proteins im Bereich der Zellwand darf daher als gegeben angenommen werden.

Die mikroskopischen Aufnahmen (siehe **Abschnitt 3.2.1.1**) der biolistisch mit 35S-CpGRP-roGFP transformierten *C. plantagineum* Blattzellen zeigen grüne Fluoreszenz in Form von vesikulären Strukturen die vom Zellkern bis zur Zellmembran über die Zelle verteilt vorliegen. Betrachtet man die Vesikel aus der Nähe wird deutlich, dass nur die Hülle der Vesikel grün fluoresziert. Demnach scheint CpGRP1 als Teil der Vesikelhülle vorzuliegen. Da die mikroskopierten Zellen keine intrazellulären Bewegungen mehr zeigten, waren sie möglicherweise nicht mehr vital. Auch in den durch den Fast Assay transient transformierten *A. thaliana* Blattzellen waren globuläre Strukturen innerhalb der Zelle sichtbar (siehe **Abschnitt 3.2.1.2**). Eine denkbare Erklärung für die beobachteten vesikulären Strukturen ist, dass es sich um sekretorische Vesikel handelt, in denen das synthetisierte Protein zur Zellmembran transportiert wird, um dort in den Apoplasten sekretiert zu werden.

4.2.2 Stabile Transformation - Transgene Linien

Es ist interessant, dass die stabil mit 35S-CpGRP1-roGFP transformierten *A. thaliana* Überexpressionslinien ebenso wie die transient mit demselben Konstrukt transformierten *A. thaliana* und *C. plantagineum* Pflanzen vesikuläre Strukturen zeigen, während die stabil mit dem C2-Promotor-CpGRP1-roGFP transformierten *A. thaliana* Pflanzen lediglich gleichmäßige Fluoreszenz im Bereich der Zellwand zeigen. Der CaMV35S -Promotor isoliert aus dem Blumenkohlmosaikvirus wird schon seit Jahrzehnten verwendet, um eine starke, konstitutive und weitgehend unspezifische Expression des Zielgens in der transformierten Pflanze zu erreichen (Odell et al. 1985, Kay et al. 1987). Der aus *C. plantagineum* isolierte C2-Promotor dagegen ist konstitutiv nur schwach aktiv, kann aber durch Trockenstress und Behandlung mit ABA induziert werden (Ditzer 2003). Da der 35S-Promotor einer der stärksten pflanzlichen Promotoren ist und im Labor zusätzlich optimiert wurde, ist davon auszugehen, dass es unter Kontrolle des 35S-Promotors zu einer deutlich höheren Expression des Gens CpGRP1 kommt als unter Kontrolle des C2-Promotors. Offenbar bilden sich die beschriebenen vesikulären Strukturen erst nach dem Erreichen einer bestimmten Menge an gebildetem Protein. Diese Menge scheint in den C2-Pflanzen nicht erreicht worden zu sein. Möglicherweise handelt es sich bei den beschriebenen Vesikeln also nicht um sekretorische Vesikel – wie zuvor vermutet – sondern um Proteinaggregate und lytische Vesikel, die entstehen, weil eine Menge an Protein produziert wurde, die zu viel für die Zelle ist. Liegen in einer Zelle große Mengen an Protein vor, so ist die Tendenz zur Aggregation im Allgemeinen größer als bei kleineren Mengen an Protein (van den Berg et al. 1999). Dies kann einerseits durch die größere Wahrscheinlichkeit eines Zusammentreffens der Proteine und andererseits dadurch erklärt werden, dass bei einer großen Menge an Proteinen nicht ausreichend Chaperone vorhanden sein können, um allen Proteinen bei der Faltung in ihre korrekte Form zu assistieren. Noch nicht vollständig oder inkorrekt gefaltete Proteine neigen wiederum verstärkt dazu Aggregate zu bilden (Wang et al. 2010). Entstehen zu viele Aggregate können diese nicht alle direkt abgebaut werden, da dies die lytische Kapazität der Zelle überschreitet, so dass sie akkumulieren (Tyedmers et al. 2010).

Die Vermutung, dass eine Expression des rekombinanten Proteins in großer Menge einen negativen Effekt auf die Pflanzenzelle haben kann, erscheint auch im Zusammenhang mit der Betrachtung des Phänotyps denkbar. Während die Überexpressionslinien wenig vital und sehr klein sind, zeigen die C2-Linien einen Phänotyp, der von dem des Wildtyps optisch nicht zu unterscheiden ist. Dies war was wir uns erhofft hatten, als wir den C2-Promotor für die Expression des GFP-Konstrukts auswählten, da der C2-Promotor erst nach der Induktion durch ABA oder Trockenstress aktiv wird. Die experimentelle Untersuchung der Transkriptmenge in CpGRP1 überexprimierenden Pflanzen mit dem 35S-Promotor und unterschiedlich ausgeprägtem Phänotyp unterstützt diese Hypothese, da in den Pflanzen mit deutlicherem Phänotyp mehr Transkript vorhanden war als in den Pflanzen mit einem weniger ausgeprägten Phänotyp. Neben der geringeren Größe zeigen die 35S-CpGRP1-roGFP Linien auch eine wellige

Struktur der Blätter – ich nenne sie daher 'curly leaves'. Der Phänotyp ist bis in die F2-Generation stabil. Wodurch die veränderte Blattform entsteht ist unbekannt. Da diese Eigenart bei zwei unabhängigen Linien zu beobachten ist, ist es nicht sehr wahrscheinlich, dass dieser Phänotyp durch die Lokalisation des Inserts an einer bestimmten Stelle im Genom der Arabidopsis Pflanzen bedingt ist. Vielmehr scheint die wellige Blattstruktur mit der Überexpression des CpGRP1-roGFP Konstrukts einher zu gehen. Da CpGRP1 in der Zellwand lokalisiert ist, ist es denkbar, dass die Zellwandstruktur durch die Überexpression des Gens derart beeinflusst wird, dass die Blätter den beschriebenen Phänotyp entwickeln. Es kann andererseits nicht ausgeschlossen werden, dass der beschriebene Effekt durch die kombinierte Überexpression von CpGRP1 und roGFP entsteht und somit eher ein Artefakt darstellt. Zudem ist nicht sicher, ob die wellige Blattstruktur überhaupt auf Veränderungen der Zellwand zurückzuführen ist. Um dies beurteilen zu können, schien eine mikroskopische Untersuchung der Zellwand von Wildtyp, C2-Linien, GFP-Linien und Überexpressionslinien sinnvoll. Leider war es mir nicht möglich mit Hilfe des Lichtmikroskops Aufnahmen anzufertigen die eine ausreichende Vergrößerung und Schärfe besitzen, um die Beschaffenheit der Zellwand ausreichend gut beurteilen zu können (siehe dazu **Anhang 1, Bild 44**). Weitere Experimente sind geplant.

4.3 Untersuchung des Promotors von CpGRP1 und der Promotoren der homologen Gene in *L. brevidens* und *L. subracemosa* und deren Expressionsmuster

4.3.1 Trockenstressinduzierte Aktivität des CpGRP1 Promotors transient exprimiert in *C. plantagineum*

Aus den im Rahmen meiner Diplomarbeit gewonnenen Ergebnisse ergab sich die Hypothese, dass die Mehrheit der cis-Elemente des Promotors von CpGRP1, die eine austrocknungsresponsive Promotoraktivität vermitteln, zwischen Base 584 und 240 stromaufwärts der genkodierenden Sequenz liegen müssen. Nach der im Rahmen dieser Arbeit erfolgten Untersuchung der Aktivität des Promotorfragments p370 kann ich diese Aussage präzisieren und sagen, dass die Mehrheit der austrocknungsresponsiven Promotorelemente zwischen Base -370 und -584 liegen muss, da das Promotorfragment p370 keine Induktion durch Trockenstress zeigt. Durch den anschließenden Vergleich der Aktivität von Promotorfragment p584 (mit DRE-Element) und p584minus (ohne DRE-Element) zeigt sich, dass das vorhandene DRE-Element zwar einen positiven Effekt auf die trockenstressinduzierte Aktivität des Promotors hat, dass dieser aber nicht so stark ist wie zuvor angenommen. Die Promotoraktivität steigt von durchschnittlich 87 % auf durchschnittlich 115 %, allerdings darf dieses Ergebnis nur als Tendenz gewertet werden, da es auf Grund der Standardabweichung nicht signifikant ist. Es ist denkbar, dass zwischen Base -370 und -584 weitere Transkriptionsfaktor-Bindestellen liegen, die im Rahmen der Trockenstressantwort aktiv werden. Diese Bindestellen scheinen allerdings bisher nicht bekannt zu sein. Die Suche mit den cis-Element Daten-

banken PLACE und TRANSFAC ergab keine weiteren relevanten Treffer in diesem Bereich des Promotors. Zwischen Base -495 und Base -220 zeigt sich eine auffällige Lücke ohne relevante Bindestellen. Im weiteren Verlauf meiner Arbeit habe ich daher den Promotor von CpGRP1 mit den Promotoren der homologen Gene zweier nahe verwandter Arten verglichen, von denen eine trockenstressresistent und eine trockenstresssensitiv ist, um möglicherweise bisher nicht beschriebene Trockenstress responsive Elemente zu finden (**Abschnitt 3.3.4** und **4.3.4**). Neben der Möglichkeit, dass bisher nicht beschriebene cis-Elemente die durch Trockenstress induzierte Promotoraktivität auslösen, ist es möglich, dass eine Kombination mehrerer spezifischer Promotorelemente vorhanden sein muss, um die volle Promotoraktivität zu erhalten, die in den Fragmenten p584minus und kleiner nicht alle vorhanden sind. Dies ist bereits beschrieben worden. So müssen beispielsweise eine S1F-Bindestelle (Zhou et al. 1992) und ein MYB-bindendes Element im Promotor des *A. thaliana* erd1 Gens vorhanden sein, damit dieser durch Trockenstress aktiviert werden kann (Simpson et al. 2003). Die zwischen dem DPBF Element und dem DRE/CRT/CBF liegende Lücke im Promotor von CpGRP1, in dem keine mit Trockenstressresponsivität assoziierten Promotorelemente zu finden sind, könnte ebenso aus sterischen Gründen bestehen. Es ist denkbar, dass der Promotor im Zuge seiner Aktivierung eine Schleife bildet, die den Transkriptionskomplex, der unter anderem aus zahlreichen den Promotor bindenden Transkriptionsfaktoren besteht und die RNA-Polymerase bindet, umgibt. Sogenanntes 'looping' ist zumindest für Promotor-Enhancer-Interaktion ein akzeptiertes Modell die allerdings weit größere DNA-Bereiche betrifft als den hier beschriebenen (Matharu & Ahituv 2015). Mit Rasterkraftmikroskopie konnte allerdings gezeigt werden, dass es spezielle (Promotor)-DNA-biegende Proteine gibt. Diese biegen typischerweise DNA-Abschnitte, die um die 150 Basenpaare lang sind. So erzeugt zum Beispiel das Protein IHF (Integration host factor) eine Biegung von durchschnittlich 123° in seinem Zielpromotor, was die Erreichbarkeit des Promotors für Transkriptionsfaktoren verbessert und somit die Ausbildung eines effektiven Transkriptionskomplexes begünstigt (Seong et al. 2002). Diese Hypothese der sterischen Notwendigkeit erklärt auch, warum eine maximale Aktivierung des Promotors durch die Fragmente die kleiner als p584 sind nicht erfolgt. Erst Fragment p584 ist lang genug um sich in eine Schleife zu legen und verfügt über die Bindestellen ABRE und DRE/CRT/CBF die vermutlich zur Bildung des Transkriptionskomplexes beitragen. Zudem erklärt diese zweite Hypothese der sterischen Notwendigkeit auch warum oftmals mehrere spezifische Promotorelemente in einem Promotor vorhanden sein müssen, um dessen volle Aktivität zu gewährleisten.

4.3.2 Untersuchung des entwicklungspezifischen Genexpressionsmusters von CpGRP1 durch *A. thaliana* Promotor-GUS Linien

Zunächst lässt sich festhalten, dass das Gen CpGRP1 aus *C. plantagineum* stabil im heterologen System (*A. thaliana*) exprimiert ebenso Promotoraktivität im ungestressten (turgiden) Zustand zeigt wie nativ in *C. plantagineum*.

Linie p584-19 und Linie p887-1 zeigen eine deutliche Aktivität des CpGRP1-Promotors in Teilen des Stiels, Teilen der Wurzel, Teilen der Blüte und den echten Blättern, während Linie p584-18 und p887-2 eine deutlich schwächere Expression des GUS-Reportergens zeigen, die sich auf Teile des Stiels beschränkt. Linie p887-5 zeigt einen intermediären Phänotyp. Die GUS-Expression ist im Vergleich mit Linie p584-19 und Linie p887-1 teilweise schwächer oder, wie im Fall der Staubbeutel, nicht vorhanden. Die Keimblätter und Blattprimordien zeigen in allen Linien Expression des Reportergens. Die beschriebenen Unterschiede in der Intensität und Gewebespezifität der GUS-Expression zeigen sich unabhängig davon, ob das GUS-Gen unter Kontrolle des Promotorfragments p887 oder unter Kontrolle des kleineren Promotorfragments p584 exprimiert wurde. Unter Kontrolle beider Fragmente kann es zu einer gut ausgeprägten Genexpression in verschiedenen Geweben (Linien p584-19, p887-1 und p887-5) oder zu schwacher Genexpression, die sich auf die Keimblätter und Teile des Stiels beschränkt (Linien p584-18 und p887-2) kommen (siehe **Abbildungen 22 – 28**). Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme (siehe dazu **Abschnitt 1.6.3.1**), dass das Promotorfragment p584 alle *cis*-Elemente enthält, die für die Aktivierung des CpGRP1 Promotors wesentlich sind.

Unterschiede in der Genexpression zwischen transgenen Linien können durch den Positionseffekt und/oder epigenetisches 'Silencing' bedingt sein und werden häufig beobachtet. So zeigte die Messung der GUS-Aktivität von 45 unabhängigen Tabak-Kallus Linien, die mit dem gleichen Promotor-GUS Konstrukt transformiert worden waren, eine große Varianz in der GUS-Expression. Zudem zeigte ein großer Teil der Linien entweder keine oder nur geringe GUS-Expression, was vermuten lässt, dass Agrobakterium vermittelte - und somit zufällige Integration des Transgens in das pflanzliche Genom - relativ häufig zu 'stillen' Transgenen führt (Peach & Velten 1991). Auch andere Publikationen beschrieben schon in den 1980er Jahren ähnliche Ergebnisse (An 1986)(Dean et al. 1988). Unterschiede von bis zu 200 % Expressionsintensität wurde zwischen gleichen Konstrukten berichtet (An 1986). Dank der Entwicklung neuer Methoden können solche Untersuchungen seit einigen Jahren deutlich schneller und mit einer großen Anzahl an Proben durchgeführt werden. So bestimmten Waseem et.al 2013 das Expressionslevel zweier Promotor-Reportergen Konstrukte für über 27.000 Insertionsorten im Mausgenom. Sie beobachteten bis zu ~1000fache Unterschiede in der Expressionsintensität zwischen gleichen Promotor-Gen-Konstrukten in Abhängigkeit von der Lokalisation des Konstrukts im Genom. Eine Analyse der gewonnenen Daten unterstützt die These (Li & Reinberg 2011), dass Genexpression an Orten hoher Chromatinkompaktheit geringer ist, als an Orten mit aufgelockertem Chromatin.

Die Untersuchung der Expression von CpGRP1 in *A. thaliana* durch die GUS-Fusionskonstrukte ermöglichte dennoch neue Erkenntnisse im Hinblick auf die Lokalisation der Expression des Gens CpGRP1 wie im Folgenden ausgeführt. Derzeit erfolgt die experimentelle Untersuchung der Genexpression in *C. plantagineum* in unserem Labor üblicherweise durch Detektion der RNA und des synthetisierten Proteins, da eine Transformation von *C.*

plantagineum nur unter großem Zeitaufwand und mit geringen Erfolgsquoten möglich ist. Durch Detektion und Quantifizierung von RNA und Protein konnte gezeigt werden, dass CpGRP1 in *C. plantagineum* Blättern exprimiert wird (Giarola et al. 2015). Für andere Gewebetypen wie Wurzel, Blüte und Stiel konnte dies bisher nicht erreicht werden. Ein Grund dafür ist die weitaus geringere Menge an Material die von diesen Geweben für RNA- und Proteinextraktion zur Verfügung stehen. Hinzu kommt, dass nur Teile des Stiels und der Wurzel Genexpression zeigen. Die bisher durchgeführten Versuche CpGRP1 Expression in den Wurzeln nachzuweisen zeigten kein Ergebnis (Giarola et al. 2015) so dass wir davon ausgingen, dass CpGRP1 in diesen nicht exprimiert wird. Dieses Ergebnis ist dadurch zu erklären, dass, (in Bezug auf die Gesamtheit der Wurzel) nur die Wurzelspitzen CpGRP1 exprimieren, der überwiegende Teil des zur RNA- und Proteinextraktion verwendeten Wurzelmaterials in der Tat keine RNA bzw. kein Protein enthält. So liegt das RNA- bzw. Protein-Signal unterhalb der Detektionsgrenze oder gleicht dem Hintergrundsignal. Das Gen CpGRP1 übernimmt demnach möglicherweise nicht nur in den Blättern, sondern ebenso in Teilen des Blattstiels, der Blüte und in den Wurzelspitzen eine Funktion die dazu beitragen könnte, die Trockentoleranz von *C. plantagineum* auszubilden. Die Expression in den Keimblättern dagegen, die in allen Linien beobachtet wurde, könnte dadurch bedingt sein, dass CpGRP1 in der späten Phase der Embryogenese synthetisiert wurde und diese Genaktivität in den Keimblättern auch nach der Keimung erhalten geblieben ist. Normalerweise ist nur der reife, trockene, orthodoxe Same austrocknungstolerant (Bewley et al. 2012). Ein Teil der Gene, die in der späten Phase der Entwicklung orthodoxer Samen synthetisiert werden, stehen in Zusammenhang mit der Ausbildung der Austrocknungstoleranz, welche die Samen in dieser Phase entwickeln um lange überdauern zu können (z.B. LEA-Gene = late embryogenesis abundant proteins) (Leprince et al. 1993). Werden die Samen befeuchtet, keimen diese aus und verlieren innerhalb einiger Stunden ihre Austrocknungstoleranz (Bewley et al. 2012). Es wurde allerdings auch beschrieben, dass Samen und junge Keimlinge, wenn diese zuvor mit mildem osmotischen Stress (ausgelöst durch PEG) behandelt wurden, auch nach einer Befeuchtung ihre Trockentoleranz beibehalten können (Maia et al. 2011). Manche Keimlinge behalten diese Fähigkeit auch ohne eine vorherige Behandlung. Interessant ist, dass in mehreren Spezies die Keimblätter im Vergleich zu anderen Teilen des Keimlings eine höhere Fähigkeit zur Erhaltung der Trockentoleranz zeigen (Maia et al. 2011) (Buitink et al. 2003). Um die Fähigkeit zur Trockenstresstoleranz beizubehalten, ist natürlich auch die andauernde Aktivität der entsprechenden Gene notwendig, zu denen CpGRP1 gehören könnte. Demnach ist es denkbar, dass CpGRP1 in den Keimblättern der Promotor-GUS-Linien aktiv ist, weil es im Zuge der Samenreifung aktiviert wurde und seine Aktivität in den Keimblättern im Verlauf der Keimung beibehalten hat. Dies muss allerdings nicht bedeuten, dass die Keimlinge der Promotor-GUS-Linien trocken-toleranter sind als andere *A. thaliana* Keimlinge. Dies zu untersuchen könnte ein weiteres interessantes Experiment sein.

Die Expression im Blattstiel ist auf den untersten Teil an der Grenze zur Wurzel beschränkt. Möglicherweise kommt CpGRP1 in diesen Zellen eine Rolle zu, die die Wasserleitfähigkeit zwischen Wurzel und Stiel beeinflusst. Denkbar ist auch eine Rolle in der Weiterleitung des Signals, das der Wasserstatus der Wurzel auslöst, an den Stiel. Die Expression in den Wurzeln ist auf deren Spitzen beschränkt und dürfte demnach in einem Gewebe lokalisiert sein, das in den übrigen Teilen der Wurzel nicht zu finden ist, also vermutlich im Apikalmeristem der Hauptwurzel bzw. Lateralmeristem der Seitenwurzeln. Meristeme sind den Stammzellen tierischer Zellen ähnlich. Sie sind undifferenziert und der Ursprung aller differenzierten Zellen. Welche Bedeutung CpGRP1 in den Meristemen haben könnte ist unklar. Meine Theorie dazu – auch im Hinblick auf die beschriebene Expression in den Keimblättern, Wurzelspitzen, Blattprimordien sowie Gynözeum und Andrözeum - war, dass CpGRP1 in jungen, teilungsaktiven und meristematischen Geweben stärker exprimiert wird als in älteren. Dies konnte allerdings durch meinen Versuch mit jungen (inneren) und älteren (äußeren) Blättern von 6-Wochen alten GUS-Pflanzen nicht bestätigt werden (siehe Abbildung 32). Da die Färbung dieser Blätter allerdings insgesamt schwach ausfiel, wäre eine Wiederholung - vielleicht mit deutlich jüngeren Arabidopsis Pflanzen - möglicherweise sinnvoll.

Interessant ist die in den Hydathoden beobachtete Genexpression. Hydathoden sind natürliche Öffnungen an der Blattspitze, am Blattrand und an der Blattoberfläche, die den Austritt von Wasser erlauben. Dieser Vorgang heißt Guttation und wird durch hydrostatischen Druck bzw. Wurzeldruck getrieben. Durch Guttation wird die Flutung der Mesophyllzellen mit Wasser vermieden wenn der Boden feucht und die Transpiration der Pflanze (z.B. wegen geschlossener Stomata) gering ist (Feild et al. 2005). Im Gegensatz zu Stomata sind Hydathoden normalerweise permanent geöffnet (Singh 2014). Die Annahme, dass der Wasseraustritt durch die Hydathoden keinerlei Kontrolle unterliegt, erscheint dennoch wenig plausibel. So zeigten Gay & Tuzun im Jahr 2000, dass Kohlpflanzen als Reaktion auf den Befall durch bestimmte Bakterien Lignin in ihren und um ihre Hydathoden einlagern und so den Eintritt der Bakterien sowie den Austritt von Wasser über die Hydathoden verringern (Gay & Tuzun 2000). Es ist denkbar, dass *C. plantagineum* Mechanismen entwickelt hat einer Austrocknung entgegen zu wirken, diese zu verlangsamen, oder besser zu überstehen, die eine Modifikation der Hydathoden oder des aus den Hydathoden austretenden Fluids einschließt und eine Mitwirkung des Gens CpGRP1 erfordert. Das über die Hydathoden austretende Fluid enthält zahlreiche organische und anorganische Substanzen, darunter Zucker, Ionen, Hormone, Aminosäuren, Proteine und Toxine (Singh 2014) und eine Modifikation der Zusammensetzung kann verschiedenste Auswirkungen auf die Pflanze haben.

4.3.3 Trockenstress induzierte Aktivität des CpGRP1 Promotors stabil exprimiert in *A. thaliana*

Die Untersuchung der Aktivität des Promotors von CpGRP1 in *A. thaliana* durch Promotor-GUS-Linien zeigte, dass der Promotor in Arabidopsis nicht zusätzlich durch Trockenstress

induziert wird sondern vielmehr an Aktivität verliert. In beiden Systemen zeigt der Promotor bereits im ungestressten Zustand Aktivität. Die Promotoraktivität in *C. plantagineum* erhöht sich allerdings durch Trockenstress, während in sie in *A. thaliana* sinkt. Offenbar funktioniert die Trockenstressinduktion im heterologen System nicht. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass das zu CpGRP1 homologe Gen AtGPR3 aus Arabidopsis in *A. thaliana* ebenfalls durch Trockenstress herunterreguliert wird (www.arabidopsis.org).

Es ist denkbar, dass *A. thaliana* über eine abweichende Ausstattung mit Transkriptionsfaktoren verfügt als *C. plantagineum*. Möglich ist auch, dass – obwohl eine gleiche oder ähnliche Ausstattung mit Transkriptionsfaktoren gegeben ist - in *A. thaliana* durch Trockenstress andere Transkriptionsfaktoren aktiviert werden als in *C. plantagineum*. Im Ergebnis fehlen aktivierende Transkriptionsfaktoren in *A. thaliana* die in *C. plantagineum* vorhanden sind und/oder sind deaktivierende Transkriptionsfaktoren in *A. thaliana* aktiv, die in *C. plantagineum* nicht vorhanden sind. Um genauer zu untersuchen welche Transkriptionsfaktoren an den Promotor von CpGRP1 binden, könnte ein Yeast-One-Hybrid Assay durchgeführt werden. Es wäre sinnvoll dazu eine Transkriptionsfaktor-‘Library‘ aus trockengestressten Craterostigma pflanzen und möglicherweise ergänzend eine weitere aus trockengestressten Arabidopsis pflanzen zu erzeugen.

4.3.4 Expressionsmuster von CpGRP1 in *C. plantagineum* und der homologen Gene in *L. subracemosa* und *L. brevidens* im Vergleich und Beschaffenheit der Promotoren

Wie aus den Transkriptomdatenbanken von *C. plantagineum*, *L. brevidens* und *L. subracemosa* hervorgeht und experimentell bestätigt werden konnte, zeigen die beiden trockenstresstoleranten Spezies *C. plantagineum* und *L. brevidens* eine Induktion des Transkripts CpGRP1 bzw. LbGRP1 durch Trockenstress, wobei diese bei *C. plantagineum* stärker ausfällt, während es in der trockenstresssensitiven Spezies *L. subracemosa* zu einer Verringerung der Transkriptmenge von LsGRP1 kommt. Interessant ist, dass die Menge des Transkripts von CpGRP1 unter Kontrolle des nativen Promotors in transgenen, trockenstresssensitiven *A. thaliana* Pflanzen durch Trockenstress ebenfalls abnimmt. Die Induktion der Transkription von CpGRP1 funktioniert demnach zwar in *C. plantagineum*, nicht aber in *A. thaliana*. (siehe **Abschnitt 3.3.3**).

Als Grund für die differentielle Regulation der Genexpression im Rahmen der Trockenstressantwort schienen im Fall von *C. plantagineum*, *L. brevidens* und *L. subracemosa* Unterschiede in der Promotorarchitektur naheliegend. Vergleicht man die Beschaffenheit der Promotoren, so wird in der Tat deutlich, dass der Promotor der trockenstresssensitiven Art *L. subracemosa* sowohl weniger allgemeine, als auch weniger mit Trockenstressresponsivität assoziierte cis-Elemente enthält. Der Promotor von *L. brevidens* zeigt die höchste Dichte an allgemeinen Promotorelementen, aber weniger spezifisch durch Trockenstress induzierte cis-Elemente.

Die Hypothese, dass die differentielle Regulation der Transkriptmenge über den Promotor erfolgt, wird durch diese Befunde bestärkt.

Vergleicht man die Sequenzen der drei Promotoren, so fällt weiter auf, dass der *C. plantagineum* Promotor mit jeder der beiden anderen Promotorsequenzen eine größere Ähnlichkeit hat, als diese untereinander. Es erscheint denkbar, dass im Zuge der Evolution in den Promotoren der Lindernia Arten konservierte cis-Elemente verloren gegangen sind, die in *C. plantagineum* erhalten blieben; wahrscheinlich, weil diese Arten einem geringeren Selektionsdruck durch Trockenstress ausgesetzt waren und sind als *C. plantagineum*. Wie Phillips et al. 2008 schrieben ist es sogar eher erstaunlich, dass *L. brevidens* trockentolerant ist, da diese Art im tropischen Regenwald von Tanzania und Kenya wächst und keine saisonale Trockenheit erlebt. *L. subracemosa* wächst in ähnlichen Habitaten wie *L. brevidens* und ist ebenso wenig mit Trockenperioden konfrontiert. Das *L. brevidens* dennoch trockentolerant ist, kann dadurch erklärt werden, dass alle drei beschriebenen Spezies auf einen gemeinsamen, trockentoleranten Vorfahren zurückgehen und bisher nur *L. subracemosa* diese Fähigkeit verloren hat (Phillips et al. 2008). Während die Befähigung zur Austrocknungstoleranz für *C. plantagineum* in ihrem Lebensraum in dem sie Trockenzeiten überleben muss einen Vorteil darstellt, gilt dies für die hier untersuchten Lindernia Arten nicht. Solange eine Eigenschaft für eine Art aber keinen Nachteil darstellt, kann sie durch Genomstabilität erhalten bleiben, wie es offenbar bei *L. brevidens* der Fall ist. Da trockentolerante Pflanzen jedoch oft kleiner und kompakter sind als konkurrierende Arten und zudem langsamer wachsen (Alpert 2006), kann diese Eigenschaft auch negative Folgen für eine Art haben. Ist der Selektionsdruck auf eine Art in Habitaten, die keine Trockenheit erfahren, – z.B. durch konkurrierende, schneller wachsende Arten - hoch, so kann die Befähigung zur Trockentoleranz verloren gehen, wie es offenbar bei *L. subracemosa* geschehen ist. Wie van den Dries et al. annehmen, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass auch *L. brevidens* in der Zukunft die Fähigkeit zur Austrocknungstoleranz verlieren wird (van den Dries et al. 2011).

Da die Induzierbarkeit der Promotoren von *C. plantagineum* und *L. brevidens* durch Trockenstress mit der Architektur des jeweiligen Promotors zusammenhängt schien es denkbar, dass diese Spezies über konservierte Promotorelemente verfügen, die in *L. subracemosa* verloren gingen und bisher noch nicht beschrieben wurden. Durch *in silico* Analyse der Promotorregionen konnten in der Tat einige Abschnitte gefunden werden, die zwischen den Promotoren von *C. plantagineum* und *L. brevidens* identisch sind, während sie in *L. subracemosa* nicht gefunden werden. Allerdings stellte sich in der weiteren Untersuchung dieser Abschnitte heraus, dass sie alle bereits beschriebene Promotorelemente enthalten. Es ist somit schwer zu sagen, ob es sich tatsächlich um bisher unbekannte cis-Elemente handelt, die Anteil an der Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren haben, die eine Trockenstressantwort fördern, oder ob diese Bereiche nur in beiden Promotoren konserviert vorliegen, weil es sich um allgemeine bzw. aus anderen Gründen konservierte Promotorelemente handelt. Wahrscheinlich ist, dass nicht die Art der cis-Elemente allein die Stärke des Promotors bestimmen, sondern auch deren Anord-

nung, da die Anordnung der cis-Elemente die räumliche Struktur in die sich die bindenden Transkriptionsfaktoren anordnen beeinflusst. Je nach Beschaffenheit des sich bildenden Transkriptionsinitiationskomplexes kann die DNA-Polymerase unterschiedlich effizient binden und das Gen dementsprechend mit variabler Effizienz abgelesen werden (siehe auch **Abschnitt 4.3.1**). Weiterhin muss bedacht werden, dass nicht nur die Promotorarchitektur, sondern auch die Zusammensetzung und Menge der verfügbaren Transkriptionsfaktoren die Bildung eines effizienten Transkriptionskomplexes und somit die gebildete Transkriptmenge entscheidend beeinflussen. Dies wird im Experiment dadurch deutlich, dass der Trockenstress induzierbare, native Promotor von CpGRP1 in *A. thaliana* keine Induktion durch Trockenstress zeigt. In einer ungeeigneten Umgebung kann demnach auch ein starker Promotor ineffektiv bleiben (siehe auch **Abschnitt 3.3.3**).

4.4 Erzeugung und Untersuchung von Überexpressionslinien

Betrachtet man die 13 CpGRP1-Überexpressionslinien (3, 4, 5, 6, A, C, D, F, G, I, J, K und L) in ihrer Gesamtheit so gibt es in Bezug auf die untersuchten Parameter wie Rosettendurchmesser, Wuchshöhe usw. keine signifikanten Unterschiede in eine einheitliche Richtung die alle oder zumindest die Mehrheit der Linien betreffen (**Tabelle 3**). Was einzelne Linien angeht so gibt es Variation. Die Linien K und J zeigen eine verzögerte Keimung (**Abbildung 48**). Die Linien A, C, F, 4 und 6 entwickeln eine größere Blattrosette als der Wildtyp, während Linie J eine kleinere Blattrosette zeigt. Die Wuchshöhe betreffend erreichen die Linien J und L eine geringere Höhe ebenso wie eine geringere Zahl an Verzweigungen als der Wildtyp (**Abbildung 47 und Abbildung 48**). Betrachtet man die Entwicklung der Infloreszenz so bilden die Linien 3 und J diese verzögert aus (**Abbildung 49 und Abbildung 50**). Unterschiede im Längenwachstum der Wurzel betreffen die Linien A, C, G, K und 6 (länger) sowie die Linie J (kürzer) (**Abbildung 51 und Abbildung 52**). Insgesamt auffällig ist Linie J, die durchweg eine langsamere Entwicklung und eine geringere Größe als die übrigen Linien zeigt (**Abbildung 58**). Aus den beschriebenen Beobachtungen lässt sich schließen, dass die Überexpression von CpGRP1 in *A. thaliana* zu keiner negativen Beeinflussung von Wachstum und Entwicklung führt. Die Pflanzen der Linie J bilden eine Ausnahme. Dabei muss aber berücksichtigt werden, dass nicht nur die Überexpression eines Gens an sich Einfluss auf den Phänotyp der transgenen Pflanze haben kann, sondern auch der Insertionsort im Genom. Die Insertion durch Agrobakterium vermittelten Gentransfer erfolgt an einem zufälligen Ort im Genom. Es kann demnach nicht ausgeschlossen werden, dass die kodierende Sequenz eines Gens getroffen und durch die Insertion zerstört wird. Bei Linie J könnte dies der Fall sein. Möglicherweise wurde ein Gen getroffen, das besonders wichtig für die pflanzliche Entwicklung ist. Beispiele für die Ausbildung von Zwerg-Phänotypen nach der Inaktivierung eines Gens gibt es viele, so beschrieben Qin et al. 2007 einen *A. thaliana* Zwerg-Phänotyp nach der Zerstörung

des Gens PDS3 (Phytoen Desaturase), das für ein wichtiges Enzym des Karotinoid-Biosynthese-Weges kodiert durch T-DNA Insertion (Qin et al. 2007). Xing et al. beschrieben 2010 einen Zwerg-Phänotyp in *A. thaliana* nach der Zerstörung der kodierenden Sequenz für das Gen DXR (1-desoxy-D-xylulose-5-phosphat-reduktoisomerase) ein Enzym des Biosynthesepfades der das Ausgangsprodukt für die Isoprenoid Biosynthese liefert (Xing et al. 2010). Auch Rojas-Gonzales et al. beschrieben 2016 nach der Spaltung des FPBase-Gens (Fructose-1,6-bisphosphatase) durch T-DNA Insertion einen Zwerg-Phänotyp, um hier nur einige Beispiele zu nennen (Rojas-González et al. 2015). Der beobachtete Phänotyp bei Linie J dürfte demnach mit großer Wahrscheinlichkeit nicht mit der Überexpression von CpGRP1 in Zusammenhang stehen.

Obwohl nicht alle Überexpressionslinien einen einheitlichen Trend zeigen, fällt doch ins Auge, dass mehrere Linien eine größere Blattrosette (4, 6, A, C, F) und längere Wurzeln (6, A, C, G, K) entwickeln als der Wildtyp (**Tabelle 3**). Ob diese Eigenschaften jedoch im Zusammenhang mit der Überexpression von CpGRP1 stehen bleibt unklar. Möchte man einen möglichen Zusammenhang überprüfen, so wäre es zunächst sinnvoll auf eine Korrelation zwischen der Menge an exprimierter RNA bzw. der Menge an exprimiertem Protein zu testen. Dazu ist eine belastbare Quantifizierung von RNA und Protein unabdingbar. Beides wurde versucht, konnte jedoch nicht erreicht werden (siehe **Abschnitt 3.4.6** und **Abschnitt 3.4.7**). Für die RNA-Quantifizierung stand die semi-quantitative Reverse-Transkriptase PCR als Methode zur Verfügung. Erfahrungsgemäß ist diese Methode für die Detektion deutlicher und stabiler bestehender Unterschiede in der Genexpression sehr gut geeignet, während die Detektion geringerer Unterschiede in der m-RNA Menge schwierig ist und Ergebnisse sich oft als wenig reproduzierbar erweisen. Zu dieser Einschätzung gelangen unter anderem Remans et al., die (frei übersetzt) schreiben: *“Reverse Transkription gefolgt von real time (oder quantitativer) PCR (RT-qPCR) ist eine akzeptierte Methode zur Quantifizierung der Genexpression die weitverbreitete Anwendung findet (...). Methoden wie RNA-Gelblots oder andere RT-PCR Methoden enthüllen nur relativ große Unterschiede im m-RNA-Level.“* Die Anwendung von RT-qPCR wäre hier demnach das Mittel der Wahl um zu einer zuverlässigeren Einschätzung der m-RNA Menge zu gelangen. Beachtet werden muss dabei, dass auch die Anwendung der RT-qPCR nur unter Beachtung bestimmter Regeln und in den Händen eines erfahrenen Experimentators zu zuverlässigen Ergebnissen führt, da z.B. für jedes zu untersuchende Gen zunächst ein geeignetes Normalisatorgen gefunden und getestet werden muss. Zahlreiche weitere Punkte sind zu beachten um belastbare Ergebnisse zu erhalten (Remans et al. 2014). RT-qPCR kann demnach bessere Ergebnisse liefern als die einfache RT-PCR, dies bedarf aber eines nicht unerheblichen Aufwandes an Zeit und nicht zuletzt finanzieller Mittel.

Die versuchte Quantifizierung der Proteinmenge scheiterte an der zu geringen Spezifität des verfügbaren polyklonalen Antikörpers für CpGRP1. Dieser detektiert zusätzlich zu CpGRP1 aus *C. plantagineum* auch die homologen Gene aus *A. thaliana* und *L. brevidens*. Eine ein-

deutige Unterscheidung der Gene auf dem Blot ist auf Grund der sehr ähnlichen Laufhöhe nicht möglich (siehe **Abbildung 54** und **Abbildung 55**). Problematisch bei der Erzeugung eines Antikörpers der ausschließlich CpGRP1, nicht aber die homologen Gene detektiert, dürfte die hoch konservierte, repetitive glycinreiche Region der Proteine sein. Eine denkbare Lösung wäre die Verwendung eines monoklonalen Antikörpers anstelle eines polyklonalen Antikörpers. Dabei wäre darauf zu achten, dass das verwendete Epitop für CpGRP1 spezifisch ist.

Zusätzlich zu einem größeren Rosettendurchmesser (Linie 4, **6, A, C, F**) und einer größeren Wurzellänge (Linie **6, A, C, G, K**) zeigen einige Linien eine verbesserte Trockenstresstoleranz im Vergleich zum Wildtyp (Linie **6, A, C, F, J, L**) (**Abschnitt 3.4.8** und **Abschnitt 3.4.9**). Auch hier wäre eine zuverlässige Quantifizierung der m-RNA und Proteinmenge in den Überexpressionslinien notwendig um beurteilen zu können, ob die Menge an vorhandenem CpGRP1 Protein mit dieser Eigenschaft korreliert. Da CpGRP1 allerdings in *C. plantagineum* mit der Befähigung dieser Pflanze zur Austrocknungstoleranz in Zusammenhang gebracht wird, ist es naheliegend die Überexpression von CpGRP1 analog mit der verbesserten Trockenstresstoleranz der CpGRP1-Überexpressionslinien in Verbindung zu bringen. Unter Berücksichtigung der bisherigen Ergebnisse scheint CpGRP1 ein geeignetes Kandidatengens für die Überexpression in Nutzpflanzen zu sein, dass die Trockenstresstoleranz dieser Arten verbessern könnte ohne einen negativen Einfluss auf Wachstum und Entwicklung auszuüben.

Die Hypothese, dass die verbesserte Trockenstresstoleranz der transgenen *A. thaliana* Linien mit dem größeren Durchmesser der Blattrosette und der größeren Wurzellänge in Zusammenhang steht, konnte durch die bisher durchgeführten Experimente (noch) nicht bestätigt werden, ist aber eine weiterführende Untersuchung wert. Besonders interessant erscheint der Zusammenhang zwischen der größeren Länge der Hauptwurzel und der erhöhten Trockenstresstoleranz der Pflanzen die dieses Merkmal aufweisen. Es wurde berichtet, dass *A. thaliana* Pflanzen als Reaktion auf Trockenstress eine geringere Zahl lateraler Wurzeln ausbilden, als im ungestressten Zustand (Deak & Malamy 2005). Die Zahl an lateralen Wurzel resultiert nach den Ergebnissen von Xiong et al. nicht daraus, dass eine geringere Zahl an Wurzelprimordien gebildet wird, sondern daraus, dass die Verlängerung der Seitenwurzeln unterdrückt wird (Xiong et al. 2006). Durch die Unterdrückung der Ausbildung des lateralen Wurzelsystems verbleiben der Pflanze größere Energiereserven, um eine Verlängerung der Hauptwurzel voranzutreiben und dadurch potentiell vorhandene tiefer liegende Wasservorräte zu erreichen. In den Experimenten von Xiong et al. zeigten die Arabidopsispflanzen bei denen dieser Mechanismus normal funktionierte eine größere Trockenstresstoleranz als Mutanten bei denen eine Ausbildung der lateralen Wurzeln trotz Trockenstress stattfand (Xiong et al. 2006). Auch Kashiwagi et al. beobachteten bei ihren Feldversuchen mit verschiedenen Kichererbsenlinien (*Cicer arietinum* L.) einen Zusammenhang zwischen einer Verlängerung des Wurzelsystems, einer gesteigerten Trockenstresstoleranz sowie gesteigertem Ernteertrag (Kashiwagi et al. 2006). In einem kürzlich veröffentlichten Artikel beschreiben Uga et al. wie

durch die Integration eines QTL (quantitative trait loci = Region eines quantitativen Merkmals) in das Genom von Reispflanzen die Architektur des Wurzelsystems dieser Pflanzen dahingehen modifiziert werden kann, dass die transgenen Pflanzen (durch Trockenstressvermeidung) trockenstresstoleranter sind. Durch den eingekreuzten QTL 'DRO1' verändert sich die Wuchsrichtung der Wurzeln so, dass diese tiefer in den Boden eindringen (Uga et al. 2013). Die genannten Beispiele verdeutlichen, dass die Tiefe des Wurzelsystems bzw. der Hauptwurzel einen direkten Einfluss darauf hat wie gut die von Trockenstress betroffenen Pflanzen Trockenstress tolerieren können. Es handelt sich hierbei allerdings nicht um einen Mechanismus der Austrocknungstoleranz, sondern vielmehr der Trockenstressvermeidung. Es erscheint denkbar, dass *C. plantagineum* neben Mechanismen der Austrocknungstoleranz auch Mechanismen zur Trockenstressvermeidung entwickelt hat, an deren Ausprägung das CpGRP1-Gen beteiligt ist. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass CpGRP1 ebenso wie DRO1 negativ durch ABA reguliert wird und das CpGRP1 ebenso wie DRO1 in der Wurzelspitze exprimiert wird. DRO1 hat dort Einfluss auf die Zellverlängerung und ermöglicht dadurch eine Biegung der Wurzelspitze in Richtung der Erdanziehung und ein Wachstum in größere Bodentiefen (Uga et al. 2013). Welche Funktion CpGRP1 in den Wurzelspitzen zukommt wäre ein Punkt für weitere Untersuchungen.

5 Zusammenfassung und Ausblick

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Proteinexpression

Die Menge an CpGRP1 Protein in den Blättern nimmt nach einer Behandlung der Pflanze mit Abscisinsäure ab (**Abschnitt 3.1**), während eine Behandlung von *C. plantagineum* mit 0.8 M Mannitol eine Zunahme der Menge an Cp-GRP1 Protein bewirkt (**Abschnitt 3.1** und **Abschnitt 4.1**).

Lokalisation

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Lokalisation des Gens CpGRP1 in der Zelle (**Abschnitt 3.2** und **Abschnitt 4.2**) stehen in Einklang mit den Ergebnissen von S. Krey & V. Giarola, (Giarola et al. 2015) die eine Lokalisation in der Zellwand bzw. im Apoplast nahelegen. Dort interagiert CpGRP1 mit CpWAK1 und ist vermutlich an durch Trockenstress induzierten morphologischen Veränderungen der Zellwand beteiligt (Giarola et al. 2015).

Phänotyp der 35S-CpGRP1-roGFP Linien

Die 35S-CpGRP1-roGFP Linien zeigen einen deutlichen Phänotyp. Sie sind klein und in ihrer Entwicklung verlangsamt. Viele Pflanzen sterben innerhalb der ersten Wochen ab. Auffällig ist die wellige Blattform. Es erscheint denkbar, dass das überexprimierte CpGRP1 in Fusion mit roGFP an seinem Lokalisationsort (der Zellwand bzw. dem Apoplast) Einfluss auf die Struktur der Zellwand hat. Da die 35S-CpGRP1 Linien keinen solchen Phänotyp zeigen, scheint nicht die Überexpression des CpGRP1-Gens als solche, sondern entweder die kombinierte Expression mit roGFP und/oder die Lokalisation der T-DNA-Insertion den beschriebenen Zwerg-Phänotyp auszulösen. Da zwei unabhängige T-DNA-Insertionslinien den gleichen Phänotyp (mit welligen Blättern) zeigen, erscheint es wahrscheinlicher, dass dieser durch die kombinierte Überexpression von CpGRP1 und roGFP entsteht. Möglicherweise kommt es durch die Verlängerung des CpGPR1-Proteins durch das Protein roGFP zu sterischen Behinderungen am Lokalisationsort.

CpGRP1-Promotoraktivität nach Trockenstress transient im homologen System

Nach transienter Transformation von *C. plantagineum* Blättern mit verschiedenen Fragmenten des Genpromotors von CpGRP1 und Trockenstressbehandlung ergibt sich folgendes Bild: Das 370 Nukleotide lange Promotorfragment p370 wird nicht durch Trockenstress induziert. Das 502 Nukleotide lange Promotorfragment p584minus (mit cis-Element Deletierungen) dagegen wird – ebenso wie alle größeren Fragmente - durch Trockenstress induziert. Vergleicht man das 584 Nukleotide lange Promotorfragment p584 und das Promotorfragment p584minus direkt miteinander, so zeigt das Fragment p584minus eine geringere Aktivität, die aber nicht signifikant geringer ist. Fragment p584 zeigt eine Aktivität von durchschnittlich 115% während

p584minus eine durchschnittliche Aktivität von 87% zeigt. Das in p584 enthaltene, in p584 minus jedoch deletierte Trockenstress responsive Promotorelemente (DRE) hat demnach einen deutlichen Effekt auf die Promotoraktivität, dessen Signifikanz jedoch nicht gezeigt werden konnte. Neben dem DRE Element sind augenscheinlich weitere Promotorelemente notwendig um die volle Aktivität des Promotors zu erreichen. Sterische Effekte sind denkbar (**Abschnitt 3.3.1** und **Abschnitt 4.3.1**).

Promotor-GUS Linien

Die Promotorfragmente p887 und p584 lösen Promotoraktivität in der gleichen Intensität und den gleichen pflanzlichen Geweben aus. Durch dieses Ergebnis wird bestätigt, dass das kleinere Promotorfragment p584 ausreicht die gleiche Aktivität des CpGRP1 Promotors (im ungestressten Zustand) zu erhalten wie durch das größere Promotorfragment p887. Durch das GUS-Reportergeren konnte die Aktivität des CpGRP1 Promotors in den Blättern bestätigt und erstmals in bestimmten Teilen des Stiels, der Blüte und der Wurzel gezeigt werden. Es erscheint demzufolge denkbar, dass CpGRP1 auch in diesen Teilen der Pflanze eine Funktion erfüllt, die mit einer Befähigung zur Austrocknungstoleranz - wie *C. plantagineum* sie aufweist - einhergeht. Auch Keimblätter und Blattprimordien zeigen Promotoraktivität. Der CpGRP1 Promotor ist in allen untersuchten Stadien der pflanzlichen Entwicklung aktiv. Unterschiede im Expressionsmuster zwischen verschiedenen Promotor-GUS-Linien werden auf die unterschiedliche Lokalisation der Promotor-GUS-Kassette im Genom zurückgeführt (**Abschnitt 3.3.2**).

CpGRP1-Promotoraktivität nach Trockenstress stabil im heterologen System

Während der Promotor des CpGRP1-Gens sowohl nativ in *C. plantagineum*, als auch im heterologen System *A. thaliana* im ungestressten Zustand aktiv ist, nimmt die Promotoraktivität in *C. plantagineum* durch Trockenstress signifikant zu, in *A. thaliana* jedoch signifikant ab. Denkbar ist, dass in *A. thaliana* ein anderes Set aus Transkriptionsfaktoren an den Promotor bindet als in *C. plantagineum*. Interessant ist im Hinblick darauf, dass das zu CpGRP1 homologe Gen AtGRP3 in *A. thaliana* ebenfalls durch Trockenstress herunterreguliert wird (**Abschnitt 3.3.3** und **Abschnitt 4.3.3**).

Die Promotoren der homologen Gene CpGRP1, LbGRP1 und LsGRP1 im Vergleich

Die Promotoren der Gene CpGRP1 und LbGRP1 aus den Trockenstress toleranten Arten *C. plantagineum* und *L. brevidens* werden durch Trockenstress induziert, nicht so der Promotor der Trockenstress sensitiven Art *L. subracemosa*. Dieser Unterschied könnte durch Unterschiede in der Promotorarchitektur begründet sein. In der Tat enthält der Promotor von *L. subracemosa* sowohl weniger allgemeine, als auch weniger mit Trockenstress-Responsivität assoziierte cis-Elemente. Vermutlich gingen im Verlauf der Evolution cis-Elemente verloren,

die in *C. plantagineum* und *L. brevidens* erhalten blieben. Diese Unterschiede könnten durch unterschiedlichen Selektionsdruck im jeweiligen Habitat entstanden sein (**Abschnitt 3.3.4** und **Abschnitt 4.3.4**).

CpGRP1 Überexpressionslinien

Sechs der untersuchten CpGRP1-Überexpressionslinien (6, A, C, F, J, L) zeigen eine signifikante verbesserte Trockenstresstoleranz im Vergleich zum Wildtyp. Die Überexpression von CpGRP1 scheint keinen negativen Einfluss auf Wachstum und Entwicklung der transgenen Pflanzen zu haben. Einige Linien zeigen im Gegenteil sogar einen signifikant größeren Rosetendurchmesser als der Wildtyp. Unter Berücksichtigung der bisherigen Ergebnisse scheint CpGRP1 daher ein geeignetes Kandidatengenen zu sein, durch dessen Überexpression in Nutzpflanzen die Trockenstresstoleranz dieser Arten verbessern werden könnte ohne einen negativen Einfluss auf Wachstum und Entwicklung auszuüben (**Abschnitt 3.4.8** und **Abschnitt 3.4.9**).

5.2 Ausblick

Phänotyp der 35S-CpGRP1-roGFP Linien und Zellwandstruktur

Eine mikroskopische Untersuchung der Blätter der transgenen 35S-CpGRP1-roGFP Überexpressionslinien könne weitere Informationen darüber liefern in welcher räumlichen Orientierung das CpGRP1 Protein in/an der Zellwand bzw. im Apoplast vorliegt und inwiefern es an der Veränderung der Zellwandstruktur im Zuge der Trockenstressantwort beteiligt ist. Hierzu wäre es notwendig (Ultra-)Dünnschnitte der Blätter anzufertigen und mit einer großen Vergrößerung zu arbeiten um die Zellwand in einer ausreichenden Auflösung sehen zu können (**Abschnitt 4.2.2**).

CpGRP1-Promotoraktivität und Transkriptionsfaktoren

Da der Promotor des CpGRP1-Gens in *C. plantagineum* durch Trockenstress aktiviert wird, in *A. thaliana* im Gegensatz dazu die Menge an gebildetem Transkript abnimmt, wäre es interessant die ablaufenden regulatorischen Vorgänge näher zu untersuchen. So könnte man zum Beispiel durch einen Yeast-1-Hybrid Assay ermitteln und vergleichen welche Transkriptionsfaktoren in *C. plantagineum* bzw. *A. thaliana* an nach einer Trockenstressbehandlung an den CpGRP1-Promotor binden (**Abschnitt 4.3.3**).

CpGRP1 Expression in den Wurzeln und Trockenstresstoleranz

Da CpGRP1 in den Wurzeln exprimiert wird und die Ergebnisse der Untersuchungen der Überexpressionslinien einen Hinweis darauf geben, dass die Überexpression von CpGRP1 möglicherweise mit der Länge der Wurzel und mit einer gesteigerten Trockenstresstoleranz

zusammenhängt, wäre es interessant weitere Experimente in diesem Zusammenhang durchzuführen (**Abschnitt 4.3.2** und **Abschnitt 4.4**)

35S-CpGRP1 Überexpressionslinien

Um weitere Informationen dazu zu erhalten, inwiefern die Überexpression von CpGRP1 mit den beobachteten phänotypischen Unterschieden zwischen den CpGRP1-Überexpressionslinien und dem Wildtyp sowie mit der gesteigerte Trockenstresstoleranz einiger Überexpressionslinien zusammenhängt, muss eine belastbare RNA- und Proteinquantifizierung erfolgen.

6 Anhang

A.1 Lichtmikroskopische Aufnahme 35S-CpGRP1

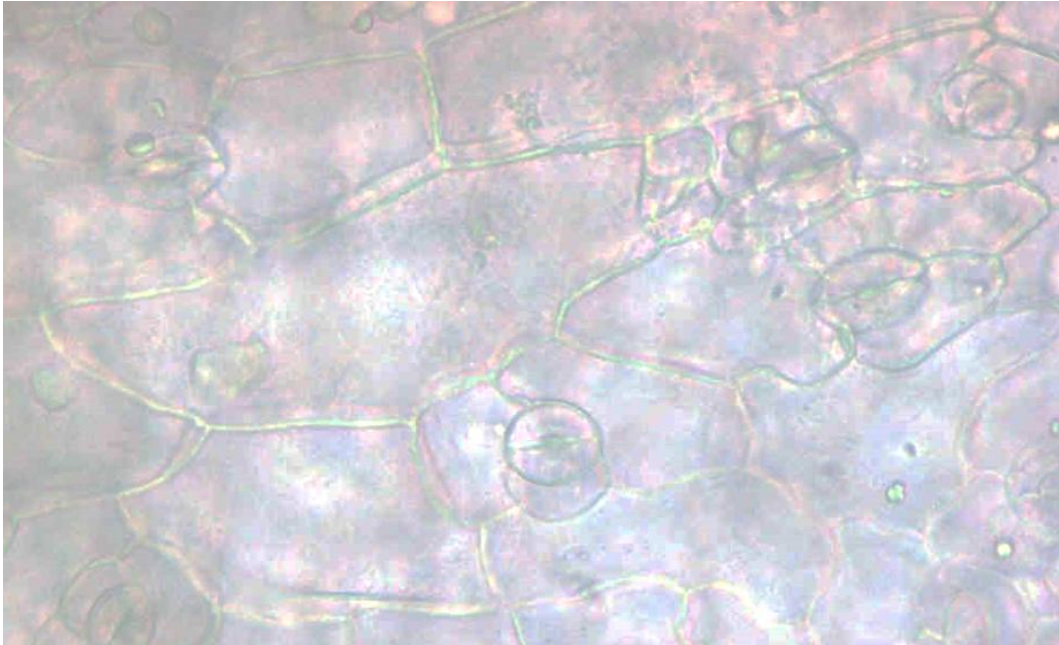


Abbildung 59: Lichtmikroskopische Aufnahme 35S-CpGRP1 Linie C

Aufnahme der Epidermis eines mit 70 % Ethanol entfärbten Blattes der *A. thaliana* Überexpressionslinie 35S-CpGRP1 C in 40facher Vergrößerung

A.2 *In silico* Analyse Promotor

A.2.1 Promotorelementdichte im Vergleich

Allgemeine Promotorelemente in *C. plantagineum*

CAT Box = CAAT (10)

TATABOX1 = TATAAT (2)

TATABOX2 = TATAAAT (3)

TATABOX3 = TATTAAT (1)

TATABOX4 = TATATAA (3)

TATABOX5 = TTATTT (3)

924/ 18 = alle 51 nt

636/ 15 = alle 42 nt

Allgemeine Promotorelemente in *L. brevidens*

CAT Box = CAAT (9)

TATABOX1 = TATAAT (2)

TATABOX2 = TATAAAT (3)

TATABOX4 = TATATAA (2)

TATABOX5 = TTATTT (1)

636/17 = alle 37 nt

Allgemeine Promotorelemente in *L. subracemosa*

CAT Box = CAAT (7)

TATABOX1 = TATAAT (2)

TATABOX2 = TATAAAT (3)

TATABOX3 = TATTAAT (3)

TATABOX4 = TATATAA (3)

TATABOX5 = TTATTT (4)

1164/19 = alle 61 nt

636/ 13 = alle 49 nt

A.2.2 Promotoranalyse mit PLACE

Craterostigma plantagineum

Factor or Site Name		Loc. (Str.)	Signal Sequence	SITE #
GT1CONSENSUS	site	1 (-)	GRWAAW	S000198
WRKY71OS	site	7 (+)	TGAC	S000447
BIHD1OS	site	7 (-)	TGTCA	S000498
PREATPRODH	site	11 (-)	ACTCAT	S000450
CACTFTPPCA1	site	14 (-)	YACT	S000449
CURECORECR	site	15 (+)	GTAC	S000493
CURECORECR	site	15 (-)	GTAC	S000493
DOFCOREZM	site	31 (-)	AAAG	S000265
POLASIG1	site	33 (-)	AATAAA	S000080
CAATBOX1	site	39 (+)	CAAT	S000028
NAPINMOTIFBN	site	52 (-)	TACACAT	S000070
BIHD1OS	site	61 (+)	TGTCA	S000498
WBOXATNPR1	site	62 (-)	TTGAC	S000390
WRKY71OS	site	62 (-)	TGAC	S000447
REALPHALGLHCB21	site	69 (-)	AACCAA	S000362
MYB1AT	site	70 (-)	WAACCA	S000408
GT1CONSENSUS	site	73 (-)	GRWAAW	S000198
GT1GMSCAM4	site	73 (-)	GAAAAA	S000453
GT1CONSENSUS	site	74 (-)	GRWAAW	S000198
DOFCOREZM	site	79 (-)	AAAG	S000265
ARR1AT	site	82 (+)	NGATT	S000454
POLASIG2	site	86 (-)	AATTAAT	S000081
POLASIG3	site	90 (-)	AATAAT	S000088
TATABOX5	site	91 (+)	TTATTT	S000203
GT1CONSENSUS	site	94 (-)	GRWAAW	S000198
GT1GMSCAM4	site	94 (-)	GAAAAA	S000453
POLLEN1LELAT52	site	96 (-)	AGAAA	S000245
POLLEN1LELAT52	site	105 (-)	AGAAA	S000245
DOFCOREZM	site	108 (-)	AAAG	S000265
TAAAGSTKST1	site	108 (-)	TAAAG	S000387
GT1CONSENSUS	site	109 (-)	GRWAAW	S000198
S1FBOXSORPS1L21	site	111 (-)	ATGGTA	S000223
ROOTMOTIFTAPOX1	site	118 (+)	ATATT	S000098
ANAERO1CONSENSUS	site	127 (+)	AAACAAA	S000477

CAATBOX1	site	137	(+)	CAAT	S000028
GATABOX	site	150	(+)	GATA	S000039
IBOX	site	150	(+)	GATAAG	S000124
IBOXCORE	site	150	(+)	GATAA	S000199
IBOXCORENT	site	150	(+)	GATAAGR	S000424
MYBCORE	site	167	(+)	CNGTTR	S000176
RAV1AAT	site	168	(-)	CAACA	S000314
RAV1AAT	site	199	(-)	CAACA	S000314
GATABOX	site	203	(+)	GATA	S000039
GATABOX	site	208	(+)	GATA	S000039
RAV1AAT	site	216	(+)	CAACA	S000314
DPBFCOREDCDC3	site	218	(+)	ACACNNG	S000292
EBOXBNNAPA	site	219	(+)	CANNTG	S000144
MYCATRD22	site	219	(+)	CACATG	S000174
MYCCONSENSUSAT	site	219	(+)	CANNTG	S000407
EBOXBNNAPA	site	219	(-)	CANNTG	S000144
MYCATERD1	site	219	(-)	CATGTG	S000413
MYCCONSENSUSAT	site	219	(-)	CANNTG	S000407
RAV1AAT	site	223	(-)	CAACA	S000314
GT1CONSENSUS	site	238	(+)	GRWAAW	S000198
DOFCOREZM	site	241	(+)	AAAG	S000265
ACGTATERD1	site	250	(+)	ACGT	S000415
CONSERVED11NTZMATP1	site	250	(+)	ACGTATTAAAA	S000301
ACGTATERD1	site	250	(-)	ACGT	S000415
DOFCOREZM	site	258	(+)	AAAG	S000265
CACTFTPPCA1	site	266	(-)	YACT	S000449
POLLEN1LELAT52	site	269	(+)	AGAAA	S000245
TATABOX5	site	271	(-)	TTATTT	S000203
GATABOX	site	277	(+)	GATA	S000039
BOXIINTPATPB	site	278	(+)	ATAGAA	S000296
POLLEN1LELAT52	site	280	(+)	AGAAA	S000245
ECCRCAH1	site	281	(-)	GANTTNC	S000494
DOFCOREZM	site	282	(+)	AAAG	S000265
CBFHV	site	285	(-)	RYCGAC	S000497
DRECRTCOREAT	site	285	(+)	RCCGAC	S000418
LTRECOREATCOR15	site	285	(-)	CCGAC	S000153
CARGCW8GAT	site	290	(+)	CWWWWWWWWG	S000431
CARGCW8GAT	site	290	(-)	CWWWWWWWWG	S000431
DOFCOREZM	site	296	(+)	AAAG	S000265
ECCRCAH1	site	312	(-)	GANTTNC	S000494
ARR1AT	site	327	(+)	NGATT	S000454
TATABOX3	site	329	(-)	TATTAAT	S000110
POLASIG3	site	332	(+)	AATAAT	S000088
ARR1AT	site	341	(-)	NGATT	S000454
GTGANTG10	site	343	(-)	GTGA	S000378
CACTFTPPCA1	site	349	(-)	YACT	S000449
ROOTMOTIFTAPOX1	site	352	(+)	ATATT	S000098
ZDNAFORMINGATCAB1	site	357	(-)	ATACGTGT	S000321
ABRELATERD1	site	358	(-)	ACGTG	S000414
ACGTATERD1	site	359	(+)	ACGT	S000415
ACGTATERD1	site	359	(-)	ACGT	S000415
GATABOX	site	362	(-)	GATA	S000039
IBOXCORENT	site	364	(-)	GATAAGR	S000424
IBOX	site	365	(-)	GATAAG	S000124
IBOXCORE	site	366	(-)	GATAA	S000199
GATABOX	site	367	(-)	GATA	S000039
WRKY71OS	site	377	(+)	TGAC	S000447
BIHD1OS	site	377	(-)	TGTCA	S000498
CAATBOX1	site	380	(+)	CAAT	S000028
CACTFTPPCA1	site	383	(+)	YACT	S000449
CBFHV	site	387	(+)	RYCGAC	S000497
DRECRTCOREAT	site	387	(+)	RCCGAC	S000418
LTRECOREATCOR15	site	388	(+)	CCGAC	S000153
NODCON1GM	site	393	(-)	AAAGAT	S000461
OSE1ROOTNODULE	site	393	(-)	AAAGAT	S000467
DOFCOREZM	site	395	(-)	AAAG	S000265
POLLEN1LELAT52	site	397	(-)	AGAAA	S000245
CARGCW8GAT	site	403	(+)	CWWWWWWWWG	S000431
CARGCW8GAT	site	403	(-)	CWWWWWWWWG	S000431
TATABOX2	site	405	(+)	TATAAAT	S000109
LIBOXATPDF1	site	407	(+)	TAAATGYA	S000386
CACTFTPPCA1	site	413	(+)	YACT	S000449
CACTFTPPCA1	site	420	(+)	YACT	S000449
CCAATBOX1	site	431	(+)	CCAAT	S000030
CAATBOX1	site	432	(+)	CAAT	S000028
CAATBOX1	site	438	(-)	CAAT	S000028

L1BOXATPDF1	site	440 (-)	TAAATGYA	S000386
CARGCW8GAT	site	442 (+)	CWWWWWWWG	S000431
CARGCW8GAT	site	442 (-)	CWWWWWWWG	S000431
TATABOX2	site	443 (-)	TATAAAT	S000109
GATABOX	site	451 (+)	GATA	S000039
GT1CONSENSUS	site	451 (+)	GRWAAW	S000198
IBOXCORE	site	451 (+)	GATAA	S000199
GT1MOTIFPSRBCS	site	470 (+)	KWGTGRWAAWRW	S000051
CACTFTPPCA1	site	471 (-)	YACT	S000449
GT1CONSENSUS	site	474 (+)	GRWAAW	S000198
ROOTMOTIFTAPOX1	site	477 (-)	ATATT	S000098
MYBPZM	site	491 (+)	CCWACC	S000179
CCAATBOX1	site	495 (+)	CCAAT	S000030
CAATBOX1	site	496 (+)	CAAT	S000028
CACTFTPPCA1	site	503 (-)	YACT	S000449
INRNTPSADB	site	509 (+)	YTCANTYY	S000395
POLLEN1LELAT52	site	513 (-)	AGAAA	S000245
DOFCOREZM	site	528 (+)	AAAG	S000265
RYREPEATBNNAPA	site	535 (+)	CATGCA	S000264
POLLEN1LELAT52	site	541 (+)	AGAAA	S000245
TATABOX5	site	543 (-)	TTATTT	S000203
GTGANTG10	site	563 (-)	GTGA	S000378
CCAATBOX1	site	566 (+)	CCAAT	S000030
CAATBOX1	site	567 (+)	CAAT	S000028
POLASIG1	site	568 (+)	AATAAA	S000080
WBOXPCWRKY1	site	588 (+)	TTTGACY	S000310
WBOXATNPR1	site	589 (+)	TTGAC	S000390
WBOXHVIS01	site	590 (+)	TGACT	S000442
WBOXNTERF3	site	590 (+)	TGACY	S000457
WRKY710S	site	590 (+)	TGAC	S000447
CURECORECR	site	600 (+)	GTAC	S000493
CURECORECR	site	600 (-)	GTAC	S000493
CACTFTPPCA1	site	601 (+)	YACT	S000449
DOFCOREZM	site	609 (-)	AAAG	S000265
TAAAGSTKST1	site	609 (-)	TAAAG	S000387
POLASIG1	site	610 (-)	AATAAA	S000080
PRECONSCRHSP70A	site	627 (+)	SCGAYNRNNNNNNNNNNNNNNNNH	S000506
GATABOX	site	634 (-)	GATA	S000039
TAAAGSTKST1	site	650 (+)	TAAAG	S000387
DOFCOREZM	site	651 (+)	AAAG	S000265
NODCON1GM	site	651 (+)	AAAGAT	S000461
OSE1ROOTNODULE	site	651 (+)	AAAGAT	S000467
GATABOX	site	654 (+)	GATA	S000039
ROOTMOTIFTAPOX1	site	655 (+)	ATATT	S000098
GATABOX	site	665 (+)	GATA	S000039
DPBFCOREDCDC3	site	668 (+)	ACACNNG	S000292
ABRERATCAL	site	669 (+)	MACGYGB	S000507
CGCGBOXAT	site	670 (+)	VCGCGB	S000501
CGCGBOXAT	site	670 (-)	VCGCGB	S000501
TATABOX4	site	679 (+)	TATATAA	S000111
ROOTMOTIFTAPOX1	site	684 (-)	ATATT	S000098
ROOTMOTIFTAPOX1	site	685 (+)	ATATT	S000098
ABRELATERD1	site	696 (+)	ACGTG	S000414
ACGTATERD1	site	696 (+)	ACGT	S000415
ACGTATERD1	site	696 (-)	ACGT	S000415
CACTFTPPCA1	site	704 (-)	YACT	S000449
DOFCOREZM	site	710 (-)	AAAG	S000265
POLASIG2	site	715 (-)	AATATAA	S000081
TATABOX4	site	720 (-)	TATATAA	S000111
TATABOX4	site	721 (+)	TATATAA	S000111
CAATBOX1	site	730 (+)	CAAT	S000028
ARR1AT	site	731 (-)	NGATT	S000454
MYB2CONSENSUSAT	site	746 (+)	YAACKG	S000409
MYBCORE	site	746 (-)	CNGTTR	S000176
MYBCOREATCYCB1	site	747 (+)	AACGG	S000502
CACTFTPPCA1	site	764 (-)	YACT	S000449
CACTFTPPCA1	site	767 (-)	YACT	S000449
CACTFTPPCA1	site	770 (-)	YACT	S000449
SORLIPLAT	site	771 (-)	GCCAC	S000482
CAATBOX1	site	786 (+)	CAAT	S000028
ARR1AT	site	787 (-)	NGATT	S000454
GATABOX	site	800 (-)	GATA	S000039
IBOXCORENT	site	802 (-)	GATAAGR	S000424
IBOX	site	803 (-)	GATAAG	S000124
IBOXCORE	site	804 (-)	GATAA	S000199
GATABOX	site	805 (-)	GATA	S000039

NODCON1GM	site	806	(-)	AAAGAT	S000461
OSE1ROOTNODULE	site	806	(-)	AAAGAT	S000467
DOFCOREZM	site	808	(-)	AAAG	S000265
-10PEHVPSBD	site	817	(+)	TATTCT	S000392
CARGCW8GAT	site	827	(+)	CWWWWWWWWG	S000431
CARGCW8GAT	site	827	(-)	CWWWWWWWWG	S000431
TATABOX2	site	828	(+)	TATAAAT	S000109
ABREOSRAB21	site	836	(-)	ACGTSSSC	S000012
ACGTATERD1	site	840	(+)	ACGT	S000415
ACGTATERD1	site	840	(-)	ACGT	S000415
DOFCOREZM	site	854	(-)	AAAG	S000265
TAAAGSTKST1	site	854	(-)	TAAAG	S000387
GTGANTG10	site	861	(-)	GTGA	S000378
ECCRCRH1	site	866	(-)	GANTTNC	S000494
ARR1AT	site	869	(-)	NGATT	S000454
CACTFTPPCA1	site	875	(-)	YACT	S000449
CURECORECR	site	876	(+)	GTAC	S000493
CURECORECR	site	876	(-)	GTAC	S000493
RAV1AAT	site	879	(+)	CAACA	S000314
CIACADIANLELHC	site	882	(+)	CAANNNNATC	S000252
SEF4MOTIFGM7S	site	882	(-)	RTTTTTTR	S000103
-10PEHVPSBD	site	891	(-)	TATTCT	S000392
POLASIG1	site	893	(+)	AATAAA	S000080
DPBFCOREDCDC3	site	899	(+)	ACACNNG	S000292
ABRERATCAL	site	900	(+)	MACGYGB	S000507
CGCGBOXAT	site	901	(+)	VCGCGB	S000501
CGCGBOXAT	site	901	(-)	VCGCGB	S000501
CAATBOX1	site	913	(-)	CAAT	S000028

Lindernia brevidens

Factor or Site Name	Loc. (Str.)	Signal	Sequence	SITE #
GT1CONSENSUS	14	(-)	GRWAAW	S000198
GT1GMSCAM4	14	(-)	GAAAAA	S000453
GTGANTG10	38	(-)	GTGA	S000378
CACTFTPPCA1	39	(+)	YACT	S000449
ABRERATCAL	49	(+)	MACGYGB	S000507
CGCGBOXAT	50	(-)	VCGCGB	S000501
ABRERATCAL	50	(-)	MACGYGB	S000507
CGCGBOXAT	50	(+)	VCGCGB	S000501
CRTDREHVCBF2	57	(-)	GTCGAC	S000411
CBFHV	57	(-)	RYCGAC	S000497
CRTDREHVCBF2	57	(+)	GTCGAC	S000411
CBFHV	57	(+)	RYCGAC	S000497
HEXAMERATH4	59	(-)	CCGTG	S000146
CGACGOSAMY3	59	(+)	CGACG	S000205
SORLIP2AT	63	(-)	GGGCC	S000483
GATABOX	75	(-)	GATA	S000039
CARGCW8GAT	78	(-)	CWWWWWWWWG	S000431
CARGCW8GAT	78	(+)	CWWWWWWWWG	S000431
ARR1AT	86	(+)	NGATT	S000454
DOFCOREZM	105	(+)	AAAG	S000265
GATABOX	118	(+)	GATA	S000039
IBOX	118	(+)	GATAAG	S000124
IBOXCORE	118	(+)	GATAA	S000199
IBOXCORENT	118	(+)	GATAAGR	S000424
CACTFTPPCA1	126	(+)	YACT	S000449
PREATPRODH	127	(+)	ACTCAT	S000450
POLASIG1	132	(-)	AATAAA	S000080
POLLEN1LELAT52	144	(+)	AGAAA	S000245
DOFCOREZM	146	(+)	AAAG	S000265
ECCRCRH1	149	(-)	GANTTNC	S000494
GT1CONSENSUS	149	(+)	GRWAAW	S000198
ARR1AT	152	(-)	NGATT	S000454
CACTFTPPCA1	158	(+)	YACT	S000449
CAATBOX1	176	(+)	CAAT	S000028
SURECOREATSULTR11	185	(+)	GAGAC	S000499
EBOXBNNAPA	196	(-)	CANNNG	S000144
MYCCONSUSUSAT	196	(-)	CANNNG	S000407
MYCATERD1	196	(-)	CATGTG	S000413
EBOXBNNAPA	196	(+)	CANNNG	S000144
MYCATRD22	196	(+)	CACATG	S000174
MYCCONSUSUSAT	196	(+)	CANNNG	S000407
RYREPEATBNNAPA	198	(+)	CATGCA	S000264
GATABOX	217	(-)	GATA	S000039
WBOXNTCHN48	232	(+)	CTGACY	S000508

WRKY71OS	233	(+)	TGAC	S000447
WBOXNTERF3	233	(+)	TGACY	S000457
TATABOX4	243	(+)	TATATAA	S000111
TATABOX2	253	(-)	TATAAAT	S000109
ROOTMOTIFTAPOX1	262	(-)	ATATT	S000098
TATABOX2	264	(+)	TATAAAT	S000109
TATABOX5	267	(-)	TTATTT	S000203
POLASIG1	268	(+)	AATAAA	S000080
TAAAGSTKST1	270	(+)	TAAAG	S000387
DOFCOREZM	271	(+)	AAAG	S000265
SITEIIATCYTC	278	(-)	TGGGCY	S000474
SORLIP2AT	278	(-)	GGGCC	S000483
CACTFTPPCA1	287	(-)	YACT	S000449
ROOTMOTIFTAPOX1	291	(-)	ATATT	S000098
ROOTMOTIFTAPOX1	292	(+)	ATATT	S000098
INRNTPSADB	295	(+)	YTCANTYY	S000395
GT1CONSENSUS	298	(-)	GRWAAW	S000198
POLLEN1LELAT52	300	(-)	AGAAA	S000245
DOFCOREZM	303	(-)	AAAG	S000265
ECCRCAH1	307	(-)	GANTTNC	S000494
GATABOX	315	(-)	GATA	S000039
CACTFTPPCA1	336	(+)	YACT	S000449
EBOXBNNAPA	340	(-)	CANNTG	S000144
MYCCONSUSAT	340	(-)	CANNTG	S000407
MYB2CONSUSAT	340	(-)	YAACKG	S000409
EBOXBNNAPA	340	(+)	CANNTG	S000144
MYBCORE	340	(+)	CNGTTR	S000176
MYCCONSUSAT	340	(+)	CANNTG	S000407
ARR1AT	344	(+)	NGATT	S000454
ARR1AT	350	(+)	NGATT	S000454
ABRERATCAL	361	(-)	MACGYGB	S000507
DPBFCOREDCDC3	361	(+)	ACACNNG	S000292
CACGTGMOTIF	362	(-)	CACGTG	S000042
EBOXBNNAPA	362	(-)	CANNTG	S000144
DPBFCOREDCDC3	362	(-)	ACACNNG	S000292
MYCCONSUSAT	362	(-)	CANNTG	S000407
ABRELATERD1	362	(-)	ACGTG	S000414
CACGTGMOTIF	362	(+)	CACGTG	S000042
EBOXBNNAPA	362	(+)	CANNTG	S000144
MYCCONSUSAT	362	(+)	CANNTG	S000407
ABRERATCAL	362	(+)	MACGYGB	S000507
ACGTATERD1	363	(-)	ACGT	S000415
ACGTABREMOTIFA2OSEM	363	(+)	ACGTGKC	S000394
ABRELATERD1	363	(+)	ACGTG	S000414
ACGTATERD1	363	(+)	ACGT	S000415
GADOWNAT	363	(+)	ACGTGTC	S000438
TGTCACACMCUCUMISIN	366	(+)	TGTCACA	S000422
BIHD1OS	366	(+)	TGTCA	S000498
WRKY71OS	367	(-)	TGAC	S000447
GTGANTG10	368	(-)	GTGA	S000378
CAATBOX1	371	(+)	CAAT	S000028
ARR1AT	372	(-)	NGATT	S000454
NODCON1GM	373	(-)	AAAGAT	S000461
OSE1ROOTNODULE	373	(-)	AAAGAT	S000467
DOFCOREZM	375	(-)	AAAG	S000265
CACTFTPPCA1	390	(+)	YACT	S000449
ROOTMOTIFTAPOX1	394	(+)	ATATT	S000098
CPBCSPOR	395	(+)	TATTAG	S000491
GATABOX	434	(-)	GATA	S000039
POLASIG3	440	(-)	AATAAT	S000088
CAATBOX1	447	(+)	CAAT	S000028
ROOTMOTIFTAPOX1	448	(-)	ATATT	S000098
TATABOX4	456	(-)	TATATAA	S000111
GT1CONSENSUS	464	(-)	GRWAAW	S000198
RAV1AAT	478	(+)	CAACA	S000314
GATABOX	484	(+)	GATA	S000039
CACTFTPPCA1	487	(-)	YACT	S000449
TAAAGSTKST1	489	(+)	TAAAG	S000387
DOFCOREZM	490	(+)	AAAG	S000265
QARBNEXTA	514	(+)	AACGTGT	S000244
T/GBOXATPIN2	514	(+)	AACGTG	S000458
ABRERATCAL	514	(+)	MACGYGB	S000507
ACGTATERD1	515	(-)	ACGT	S000415
ABRELATERD1	515	(+)	ACGTG	S000414
ACGTATERD1	515	(+)	ACGT	S000415
CACTFTPPCA1	525	(-)	YACT	S000449

CACTFTPPCA1	530	(-)	YACT	S000449
PREATPRODH	535	(+)	ACTCAT	S000450
CACTFTPPCA1	559	(+)	YACT	S000449
MYBCORE	564	(-)	CNGTTR	S000176
RAV1AAT	564	(+)	CAACA	S000314
MYBPZM	570	(+)	CCWACC	S000179
REALPHALGLHCB21	572	(+)	AACCAA	S000362
CACTFTPPCA1	579	(+)	YACT	S000449
ROOTMOTIFTAPOX1	586	(+)	ATATT	S000098
GATABOX	593	(+)	GATA	S000039
GATABOX	597	(-)	GATA	S000039
CAATBOX1	600	(+)	CAAT	S000028
ARR1AT	601	(-)	NGATT	S000454
GARE2OSREP1	608	(+)	TAACGTA	S000420
ACGTATERD1	610	(-)	ACGT	S000415
ACGTATERD1	610	(+)	ACGT	S000415
GATABOX	613	(-)	GATA	S000039
IBOXCORENT	615	(-)	GATAAGR	S000424
IBOX	616	(-)	GATAAG	S000124
IBOXCORE	617	(-)	GATAA	S000199
GATABOX	618	(-)	GATA	S000039
ROOTMOTIFTAPOX1	631	(-)	ATATT	S000098
ROOTMOTIFTAPOX1	632	(+)	ATATT	S000098
CARGCW8GAT	652	(-)	CWWWWWWWWG	S000431
CARGCW8GAT	652	(+)	CWWWWWWWWG	S000431
TATABOX2	653	(+)	TATAAAT	S000109
GATABOX	661	(+)	GATA	S000039
GT1CONSENSUS	666	(+)	GRWAAW	S000198
GT1CONSENSUS	677	(-)	GRWAAW	S000198
GT1CONSENSUS	678	(-)	GRWAAW	S000198
GTGANTG10	688	(-)	GTGA	S000378
CIACADIANLELHC	691	(+)	CAANNNNATC	S000252
RAV1AAT	691	(+)	CAACA	S000314
ARR1AT	697	(-)	NGATT	S000454
MYB2AT	700	(-)	TAACTG	S000177
MYB2CONSENSUSAT	700	(-)	YAACKG	S000409
MYBCORE	700	(+)	CNGTTR	S000176

Lindernia subracemosa

Factor or Site Name	Loc. (Str.)	Signal	Sequence	SITE #
CARGCW8GAT	1	(-)	CWWWWWWWWG	S000431
CAATBOX1	1	(+)	CAAT	S000028
CARGCW8GAT	1	(+)	CWWWWWWWWG	S000431
TATABOX3	3	(-)	TATTAAT	S000110
SP8BFIBSP8BIB	6	(-)	TACTATT	S000184
CACTFTPPCA1	9	(-)	YACT	S000449
DOFCOREZM	16	(-)	AAAG	S000265
INRNTPSADB	20	(-)	YTCANTYY	S000395
-10PEHVPSBD	26	(-)	TATTCT	S000392
POLASIG1	28	(+)	AATAAA	S000080
SEF4MOTIFGM7S	30	(-)	RTTTTTR	S000103
CEREGLUBOX2PSLEGA	39	(+)	TGAAAAC	S000033
NTBBF1ARROLB	44	(+)	ACTTTA	S000273
DOFCOREZM	45	(-)	AAAG	S000265
TAAAGSTKST1	45	(-)	TAAAG	S000387
WRKY71OS	50	(+)	TGAC	S000447
WBOXNTERF3	50	(+)	TGACY	S000457
CAREOSREP1	54	(+)	CAACTC	S000421
NODCON2GM	57	(+)	CTCTT	S000462
OSE2ROOTNODULE	57	(+)	CTCTT	S000468
DOFCOREZM	59	(-)	AAAG	S000265
GTGANTG10	62	(-)	GTGA	S000378
CCAATBOX1	65	(+)	CCAAT	S000030
LEAFYATAG	65	(+)	CCAATGT	S000432
CAATBOX1	66	(+)	CAAT	S000028
WBOXHVIS01	75	(+)	TGACT	S000442
WRKY71OS	75	(+)	TGAC	S000447
WBOXNTERF3	75	(+)	TGACY	S000457
-300ELEMENT	87	(+)	TGHAAARK	S000122
DOFCOREZM	91	(+)	AAAG	S000265
GT1CONSENSUS	101	(+)	GRWAAW	S000198
ARR1AT	120	(+)	NGATT	S000454

EECCRCAH1	121	(+)	GANTTNC	S000494
GT1CONSENSUS	122	(-)	GRWAAW	S000198
GT1CONSENSUS	140	(-)	GRWAAW	S000198
POLLEN1LELAT52	142	(-)	AGAAA	S000245
CACTFTPPCA1	161	(-)	YACT	S000449
GATABOX	192	(+)	GATA	S000039
ROOTMOTIFTAPOX1	204	(+)	ATATT	S000098
CAATBOX1	206	(-)	CAAT	S000028
GATABOX	209	(+)	GATA	S000039
GT1CONSENSUS	209	(+)	GRWAAW	S000198
IBOXCORE	209	(+)	GATAA	S000199
ROOTMOTIFTAPOX1	216	(-)	ATATT	S000098
S1FSORPL21	221	(+)	ATGGTATT	S000215
S1FBOXSORPS1L21	221	(+)	ATGGTA	S000223
TATABOX3	225	(+)	TATTAAT	S000110
INRNTPSADB	237	(-)	YTCANTYY	S000395
GTGANTG10	271	(+)	GTGA	S000378
PRECONSCRHSP70A	314	(-)	SCGAYNRNNNNNNNNNNNNNNHHD	S000506
DOFCOREZM	317	(-)	AAAG	S000265
POLLEN1LELAT52	318	(-)	AGAAA	S000245
IBOXCORE	331	(-)	GATAA	S000199
GATABOX	332	(-)	GATA	S000039
CACTFTPPCA1	337	(+)	YACT	S000449
CGACGOSAMY3	362	(+)	CGACG	S000205
HEXAMERATH4	365	(-)	CCGTG	S000146
PRECONSCRHSP70A	365	(-)	SCGAYNRNNNNNNNNNNNNNNHHD	S000506
CGACGOSAMY3	365	(+)	CGACG	S000205
EBOXBNNAPA	378	(-)	CANNTG	S000144
MYCCONSUSAT	378	(-)	CANNTG	S000407
EBOXBNNAPA	378	(+)	CANNTG	S000144
MYCCONSUSAT	378	(+)	CANNTG	S000407
LTRECOREATCOR15	384	(-)	CCGAC	S000153
ARR1AT	387	(+)	NGATT	S000454
CAATBOX1	389	(-)	CAAT	S000028
GTGANTG10	392	(+)	GTGA	S000378
NODCON1GM	395	(-)	AAAGAT	S000461
OSE1ROOTNODULE	395	(-)	AAAGAT	S000467
DOFCOREZM	397	(-)	AAAG	S000265
TAAAGSTKST1	397	(-)	TAAAG	S000387
GT1CONSENSUS	398	(-)	GRWAAW	S000198
IBOXCORE	399	(-)	GATAA	S000199
GATABOX	400	(-)	GATA	S000039
NODCON1GM	401	(-)	AAAGAT	S000461
OSE1ROOTNODULE	401	(-)	AAAGAT	S000467
DOFCOREZM	403	(-)	AAAG	S000265
GATABOX	408	(-)	GATA	S000039
MYBST1	408	(-)	GGATA	S000180
CACTFTPPCA1	420	(+)	YACT	S000449
BIHD1OS	423	(+)	TGTCA	S000498
WRKY71OS	424	(-)	TGAC	S000447
GT1CONSENSUS	429	(+)	GRWAAW	S000198
INRNTPSADB	430	(-)	YTCANTYY	S000395
ACGTABOX	439	(-)	TACGTA	S000130
ACGTABOX	439	(+)	TACGTA	S000130
ACGTATERD1	440	(-)	ACGT	S000415
ACGTATERD1	440	(+)	ACGT	S000415
CACTFTPPCA1	445	(+)	YACT	S000449
DOFCOREZM	447	(-)	AAAG	S000265
GT1CONSENSUS	448	(-)	GRWAAW	S000198
POLLEN1LELAT52	469	(+)	AGAAA	S000245
SP8BFIBSP8AIB	484	(-)	ACTGTGTA	S000183
CACTFTPPCA1	489	(-)	YACT	S000449
ANAERO2CONSENSUS	492	(-)	AGCAGC	S000478
MYB1AT	506	(-)	WAACCA	S000408
-10PEHVPSBD	510	(+)	TATTCT	S000392
INRNTPSADB	521	(+)	YTCANTYY	S000395
GT1CONSENSUS	524	(-)	GRWAAW	S000198
POLLEN1LELAT52	526	(-)	AGAAA	S000245
GATABOX	531	(+)	GATA	S000039
GATABOX	541	(+)	GATA	S000039
MYB1AT	550	(+)	WAACCA	S000408
POLASIG1	559	(+)	AATAAA	S000080
NTBBF1ARROLB	561	(-)	ACTTTA	S000273
TAAAGSTKST1	561	(+)	TAAAG	S000387
DOFCOREZM	562	(+)	AAAG	S000265
ROOTMOTIFTAPOX1	568	(-)	ATATT	S000098

ROOTMOTIFTAPOX1	569	(+)	ATATT	S000098
GT1CONSENSUS	571	(-)	GRWAAW	S000198
GT1CONSENSUS	572	(-)	GRWAAW	S000198
TATABOX5	581	(-)	TTATTT	S000203
ARR1AT	592	(+)	NGATT	S000454
POLASIG3	594	(-)	AATAAT	S000088
TATABOX5	595	(+)	TTATTT	S000203
CACTFTPPCA1	600	(+)	YACT	S000449
GATABOX	605	(+)	GATA	S000039
GT1CONSENSUS	605	(+)	GRWAAW	S000198
IBOXCORE	605	(+)	GATAA	S000199
TATABOX5	609	(-)	TTATTT	S000203
POLASIG1	610	(+)	AATAAA	S000080
CAATBOX1	617	(+)	CAAT	S000028
GTGANTG10	627	(-)	GTGA	S000378
CACTFTPPCA1	628	(+)	YACT	S000449
DRECRTCOREAT	632	(+)	RCCGAC	S000418
CBFHV	632	(+)	RYCGAC	S000497
LTRECOREATCOR15	633	(+)	CCGAC	S000153
PRECONSCRHSP70A	633	(+)	SCGAYNRNNNNNNNNNNNNNNNNHHD	S000506
GATABOX	654	(+)	GATA	S000039
CACTFTPPCA1	657	(-)	YACT	S000449
GTGANTG10	660	(+)	GTGA	S000378
DOFCOREZM	663	(+)	AAAG	S000265
ARR1AT	684	(-)	NGATT	S000454
INRNTPSADB	688	(+)	YTCANTYY	S000395
CAATBOX1	690	(+)	CAAT	S000028
ARR1AT	691	(-)	NGATT	S000454
TATABOX2	701	(-)	TATAAAT	S000109
CACTFTPPCA1	706	(+)	YACT	S000449
CGACGOSAMY3	711	(+)	CGACG	S000205
SITEIIATCYTC	728	(+)	TGGGCY	S000474
SORLIP2AT	729	(+)	GGGCC	S000483
GCCCORE	731	(+)	GCCGCC	S000430
E2FCONSENSUS	732	(-)	WTTSSCSS	S000476
DOFCOREZM	737	(+)	AAAG	S000265
CACTFTPPCA1	743	(-)	YACT	S000449
SEF4MOTIFGM7S	745	(-)	RTTTTTR	S000103
POLLEN1LELAT52	755	(-)	AGAAA	S000245
EBOXBNNAPA	760	(-)	CANNTG	S000144
MYCCONSENSUSAT	760	(-)	CANNTG	S000407
EBOXBNNAPA	760	(+)	CANNTG	S000144
MYCCONSENSUSAT	760	(+)	CANNTG	S000407
RYREPEATBNNAPA	764	(-)	CATGCA	S000264
RYREPEATVFLEB4	766	(-)	CATGCATG	S000102
RYREPEATLEGUMINBOX	766	(+)	CATGCAY	S000100
RYREPEATVFLEB4	766	(+)	CATGCATG	S000102
RYREPEATGMGY2	766	(+)	CATGCAT	S000105
RYREPEATBNNAPA	766	(+)	CATGCA	S000264
RYREPEATLEGUMINBOX	767	(-)	CATGCAY	S000100
RYREPEATGMGY2	767	(-)	CATGCAT	S000105
RYREPEATBNNAPA	768	(-)	CATGCA	S000264
RYREPEATVFLEB4	770	(-)	CATGCATG	S000102
RYREPEATLEGUMINBOX	770	(+)	CATGCAY	S000100
RYREPEATVFLEB4	770	(+)	CATGCATG	S000102
RYREPEATGMGY2	770	(+)	CATGCAT	S000105
RYREPEATBNNAPA	770	(+)	CATGCA	S000264
RYREPEATLEGUMINBOX	771	(-)	CATGCAY	S000100
RYREPEATGMGY2	771	(-)	CATGCAT	S000105
RYREPEATBNNAPA	772	(-)	CATGCA	S000264
RYREPEATBNNAPA	780	(+)	CATGCA	S000264
CACTFTPPCA1	786	(-)	YACT	S000449
ANAERO1CONSENSUS	789	(+)	AAACAAA	S000477
TBOXATGAPB	792	(-)	ACTTTG	S000383
DOFCOREZM	793	(+)	AAAG	S000265
CACTFTPPCA1	795	(-)	YACT	S000449
CCAATBOX1	807	(+)	CCAAT	S000030
CAATBOX1	808	(+)	CAAT	S000028
POLASIG1	809	(+)	AATAAA	S000080
ARR1AT	813	(-)	NGATT	S000454
CAATBOX1	818	(-)	CAAT	S000028
CCAATBOX1	818	(-)	CCAAT	S000030
WBBOXPCWRKY1	828	(+)	TTTGACY	S000310
WBOXATNPR1	829	(+)	TTGAC	S000390
WBOXHVIS01	830	(+)	TGACT	S000442
WRKY710S	830	(+)	TGAC	S000447

WBOXNTERF3	830	(+)	TGACY	S000457
ECCRCAH1	831	(+)	GANTTNC	S000494
TATABOX5	841	(+)	TTATTT	S000203
SEF4MOTIFGM7S	843	(+)	RTTTTTR	S000103
POLASIG1	846	(-)	AATAAA	S000080
TATABOX5	847	(+)	TTATTT	S000203
CACTFTPPCA1	859	(-)	YACT	S000449
ARR1AT	866	(+)	NGATT	S000454
GATABOX	883	(-)	GATA	S000039
MYBST1	883	(-)	GGATA	S000180
TATABOX4	902	(-)	TATATAA	S000111
GATABOX	917	(+)	GATA	S000039
TATAPVTRNALEU	919	(-)	TTTATATA	S000340
TATABOX4	919	(+)	TATATAA	S000111
SEF1MOTIF	921	(-)	ATATTTAWW	S000006
TATABOX2	921	(+)	TATAAAT	S000109
ROOTMOTIFTAPOX1	925	(-)	ATATT	S000098
ACGTATERD1	932	(-)	ACGT	S000415
ABRELATERD1	932	(+)	ACGTG	S000414
ACGTATERD1	932	(+)	ACGT	S000415
DOFCOREZM	946	(-)	AAAG	S000265
POLASIG2	951	(-)	AATTTAA	S000081
TATABOX4	956	(-)	TATATAA	S000111
CACTFTPPCA1	965	(+)	YACT	S000449
PREATPRODH	966	(+)	ACTCAT	S000450
CACTFTPPCA1	982	(-)	YACT	S000449
WBOXHVIS01	990	(-)	TGACT	S000442
WBOXNTERF3	990	(-)	TGACY	S000457
WRKY71OS	991	(-)	TGAC	S000447
GATABOX	1002	(-)	GATA	S000039
MYBCORE	1008	(-)	CNGTTR	S000176
RAVLAAT	1008	(+)	CAACA	S000314
CACTFTPPCA1	1027	(-)	YACT	S000449
CACTFTPPCA1	1030	(-)	YACT	S000449
TATABOX3	1037	(+)	TATTAAT	S000110
GATABOX	1054	(+)	GATA	S000039
GT1CONSENSUS	1054	(+)	GRWAAW	S000198
IBOXCORE	1054	(+)	GATAA	S000199
ARR1AT	1057	(-)	NGATT	S000454
GATABOX	1062	(-)	GATA	S000039
GATABOX	1069	(-)	GATA	S000039
IBOXCORENT	1071	(-)	GATAAGR	S000424
IBOX	1072	(-)	GATAAG	S000124
IBOXCORE	1073	(-)	GATAA	S000199
GATABOX	1074	(-)	GATA	S000039
ARR1AT	1083	(+)	NGATT	S000454
TATABOX1	1094	(+)	CTATAAATAC	S000108
TATABOX2	1095	(+)	TATAAAT	S000109
SITEIIATCYTC	1125	(-)	TGGGCY	S000474
TATABOX5	1136	(-)	TTATTT	S000203
CACTFTPPCA1	1141	(-)	YACT	S000449
CURECORECR	1142	(-)	GTAC	S000493
CURECORECR	1142	(+)	GTAC	S000493
PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A	1146	(-)	CCTTTT	S000259
DOFCOREZM	1147	(+)	AAAG	S000265
//				

A.2.3 Promotoralignments

Verwendetes Alignment tool: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/>

C.plantagineum Promotor oben, *L. brevidens* Promotor unten; Beide mit UTR

Global alignment stretcher emboss

```

Program: stretcher
# Length: 946
# Identity: 424/946 (44.8%)

```

Similarity: 424/946 (44.8%)
 # Gaps: 332/946 (35.1%)
 # Score: -640

```

EMBOSS_001      1 ATTTTCTGACATGAGTACCTATGTATAAAACTTTTATCAATTAGGTATT      50
  ||...|| |.|||||. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
EMBOSS_001      1 ATCATAT-ATATGATTC-----AAACCCGTGAATGAA--AGCTATT      38
EMBOSS_001     51 T-ATGTGTAGATGTCAAATTTGGTTTTTCCTTGATTTAATTATTTTTC      99
  . | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
EMBOSS_001     39 CCATGATAAGAACAACACTCATTTA-----TTCGATG--AAGAAA-----      73
EMBOSS_001    100 TTGCATTTCCTTACCATCATATTCCTCAAACAAAACACAATTTGATGCA-     148
  |...|...| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
EMBOSS_001     74 --GAAATCAGCAC-----TAATGCT-AAACTAAACA-----ATGCC     108
EMBOSS_001    149 AGATAAGGGGTCTATGAGCTGTGGAGAATGCTCATCAAATAGTTTATA     198
  |||. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
EMBOSS_001    109 AGAGA-----CTGCAACCACATGC-----AAGACATTA-A     137
EMBOSS_001    199 TGTTGATATGATATGATCAACGCATGTTGAAAACCTATGGGAAAAGCTAA     248
  ||...|||.|| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
EMBOSS_001    138 TGCATATCTCAT---TCATGGCCTG---ACCCTAT-----ATATAT     172
EMBOSS_001    249 AACGTATTAAGCCATAGTAGAAATAAGATAGAAAGTCGGCATATAAAA     298
  ||||.|||||. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
EMBOSS_001    173 AACGCATTTATA--CAA-TATAAATAA-----                    197
EMBOSS_001    299 GTCTAGCATGGAGGTAAGTCTAGGACATGGATTAATAATTTCGAATCACCA     348
  ||.|||||. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
EMBOSS_001    198 ----AGGATGGCC-----CAAGAAGTAAATATTC-----                    222
EMBOSS_001    349 AGTATATTACACGTATCTTATCTAACTATGACAATACTGCCGACATTTTT     398
  ||.|||||. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
EMBOSS_001    223 ---ATTTCTTTGGAAGT--CCTATCTATTA-----AGTTTG     254
EMBOSS_001    399 TCTGCATATAAATGCCTACTGCTACTGATCCTTCCAATACATTGCATTTAT     448
  .||. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
EMBOSS_001    255 GCTC-----TCCACT--CAGTTGAT-----TTTGATTTTT     282
EMBOSS_001    449 ATGATAAACATAATAACTACGGAGTGGAAATATACGGAAATGGCCTACCAA     498
  . | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
EMBOSS_001    283 TT--TACACGTG-TCACAATCTTTG---TGATGGAAC-----                    315
EMBOSS_001    499 TGAAGTAAATTTCATTTCTCAACCACGCAAAGCCCCATGCAAGAAATAA     548
  |. |||. || | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
EMBOSS_001    316 ----ACTATATT-----AGAACC-----AAATTA     337
EMBOSS_001    549 CATGTAGAGAGGACTCACCAATAAATCCGTAGGGACAGTTTGACTTGT     598
  |. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
EMBOSS_001    338 ---GAACAGACGA-TCTC--ATAC---CCCTA-----TCTTATT     367
EMBOSS_001    599 CGTACTTCTTCTTTATTACATTACAGATCCGATCATATCTCCATCTAGGC     648
  ..|||. |. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
EMBOSS_001    368 ATTACA--ATATATGTTATAT-ACATTTTCGATCCTCTCAACA-----     407
EMBOSS_001    649 TTAAAGATATTATACAGATACACGCGCACATATATAATATTATAAGGACG     698
  |||||. |||. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
EMBOSS_001    408 ----AGATAGTAAAGA-----CG---ACATGTAT--TAACATAATAACG     442
EMBOSS_001    699 TGGAC--AGTGGACTTTTTTAAATTATATAACTCAATCATTTAAGACAC-     745
  |||. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
EMBOSS_001    443 TGTATGGAGTGGAG---TAGACTCATTAAATACAGAC-TGTGGTCCACT     487
EMBOSS_001    746 -CAACGGCCAACATAACAGAGTAGTAGTGGCGTATTAAGATCAATCGATC     794
  |||||. |||||. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
EMBOSS_001    488 TCAACAGCCAACCAAC-----TACTGCCATATTAAGATATATCAATC     529
EMBOSS_001    795 G---ATCATATCTTATCTTTTAGCTTA-----TTCTCCGTCTA     829
  . |. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
EMBOSS_001    530 ATGTAACGTATCTTATCTTATAGCTTAATATTCAAGTCCTTCTCCATCTA     579
EMBOSS_001    830 TAAATAGGGGACGTAAACGCAGTCTTTAGTTCACAGCAAATCTAAGT-A     878
  |||||. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
EMBOSS_001    580 TAAATAG-----ATATGAAAATGTATAATTTTC-----CTAACTCA     615
  
```

```

EMBOSS_001      879 CAACAAAACATCGAATAAAACACGCGCACACACATTGTAATGATG      924
                ||| ||| |||.||.                ||. |||  |||
EMBOSS_001      616 CAACAAAATCAG-----TTATAA--ATG      636

```

Verwendetes Tool zur Promotoranalyse: Promotorwise

C.plantagineum Promotor oben, *L. brevidens* Promotor unten; Beide mit UTR

BLASTP 2.1.2

```

Sequences producing significant alignments:
EMBOSS_001      10.50  0
EMBOSS_001      8.85   0
EMBOSS_001     14.52  0
EMBOSS_001     30.02  0
EMBOSS_001     13.16  0
EMBOSS_001      8.88   0

```

Length = 636 Reversed 1

Score = 10.5 bits (3640), Expect = 0

```

Query:      21      ATGTATAAACTTTTATT      38
            C  ATGTATA AAC T TATT
Sbjct:     -390    ATGTATATAACATATATT      -372

```

>EMBOSS_001

Length = 636 Reversed 1

Score = 8.9 bits (3068), Expect = 0

```

Query:      148     AAGATAAGGGGT      159
            D  AAGATA GGGGT
Sbjct:     -364     AAGATA-GGGGT      -353

```

>EMBOSS_001

Length = 636 Reversed 1

Score = 14.5 bits (5031), Expect = 0

```

Query:      236     TGGGAAAAGCTAAAACGTAT-TAAAAGCCATAGTAGAAATAAGATAG      281
            B  TG GA  A C AAAA GTAT TAA A  AT GTA  AATAAGATAG
Sbjct:     -404     TGAGAGGATCGAAAATGTATATAACATATATTGTAATAATAAGATAG      -357

```

>EMBOSS_001

Length = 636 Reversed 0

Score = 30.0 bits (10405), Expect = 0

Query: 769 TAGTGCGTATTAAGATCAATCGATC--G-ATCATATCTTATCTTTTAG 814
C TA TG C TATTAAGAT ATC ATC G A C TATCTTATCTT TAG

Sbjct: 504 TACTGCCATATTAAGATATATCAATCATGTAACGTATCTTATCTTATAG 552

Query: 815 CTT 817
C CTT

Sbjct: 553 CTT 555

Query: 819 TTCTCCGTCTATAAATAG 836
D TTCTCC TCTATAAATAG

Sbjct: 569 TTCTCCATCTATAAATAG 586

>EMBOSS_001
Length = 636 Reversed 1

Score = 13.2 bits (4560), Expect = 0

Query: 888 CATCGAATAAA 898
D CATCGAATAAA

Sbjct: -67 CATCGAATAAA -56

>EMBOSS_001
Length = 636 Reversed 1

Score = 8.9 bits (3077), Expect = 0

Query: 907 ACACACATTGTAATGAT 923
C ACA A ATTGTAAT AT

Sbjct: -381 ACATATATTGTAATAAT -364

Verwendetes Alignment tool: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/>

***C.plantagineum* Promotor oben, *L. subracemosa* Promotor unten; Beide mit UTR**

```

Program: stretcher
# Commandline: stretcher
# -auto
# -stdout
# -asequence emboss_stretcher-I20161004-134528-0375-70587099-pg.asequence
# -bsequence emboss_stretcher-I20161004-134528-0375-70587099-pg.bsequence
# -datafile EDNAFULL
# -gapopen 16
# -gapextend 4
# -aformat3 pair
# -snucleotide1
# -snucleotide2

```

```

# Align_format: pair
# Report_file: stdout
#
# Aligned_sequences: 2
# 1: EMBOSS_001
# 2: EMBOSS_001
# Matrix: EDNAFULL
# Gap_penalty: 16
# Extend_penalty: 4
#
# Length: 1217
# Identity:      627/1217 (51.5%)
# Similarity:   627/1217 (51.5%)
# Gaps:         346/1217 (28.4%)
# Score: -77
#
#
#=====
EMBOSS_001      1 -ATTT-----TCTGCATGAG--TACCTATGTATAAACTTT-T      35
      .|||          |.|||||  ||...|.|||||||  |
EMBOSS_001      1 CAATTAATAGTAAGGCTTTGAACTGAGAATAAAAACCTTGAAAACCTTAT      50
EMBOSS_001     36 ATTCAATTAGGTA-----TTTATGTGTAG---ATGTCAAA----TTT      70
      ...|||.|.|.|.  |||||.|.|.  |||.|||  |.|
EMBOSS_001     51 GACCAACTCTTTCACCAATGTTTATGACTAACTTCATGTAAAAGCTCTCT      100
EMBOSS_001     71 GGTTTTTCCTTTGATTTTAATTATTTT-----TCTTGCAATTT-CT---      109
      |||.|.|.|.|.  |.|.|.|.|.  |||||  ||
EMBOSS_001    101 GGTAATAAGTT-GTTTTATGAAGATTTTCGCATGTTCTTGCAATTTCTGCT      149
EMBOSS_001    110 ----TTACCA---TCATATTCCTCAA--ACAAAAACAAT-----      140
      |||.|.  |.|.|.|.|.  |||.|.  |||||.
EMBOSS_001    150 AGAGTTAACTCAGTAATGCTCCCCATTTACATAGCACAAAACAGATAGTTT      199
EMBOSS_001    141 -----TTGATGCAAGATAAGGGGT-----CTATGAGCTG-----      169
      |||||.|.|.  |||.|.  |||.  |||.
EMBOSS_001    200 AAGCATATTGATAAAAAATATATGGTATTAATTCTCAGGACTGAAGAACA      249
EMBOSS_001    170 ---TTGAGAAATG---CTCA--TCAAAATAGTTTATATGTTGATATGATA      211
      |||.|.|.  |||.  |.|.|.  |||.  |||.  |||.  |||.  |||.
EMBOSS_001    250 TGGTTCGACCATGGAGCTCGGGTGAGAAGGCTCTCCATCCTACGAAGTTT      299
EMBOSS_001    212 TG----ATCAACGCATG-----TTGAAA-ACCTATGGGAAAAGCTAAAAC      251
      ||  |||||.|.|.  |||.  |||.  |||.  |||.  |||.  |||.
EMBOSS_001    300 TGGCTGATCATCGTAAGCTTTCTTGTAAATAGTTATCGCACTCGTTGCTAT      349
EMBOSS_001    252 GTAT--TAA-----AAGCCATAGTAGAAATAA-----GATAGAAAG---      285
      ||||  |||  |.|.  |||.  |||.  |||.  |||.  |||.
EMBOSS_001    350 GTATGTTAACTTCGACGACGGCGTAGACCAAATGGTTCGGATTGTGATCTT      399
EMBOSS_001    286 --TCGGCATAT-----AAAAGTCTAGCATGGAGGT-AACT-----CT-      319
      ||...  |||  |.  |||.  |||.  |||.  |||.  |||  ||
EMBOSS_001    400 TATCTTTGTATCCTTCATAACTGTGCATGGAATGAACTACGTATACTT      449
EMBOSS_001    320 -----AGGAC--ATGGATTAATA-----ATT-----CGAA      342
      ||||  |||.  |||.  |||  |||  |||.
EMBOSS_001    450 TTCCTTAAGGACTGATGTAAGAAAACAAGCTATTTACACAGTGCTGCTCA      499
EMBOSS_001    343 TCACCAAGTATATT---ACACGT-ATCTT-----      367
      |||.  |||.  |||.  |||.  |||.
EMBOSS_001    500 TCAGAAATGGTTATTCTTACAGTTCATTTCTGATACAAAATGATATAAAA      549
EMBOSS_001    368 -----ATCTAACTATGACAATACTGCCGAC-----ATTTTT      398
      ||.  |||.  |||.  |||.  |||.  |||.  |||.  |||.
EMBOSS_001    550 AAACCATGTAATAAAGTTAATATTTTCCACCAAATAAGCGTTAGATTATT      599
EMBOSS_001    399 T-CTGCATATAA-----ATG-----CACTGCCTACTGATCCTTC---      431
      |  |||.  |||.  |||  |||||.  |||.  |||.  |||.
EMBOSS_001    600 TACTTGATAAAAATAAAACAATGTAAGATCACTGCCGACAGCATCTTCGGC      649
EMBOSS_001    432 CAAT-ACATTG-----CATTATATGATAAACATAATAAC----      465
      |.  ||  |.  ||  |.  |||.  |||.  |||.  |||.  |||.
EMBOSS_001    650 CTATGATAGTGTGAAAGGACAACCCTCATGGCATAATCTTCAATCCATGG      699
EMBOSS_001    466 -----TACGGAGTGGAATA--TACGGAATGGCCTACCAATGGAAGTAA      507

```



```

EMBOSS_001      700  CATTTATACTTCGACGACATAAATACGG--TGGGCCGCCAAAGGAAGTAA      747
EMBOSS_001      508  A--TTCATTTCTCAAC--CACGCAA-AGCCCCATGCAAGAAATAACATG      552
EMBOSS_001      748  AAATTAATTTCTCATCTGCATGCATGCATGCCCATGCAAGTAAACA-AAG      796
EMBOSS_001      553  TAGAGAGGACTCA-CCAATAAATTCGGTAGGGACAGTTTGACTTGTTCGT      601
EMBOSS_001      797  TAGAC----CCCATCCAATAAAT-CCATTGGGACAGTTTGACTTGCTCGT      841
EMBOSS_001      602  ACTTCTTCTTT-ATTACATTACA--GATCCGATCAT----ATCTCCATCT      644
EMBOSS_001      842  TATTTTATTTCATTACAGTATAATGATTCCATCCAGACCATATCCTTCT      891
EMBOSS_001      645  AGGCTTAAAGATATTATACAGATACACGCGCACATATATAATATTATAAG      694
EMBOSS_001      892  GAGCCTGAAG---TTATATATGTATAT----AGATATATAA----ATATG      930
EMBOSS_001      695  GACGTGGACAGTGGACTTTTTTTAATTATATA---ACTCAATCATTTAAG      741
EMBOSS_001      931  GACGTGGAGGGTGGACTTTTTTTAATTATATACACACTCATTTCATT-AAG      979
EMBOSS_001      742  ACAC-----CAACGGCCAACTAAACAGAGTA      767
EMBOSS_001      980  ACAGTGTGCGAGTCATTTCATTATATCTTCAACAGCCAACTATAAAAC--A      1027
EMBOSS_001      768  GTAGTGGCGTATTAAGATCAATCGATCGAT---CATATCTTATCTTTTAG      814
EMBOSS_001     1028  GTAGTGCCGTATTAAT-TAAGAAGATCGATAATCATATCATATATCTTAT      1076
EMBOSS_001      815  CTT-----ATTCTCCGCTATAAATAGGGGACGTAAC--GCAGTTCCTTT      857
EMBOSS_001     1077  CTTCTCTGATTCTCCATCTATAAATACAG-ACTAGAATTTGCAGTTCCTT-      1124
EMBOSS_001      858  AGTTCACAGCAAATCTAAGTACAACAAAAACATCGAATAAAACACGCGCA      907
EMBOSS_001     1125  AGCCACAGCAAAA-TAAGTACAA---AAGGTCG-----      1154
EMBOSS_001      908  CACACATTGTAATGATG      924
EMBOSS_001     1155  -----TCTTATAATG      1164

```

Verwendetes Tool zur Promotoranalyse: Promotorwise

C.plantagineum Promotor oben, *L. subracemosa* Promotor unten; Beide mit UTR

BLASTP 2.1.2

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
EMBOSS_001	11.37	0
EMBOSS_001	14.94	0
EMBOSS_001	10.90	0
EMBOSS_001	9.11	0
EMBOSS_001	48.37	0
EMBOSS_001	90.25	0

Cp und Ls mit UTR

Length = 1164 Reversed 1

Score = 11.4 bits (3941), Expect = 0

```

Query:      46      GTATTTATGT      55
           D      GTATTTATGT
Sbjct:    -725      GTATTTATGT      -715

```

>EMBOSS_001

Length = 1164 Reversed 1

Score = 14.9 bits (5179), Expect = 0

Query: 204 ATATGATATGAT 215
D ATATGATATGAT
Sbjct: -1069 ATATGATATGAT -1057

>EMBOSS_001
Length = 1164 Reversed 1
Score = 10.9 bits (3777), Expect = 0

Query: 309 GAGGTAACCTAG 321
D GAG TAACCTAG
Sbjct: -160 GAGGTAACCTAG -147

>EMBOSS_001
Length = 1164 Reversed 1
Score = 9.1 bits (3158), Expect = 0

Query: 371 TAACTATGACAA 382
D TAACTAT ACAA
Sbjct: -333 TAACTATTACAA -321

>EMBOSS_001
Length = 1164 Reversed 0
Score = 48.4 bits (16763), Expect = 0

Query: 495 CCAATGGAAGTAAA--TTCATTTCTCAAC--CACGCAAA-AGCCCCATG 538
C CCA GGAAGTAAA TT ATTTCTCA C CA GCA A CCCATG
Sbjct: 735 CCAAAGGAAGTAAAAATTAATTTCTCATCTGCATGCATGCCCATG 783

Query: 539 CAAG-AAATAACATGTAGAGAGGACTCACCAATAAATCCGTAGGGACA 586
C CAAG AAA AA A GTAGA A TC C AATAAAT CC T GGGACA
Sbjct: 784 CAAGTAAACAA-A-GTAGACCCCA-TC-C-AATAAAT-CCATTGGGACA 826

Query: 587 GTTGGACTTGTTTCGTACTTCTTTCTTT-ATTACATTA 621
C GTTGGACTTG TCGT TT TT TTT ATTACA TA
Sbjct: 827 GTTGGACTTGCTCGTTATTTTTTATTTTATTACAGTA 862

>EMBOSS_001
Length = 1164 Reversed 0
Score = 90.2 bits (31278), Expect = 0

Query: 678 ATATATAATATTATAAGGACGTGGACAGTGGACTTTTTTTAATTATATA 726
D ATATATAA AT AT GGACGTGGA GTGGACTTTTTTTAATTATATA
Sbjct: 918 ATATATAA-AT-AT--GGACGTGGAGGGTGGACTTTTTTTAATTATATA 962

Query: 727 -AC--TCAATCATTTAAGACA 744
D AC TCA TCATT AAGACA
Sbjct: 963 CACACTCATTTCATT-AAGACA 982

>-----<

Query: 746 CAACGGCCAACCTAAACAGAGTAGTAGTGGCGTATTAA 782
C CAAC GCCAACA A A A AGTAGTG CGTATTAA
Sbjct: 1008 CAACAGCCAACCTATAAA-AC-AGTAGTGCCGTATTAA 1042

>-----<

```

Query:      799      ATATCTTATCTTTTAGCTTATTCTCCGCTATAAATAGGGGACGTA-AA 846
              C ATATCTTATCTT T CT ATTCTCC TCTATAAATA G AC TA AA
Sbjct:      1068     ATATCTTATCTTCT--CTGATTCTCCATCTATAAATACAG-AC-TAGAA 1112

Query:      847      C--GCAGTTCTTTAGTTCACAGCAAATCTAAGTACAA                881
              C GCAGTTCTT AG CACAGCAA TAAGTACAA
Sbjct:      1113     TTTGCAGTTCTT-AGCCACAGCAAAA-TAAGTACAA                1147

```

Verwendetes Alignment tool: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/>

***L. brevidens* Promotor oben, *L. subracemosa* Promotor unten; Beide mit UTR**

```

Program: stretcher
# # Commandline: stretcher
# -auto
# -stdout
# -asequence emboss_stretcher-I20161004-140431-0490-20895717-pg.asequence
# -bsequence emboss_stretcher-I20161004-140431-0490-20895717-pg.bsequence
# -datafile EDNAFULL
# -gapopen 16
# -gapextend 4
# -aformat3 pair
# -snucleotidel
# -snucleotide2
# Align_format: pair
# Report_file: stdout
#
# Aligned_sequences: 2
# 1: EMBOSS_001
# 2: EMBOSS_001
# Matrix: EDNAFULL
# Gap_penalty: 16
# Extend_penalty: 4
#
# Length: 1175
# Identity:      451/1175 (38.4%)
# Similarity:    451/1175 (38.4%)
# Gaps:          550/1175 (46.8%)
# Score: -1409

EMBOSS_001      1 A---TCATA-TA----TATGA-----TTCAAACCTGTAA-----T      28
              .  |.||| ||  |.|||  |..|||..||.||  |
EMBOSS_001      1 CAATTAATAGTAAGGCTTTGAACTGAGAATAAAAACCTTGAAACTTTAT      50

EMBOSS_001     29 GAA-AGCTATTCCA----TGATAAGAAC--ACT-CATTTAT----TCGAT      66
              ||. |.||.||.||  ||.|.|.||  ||| |||.||.  ||..|
EMBOSS_001     51 GACCAACTCTTTCACCAATGTTTATGACTAACTTCATGTAAAAGCTCTCT      100

EMBOSS_001     67 G--AAGAA-----AGGAA-AT-----CA-----GCACTAA-TGCTA      93
              |  ||.||  |.||| ||  ||  |||.|.  |||||
EMBOSS_001    101 GGTAATAAGTTGTTTATGAAGATTTTCGCATGTTCTTGCATTTCTGCTA      150

EMBOSS_001     94 AACTAAAC-----AATGCC-----AGAGACTGCA      118
              .|.|.|||  |||||.  |||.|.|.|.
EMBOSS_001    151 GAGTAACTCAGTAATGCTCCCATTTACATAGCACAAACAGATAGTTTA      200

EMBOSS_001    119 ACCACATGCA--AGACATTAATGC----ATATCTCA-----      148
              |.|||.||.  |.|.||.  |..|||
EMBOSS_001    201 AGCATATTGATAAAAAATATATGGTATTAATTCTCAGGACTGAAGAACAT      250

EMBOSS_001    149 --TTC----ATGGC-----      156
              |||  |||.
EMBOSS_001    251 GGTTCGACCATGGAGCTCGGGTGAGAAGGCTCTCCATCTACGAAGTTTT      300

EMBOSS_001    157 --CTGACC-----CTAT-----ATATATAACGCA----TTTATACA      186
              |||||.  ||.  |||.|.  ||||  ||..|.
EMBOSS_001    301 GGCTGATCATCGTAAGCTTCTTGTAATAGTTATCGCACTCGTTGCTATG      350

EMBOSS_001    187 AATATAAA--TAAAGGATGGC-----CCAA-----      209

```

```

EMBOSS_001      351  .|||.|| |..|.||.|||  ||||  400
TATGTTAACTTCGACGACGGCGTAGACCAAATGGTCGGATTGTGATCTTT

EMBOSS_001      210  -----GAAGTAAATATTCATT  225
|||||.|||.|||.|||

EMBOSS_001      401  ATCTTTGTATCCTTCATAAATACTGTCAATGAAATGAACACGTATACATCTTT  450

EMBOSS_001      226  TTCTTTGGAAGTC-----CTATCTATTAAGTTTGGCTCTC  260
|.|||.|||.|||.  |||||.|||.|||.|||.|||.

EMBOSS_001      451  TCCTTAAGGACTGATGTAAGAAAACAAGCTATTTACACAGTGTCTCAT  500

EMBOSS_001      261  CA-----CT--CAGTTGATTTT--GATT-----  279
||  ||  |||||.||||  |||.

EMBOSS_001      501  CAGAATGGTTATCTTACAGTTCATTTTCTGATACAAAATGATATAAAAA  550

EMBOSS_001      280  -----TTTTTTACAC-----GTGTCACAATCTTT  303
|.|||.|||  |.|||.|||.|||

EMBOSS_001      551  AACCATGTAATAAAGTTAATATTTCCACCAAATAAGCGTTAGATTATTT  600

EMBOSS_001      304  TGTGTATGGAACA---CTATATTAGAACAC-----CAAATTAG---  338
..|||.|||.|||.  |.|||.|||.|||  |||.|||.

EMBOSS_001      601  ACTTGATAAAAATAAAACAATGTAAGATCACTGCCGACAGCATCTTCGGCC  650

EMBOSS_001      339  -----AACAGACGATC-TCATACCCCTATCTT-----  364
||.|||||.||  |||||.|||.|||

EMBOSS_001      651  TATGATAGTGTGAAAGGACAACCCTCATGGCATAATCTTCAATCCATGGC  700

EMBOSS_001      365  ATTATTACA-----ATATATGTT-----ATA  385
|||.|||.  |.|||||.  |.

EMBOSS_001      701  ATTTATACTTCGACGACATAAATACGGTGGGCCGCAAAGGAAGTAAAA  750

EMBOSS_001      386  TACATTTTCGATCCTC-----TCAACAAGATAG-  413
|.|||||.|||.|||.  |.|||||.|||.

EMBOSS_001      751  TTAATTTCTCATCTGCATGCATGCCATGCAAGTAAACAAAGTAGA  800

EMBOSS_001      414  -----TAAA-----GAC-----GACATG-----TATTA-----  431
||||  |||  |||.||  |||||.

EMBOSS_001      801  CCCCATCCAATAAATCCATTGGGACAGTTTGACTTGCTCGTTATTTTTTAT  850

EMBOSS_001      432  -----ACATAATAACG-----  442
|||.|||.|||.

EMBOSS_001      851  TTCATTACAGTATAATGATTCCATCCAGACCATATCCTTCTGAGCCTGAA  900

EMBOSS_001      443  -----TGTAT-----GGA-GTGGAG--TAGACTCAT  465
|||||  ||  |||||  |.|||||.

EMBOSS_001      901  GTTATATATGTATATAGATATATAAATATGGACGTGGAGGGTGGACTTTT  950

EMBOSS_001      466  TTAA-----TACAGACT-----GTG-----GTC---CA--  485
||.  |||||.|||  ||  ||  ||

EMBOSS_001      951  TTTAATTATATACACACTCATTTCATTAAGACAGTGTGCGAGTCATTCATT  1000

EMBOSS_001      486  ----CTCAACAGCCAACCA-----ACTACTGCCATATTAAGATATATC  525
|||||||.|||.  |.|||.|||.|||.  |.

EMBOSS_001      1001  ATATCTTCAACAGCCAACATAAAAACAGTAGTGCCGTATTAA-----TT  1044

EMBOSS_001      526  AATCATGTAACGTATCTTATCTTATAGCTTAATATTCAGTCTTCTCCA  575
|||.|||.|||.|||.|||.|||.  |.|||||.

EMBOSS_001      1045  AAGAAGATCGATAATCATATATATCTTA-TCTTCTC-TGATTCTCCA  1092

EMBOSS_001      576  TCTATAAATAGATATGAAAATGTATAATTTTCCTAACTCACAACAAAATC  625
|||||||.|||.|||.|||.|||.  |||.|||.|||.

EMBOSS_001      1093  TCTATAAATACAGACTAGAATTTGCAGTTCT--TAGCCACACGCAAAAATA  1140

EMBOSS_001      626  AGT-----TATAAATG  636
|||  ||||  ||

EMBOSS_001      1141  AGTACAAAAGGTCGTCTTATAA-TG  1164

```

Verwendetes Tool zur Promotoranalyse: Promotorwise

***L. brevidens* Promotor oben, *L. subracemosa* Promotor unten; Beide mit UTR**

BLASTP 2.1.2

Search.....done

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
EMBOSS_001	13.16	0
EMBOSS_001	10.90	0
EMBOSS_001	9.59	0
EMBOSS_001	36.17	0

>EMBOSS_001
Length = 1164 Reversed 1
Score = 13.2 bits (4560), Expect = 0

Query:	22	CTGTAATGAAA	32
		D CTGTAATGAAA	
Sbjct:	-860	CTGTAATGAAA	-849

>EMBOSS_001
Length = 1164 Reversed 1
Score = 10.9 bits (3777), Expect = 0

Query:	182	ATACAAATATAAA	194
		D ATACAAA ATAAA	
Sbjct:	-410	ATACAAAGATAAA	-397

>EMBOSS_001
Length = 1164 Reversed 1
Score = 9.6 bits (3322), Expect = 0

Query:	211	AAGTAAATA	219
		D AAGTAAATA	
Sbjct:	-604	AAGTAAATA	-595

>EMBOSS_001
Length = 1164 Reversed 0
Score = 36.2 bits (12536), Expect = 0

Query:	486	CTTCAACAGCCAAC	499
		D CTTCAACAGCCAAC	
Sbjct:	1005	CTTCAACAGCCAAC	1018

>-----<

Query:	539	ATCTTATCTTATAGCTTAATATTCAAGTCCTTCTCCATCTATAAATAGA	587
		B ATC TATC TATA CTTA T TTC T TTCTCCATCTATAAATA A	
Sbjct:	1058	ATCATATCATATATCTTA-TCTTCTC-TGATTCTCCATCTATAAATACA	1104

Query:	588	TATGAAAATGTATAATTTTCCCTAACTCACAACAAAATCAGT	628
		B A A AAT T A TT T TA C CACA CAAAAT AGT	
Sbjct:	1105	GACTAGAATTTGCAGTTCT--TAGCCCACAGCAAATAAGT	1143

7 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Diplomarbeit selbständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

Ort, Datum

Unterschrift

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Bartels für ihre Unterstützung mit Rat und Tat und dafür, dass sie mir die Möglichkeit gegeben hat meine Dissertation zu einem so spannenden Themenbereich wie der Erforschung der Trockenstresstoleranz von Pflanzen auf molekularer Ebene anzufertigen.

Mein Dank gilt ebenso all meinem Kollegen, die mir immer mit Tipps, Hinweisen, guten Unterhaltungen und sterilen Eppis zur Seite standen und dank denen ich auch privat eine gute Zeit hatte 😊.

Auch unserem Team aus technischen Assistenten, die unsere Arbeit mit ihrer Arbeit um vieles vereinfachen und mir auch menschlich eine angenehme Gesellschaft waren möchte ich danken.

Ein lieber Dank geht an Christine Marikar, die mir – immer ein freundliches Wort und ein Lächeln auf den Lippen - durch die Fallstricke der Bürokratie geholfen und sich – neben der Erledigung vieler anderer Aufgaben und organisatorischer Hilfestellungen – tapfer dem ewigen und unerklärlichen Mangel an Markierstiften, Tesafilm und ähnlichem in den Weg gestellt hat 😊.

Ganz herzlicher Dank gilt meinen Eltern, deren Unterstützung ich mir immer gewiss sein durfte, die mir auf viele Weisen geholfen und beigestanden haben und ohne die ALLES was mich betrifft aus offensichtlichen Gründen nicht möglich gewesen wäre 😊. Ein ebenso herzlicher Dank gilt meiner Tochter und meinem Partner, dafür dass es sie in meinem Leben gibt und sie dieses durch die Zeit die wir miteinander verbringen können um so vieles lebenswert und wunderbarer für mich machen.

9 Literaturverzeichnis

- Abe, H. et al., 2003. Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *The Plant Cell*, 15(1), pp.63–78.
- Al-Wahaibi, M.H., 2011. Plant heat-shock proteins: A mini review. *Journal of King Saud University - Science*, 23(2), pp.139–150. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S101836471000087X>.
- Alamillo, J. et al., 1995. Constitutive expression of small heat shock proteins in vegetative tissues of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant molecular biology*, 29(5), pp.1093–1099.
- Alpert, P., 2006. Constraints of tolerance: why are desiccation-tolerant organisms so small or rare? *Journal of Experimental Biology*, 209(9), pp.1575–1584.
- An, G., 1986. Development of plant promoter expression vectors and their use for analysis of differential activity of nopaline synthase promoter in transformed tobacco cells. *Plant Physiology*, 81(1), pp.86–91.
- Anderson, S.L. et al., 1994. Circadian clock- and phytochrome- regulated transcription is conferred by a 78 bp cis- acting domain of the Arabidopsis CAB2 promoter. *The Plant Journal*, 6(4), pp.457–470.
- Apel, K. & Hirt, H., 2004. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55(1), pp.373–399. Available at: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>.
- Bartels, D., 2005. Desiccation Tolerance Studied in the Resurrection Plant *Craterostigma plantagineum*. *Integrative and Comparative Biology*, 45(5), pp.696–701. Available at: <http://icb.oxfordjournals.org/content/45/5/696.abstract>.
- Bartels, D. et al., 1990. Molecular cloning of abscisic acid-modulated genes which are induced during desiccation of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Planta*, 181(1), pp.27–34.
- Bartels, D. & Sunkar, R., 2005. Drought and Salt Tolerance in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24(1), pp.23–58. Available at: <http://dx.doi.org/10.1080/07352680590910410>.
- van den Berg, B., Ellis, R.J. & Dobson, C.M., 1999. Effects of macromolecular crowding on protein folding and aggregation. *The EMBO journal*, 18(24), pp.6927–6933.
- Bernacchia, G. et al., 1995. The transketolase gene family of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*: differential expression during the rehydration phase. *The EMBO journal*, 14(3), p.610.
- Bewley, J.D., Bradford, K. & Hilhorst, H., 2012. *Seeds: physiology of development, germination and dormancy*, Springer Science & Business Media.
- Bianchi, G. et al., 1992. Low molecular weight solutes in desiccated and ABA-treated calli and leaves of *Craterostigma plantagineum*. *Phytochemistry*, 31(6), pp.1917–1922.
- Bianchi, G. et al., 1991. Novel carbohydrate metabolism in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *The Plant Journal*, 1(3), pp.355–359. Available at: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-313X.1991.t01-11-00999.x>.
- Bray, E. A., Bailey-Serres, J., and Weretilnyk, E. (2000). "Responses to abiotic stresses," in *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, eds B. B. Buchanan, W. Gruissem, and R. L. Jones (Rockville: American Society of Plant Physiologists), 1158–1203.
- Buitink, J. et al., 2003. The re-establishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *Medicago truncatula* Gaertn. seeds. *Seed Science Research*, 13(4), pp.273–286.
- Buitink, J. & Leprince, O., 2004. Glass formation in plant anhydrobiotes: survival in the dry state. *Cryobiology*, 48(3), pp.215–228. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011224004000525>.
- Burke, M.J., 1986. The glassy state and survival of anhydrous biological systems. *Membranes, Metabolism and Dry Organisms*. Cornell University Press, Ithaca, NY, pp.358–363.
- Chen, K. & Rajewsky, N., 2007. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Nature Reviews Genetics*, 8(2), pp.93–103.
- Corrêa, L.G.G. et al., 2008. The role of bZIP transcription factors in green plant evolution: adaptive features emerging from four founder genes. *PLoS One*, 3(8), p.e2944.

-
- Crowe, J.H., Hoekstra, F.A. & Crowe, L.M., 1992. Anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology*, 54(1), pp.579–599.
- Cuming, A.C., 1999. LEA proteins. In *Seed proteins*. Springer, pp. 753–780.
- Dai, A., 2011. Drought under global warming: a review. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Climate Change*, 2(1), pp.45–65. Available at: <http://dx.doi.org/10.1002/wcc.81>.
- Dai, A., 2013. Increasing drought under global warming in observations and models. *Nature Climate Change*, 3(1), pp.52–58.
- Deak, K.I. & Malamy, J., 2005. Osmotic regulation of root system architecture. *The Plant Journal*, 43(1), pp.17–28. Available at: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02425.x>.
- Dean, C. et al., 1988. Influence of flanking sequences on variability in expression levels of an introduced gene in transgenic tobacco plants. *Nucleic acids research*, 16(19), pp.9267–9283.
- Ditzer, A., 2003. Untersuchungen zur Aktivität eines Trockenstress- und Abscisinsäure-induzierbaren Promotors aus der Wiederauferstehungspflanze *Craterostigma plantagineum* und Isolierung von DNA-Bindeproteinen.
- van den Dries, N. et al., 2011. Comparative analysis of LEA-like 11-24 gene expression and regulation in related plant species within the Linderniaceae that differ in desiccation tolerance. *New Phytologist*, 190(1), pp.75–88.
- Dubouzet, J.G. et al., 2003. OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *The Plant Journal*, 33(4), pp.751–763.
- Farrant, J.M., 2007. Mechanisms of desiccation tolerance in angiosperm resurrection plants. *Plant desiccation tolerance*, pp.51–90.
- Farrant, J.M. & Moore, J.P., 2011. Programming desiccation-tolerance: from plants to seeds to resurrection plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(3), pp.340–345. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369526611000306>.
- Feild, T.S. et al., 2005. Hydathodal leaf teeth of *Chloranthus japonicus* (Chloranthaceae) prevent guttation-induced flooding of the mesophyll. *Plant, Cell & Environment*, 28(9), pp.1179–1190.
- Franchi, G.G. et al., 2011. Pollen and seed desiccation tolerance in relation to degree of developmental arrest, dispersal, and survival. *Journal of Experimental Botany*, 62(15), pp.5267–5281. Available at: <http://jxb.oxfordjournals.org/content/62/15/5267.abstract>.
- Gaff, D.F., 1977. Desiccation tolerant vascular plants of Southern Africa. *Oecologia*, 31(1), pp.95–109.
- Gaston, K. & Jayaraman, P.-S., 2003. Transcriptional repression in eukaryotes: repressors and repression mechanisms. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 60(4), pp.721–741.
- Gay, P.A. & Tuzun, S., 2000. Involvement of a novel peroxidase isozyme and lignification in hydathodes in resistance to black rot disease in cabbage. *Canadian Journal of Botany*, 78(9), pp.1144–1149.
- Giarola, V. et al., 2014. Identification and molecular characterisation of unknown genes involved in desiccation tolerance mechanisms in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*.
- Giarola, V. et al., 2015. Taxonomically restricted genes of *Craterostigma plantagineum* are modulated in their expression during dehydration and rehydration. *Planta*, 241(1), pp.193–208. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s00425-014-2175-2>.
- Giarola, V. et al., 2015. The *Craterostigma plantagineum* glycine-rich protein CpGRP1 interacts with a cell wall-associated protein kinase 1 (CpWAK1) and accumulates in leaf cell walls during dehydration. *New Phytologist*.
- Graw, Jochen, 2005 Genetik
- Gultinan, M.J., Marcotte, W. & Quatrano, R.S., 1990. A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. *Science*, 250(4978), pp.267–271.
- Heber, U., Azarkovich, M. & Shuvalov, V., 2007. Activation of mechanisms of photoprotection by desiccation and by light: poikilohydric photoautotrophs. *Journal of Experimental Botany*, 58(11), pp.2745–2759. Available at: <http://jxb.oxfordjournals.org/content/58/11/2745.abstract>.
- Higo, K. et al., 1999. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic acids research*, 27(1), pp.297–300.
- Hilbricht, T. et al., 2008. Retrotransposons and siRNA have a role in the evolution of desiccation tolerance leading to resurrection of the plant *Craterostigma plantagineum*. *New Phytologist*, 179(3), pp.877–

-
887. Available at: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02480.x>.
- Hincha, D.K. & Thalhammer, A., 2012. LEA proteins: IDPs with versatile functions in cellular dehydration tolerance. *Biochemical Society Transactions*, 40(5), pp.1000–1003.
- Hobo, T. et al., 1999. ACGT-containing abscisic acid response element (ABRE) and coupling element 3 (CE3) are functionally equivalent. *The Plant Journal*, 19(6), pp.679–689. Available at: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-313x.1999.00565.x>.
- Hoekstra, F.A., 2005. Differential Longevities in Desiccated Anhydrobiotic Plant Systems. *Integrative and Comparative Biology*, 45(5), pp.725–733. Available at: <http://icb.oxfordjournals.org/content/45/5/725.abstract>.
- Höfler, K., Migsch, H., and Rottenburg, W. (1941). Über die Austrocknungsresistenz landwirtschaftlicher Kulturpflanzen. *Forschungsdienst* 12, 50–61
- Horton, P. et al., 2007. WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic acids research*, 35(suppl 2), pp.W585–W587.
- Huala, E. et al., 2001. The Arabidopsis Information Resource (TAIR): a comprehensive database and web-based information retrieval, analysis, and visualization system for a model plant. *Nucleic Acids Research*, 29(1), pp.102–105. Available at: <http://nar.oxfordjournals.org/content/29/1/102.abstract>.
- Ingram, J. & Bartels, D., 1996. THE MOLECULAR BASIS OF DEHYDRATION TOLERANCE IN PLANTS. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47(1), pp.377–403. Available at: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.47.1.377>.
- IPCC, 2014: Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, 151 pp.
- Jensen, E.Ø. et al., 1988. Interaction of a nodule specific, trans-acting factor with distinct DNA elements in the soybean leghaemoglobin lbc3 5'upstream region. *The EMBO journal*, 7(5), p.1265.
- Jin, G. et al., 1998. Interaction of DNA-binding proteins with the 5'-flanking region of a cytokinin-responsive cucumber hydroxypyruvate reductase gene. *Plant molecular biology*, 38(5), pp.713–723.
- Jones, L. & McQueen-Mason, S., 2004. A role for expansins in dehydration and rehydration of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *FEBS Letters*, 559(1–3), pp.61–65. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579304000237>.
- Kashiwagi, J. et al., 2006. Variability of root length density and its contributions to seed yield in chickpea (*Cicer arietinum* L.) under terminal drought stress. *Field Crops Research*, 95(2), pp.171–181.
- Kasuga, M. et al., 1999. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature biotechnology*, 17(3), pp.287–291.
- Kay, R. et al., 1987. Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science*, 236(4806), pp.1299–1302.
- Kim, J.-S. et al., 2011. An ABRE promoter sequence is involved in osmotic stress-responsive expression of the DREB2A gene, which encodes a transcription factor regulating drought-inducible genes in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 52(12), pp.2136–2146.
- Kim, S.Y., Chung, H. & 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 Journal*, 11(6), pp.1237–1251.
- Kirch, H.-H., Nair, A. & Bartels, D., 2001. Novel ABA- and dehydration-inducible aldehyde dehydrogenase genes isolated from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* and *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 28(5), pp.555–567. Available at: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.01176.x>.
- Kranner, I. & Birtić, S., 2005. A Modulating Role for Antioxidants in Desiccation Tolerance. *Integrative and Comparative Biology*, 45(5), pp.734–740. Available at: <http://icb.oxfordjournals.org/content/45/5/734.abstract>.
- Krasensky, J. & Jonak, C., 2012. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany*, 63(4), pp.1593–1608. Available at: <http://jxb.oxfordjournals.org/content/63/4/1593.abstract>.
- Lee, S. et al., 2010. DREB2C interacts with ABF2, a bZIP protein regulating abscisic acid-responsive gene expression, and its overexpression affects abscisic acid sensitivity. *Plant physiology*, 153(2), pp.716–727.

-
- Leprince, O., Hendry, G.A.F. & McKersie, B.D., 1993. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. *Seed Science Research*, 3(4), pp.231–246.
- Lewin's Genes XI, S. 549 – 577
- Li, G. & Reinberg, D., 2011. Chromatin higher-order structures and gene regulation. *Current opinion in genetics & development*, 21(2), pp.175–186.
- Lindquist, S. & Craig, E.A., 1988. The heat-shock proteins. *Annual review of genetics*, 22(1), pp.631–677.
- Liu, Q. et al., 1998. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought-and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 10(8), pp.1391–1406.
- Long, M. et al., 2003. The origin of new genes: glimpses from the young and old. *Nature Reviews Genetics*, 4(11), pp.865–875.
- Lüscher, B. & Eisenman, R.N., 1990. New light on Myc and Myb. Part II. Myb. *Genes & development*, 4(12b), pp.2235–2241.
- Maia, J. et al., 2011. The re-establishment of desiccation tolerance in germinated *Arabidopsis thaliana* seeds and its associated transcriptome. *PLoS One*, 6(12), p.e29123.
- Maniatis, T., Goodbourn, S. & Fischer, J.A., 1987. Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. *Science*, 236(4806), pp.1237–1245.
- Martinelli, T., 2008. In situ localization of glucose and sucrose in dehydrating leaves of *Sporobolus stapfianus*. *Journal of plant physiology*, 165(6), pp.580–587.
- Matharu, N. & Ahituv, N., 2015. Minor Loops in Major Folds: Enhancer–Promoter Looping, Chromatin Restructuring, and Their Association with Transcriptional Regulation and Disease. *PLoS Genet*, 11(12), p.e1005640.
- Mattick, J.S. & Makunin, I. V., 2006. Non-coding RNA. *Human molecular genetics*, 15(suppl 1), pp.R17–R29.
- Mittelheuser, C.J. & Van Steveninck, R.F.M., 1969. Stomatal closure and inhibition of transpiration induced by (RS)-abscisic acid. *Nature*, 221, pp.281–282.
- Moore, J.P. et al., 2008. Adaptations of higher plant cell walls to water loss: drought vs desiccation. *Physiologia Plantarum*, 134(2), pp.237–245. Available at: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.2008.01134.x>.
- Moore, J.P. et al., 2013. Arabinose-rich polymers as an evolutionary strategy to plasticize resurrection plant cell walls against desiccation. *Planta*, 237(3), pp.739–754.
- Moore, J.P. et al., 2009. Towards a systems-based understanding of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science*, 14(2), pp.110–117. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1360138509000223>.
- Munnik, T., 2001. Phosphatidic acid: an emerging plant lipid second messenger. *Trends in plant science*, 6(5), pp.227–233.
- Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K., 2014. The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. *Abiotic Stress: Molecular Genetics and Genomics*, p.25.
- Narayan, S. et al., 1994. RNA polymerase II transcription. Rate of promoter clearance is enhanced by a purified activating transcription factor/cAMP response element-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*, 269(17), pp.12755–12763.
- Neill, S.O. & Gould, K.S., 2003. Anthocyanins in leaves: light attenuators or antioxidants? *Functional Plant Biology*, 30(8), pp.865–873.
- Norwood, M. et al., 2000. Photosynthetic carbohydrate metabolism in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Journal of Experimental Botany*, 51(343), pp.159–165.
- Ohta, S. et al., 1991. High-level expression of a sweet potato sporamin gene promoter: β -glucuronidase (GUS) fusion gene in the stems of transgenic tobacco plants is conferred by multiple cell type-specific regulatory elements. *Molecular and General Genetics MGG*, 225(3), pp.369–378.
- Oliver, M.J., Tuba, Z. & Mishler, B.D., 2000. The evolution of vegetative desiccation tolerance in land plants. *Plant Ecology*, 151(1), pp.85–100. Available at: <http://dx.doi.org/10.1023/A:1026550808557>.
- Oliver, M.J., Velten, J. & Mishler, B.D., 2005. Desiccation Tolerance in Bryophytes: A Reflection of the Primitive Strategy for Plant Survival in Dehydrating Habitats? *Integrative and Comparative Biology* ,

-
- 45(5), pp.788–799. Available at: <http://icb.oxfordjournals.org/content/45/5/788.abstract>.
- Peach, C. & Velten, J., 1991. Transgene expression variability (position effect) of CAT and GUS reporter genes driven by linked divergent T-DNA promoters. *Plant molecular biology*, 17(1), pp.49–60.
- Phillips, J.R. et al., 2008. *Lindernia brevidens*: a novel desiccation-tolerant vascular plant, endemic to ancient tropical rainforests. *The Plant Journal*, 54(5), pp.938–948. Available at: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03478.x>.
- Piatkowski, D. et al., 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 Physiology*, 94(4), pp.1682–1688.
- Porembski S (2011) Evolution, diversity and habitats of poikilohydrous plants. In: Luttge U, Beck E, Bartels D (eds) *Plant desiccation tolerance*. Springer, Berlin, pp 139–156
- Qin, G. et al., 2007. Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in *Arabidopsis* by impairing chlorophyll, carotenoid, and gibberellin biosynthesis. *Cell research*, 17(5), pp.471–482.
- Rapp, W.D. & Stern, D.B., 1992. A conserved 11 nucleotide sequence contains an essential promoter element of the maize mitochondrial *atp1* gene. *The EMBO journal*, 11(3), p.1065.
- Rascio, N. & Rocca, N. La, 2005. Resurrection Plants: The Puzzle of Surviving Extreme Vegetative Desiccation. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24(3), pp.209–225. Available at: <http://dx.doi.org/10.1080/07352680591008583>.
- Rédei, G.P., 1975. *Arabidopsis* as a genetic tool. *Annual review of genetics*, 9(1), pp.111–127.
- Remans, T. et al., 2014. Reliable gene expression analysis by reverse transcription-quantitative PCR: reporting and minimizing the uncertainty in data accuracy. *The Plant Cell*, 26(10), pp.3829–3837.
- Rhee, S.Y. et al., 2003. The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): a model organism database providing a centralized, curated gateway to *Arabidopsis* biology, research materials and community. *Nucleic Acids Research*, 31(1), pp.224–228. Available at: <http://nar.oxfordjournals.org/content/31/1/224.abstract>.
- Roberts, J.K. et al., 1993. Cellular concentrations and uniformity of cell-type accumulation of two *Lea* proteins in cotton embryos. *The Plant Cell*, 5(7), pp.769–780.
- Rodríguez, M.C.S. et al., 2010. Transcriptomes of the desiccation-tolerant resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *The Plant Journal*, 63(2), pp.212–228. Available at: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04243.x>.
- Rojas-González, J.A. et al., 2015. Disruption of both chloroplastic and cytosolic FBPase genes results in a dwarf phenotype and important starch and metabolite changes in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany*, 66(9), pp.2673–2689.
- Ross, J., 1996. Control of messenger RNA stability in higher eukaryotes. *Trends in Genetics*, 12(5), pp.171–175.
- Schwall, G. et al., 1995. Carbohydrate metabolism in the desiccation tolerant plant *Craterostigma plantagineum* Hochst.
- Seong, G.H. et al., 2002. Direct atomic force microscopy visualization of integration host factor-induced DNA bending structure of the promoter regulatory region on the *Pseudomonas* TOL plasmid. *Biochemical and biophysical research communications*, 291(2), pp.361–366.
- Shen-Miller, J. et al., 1995. Exceptional Seed Longevity and Robust Growth: Ancient Sacred Lotus from China. *American Journal of Botany*, 82(11), pp.1367–1380. Available at: <http://www.jstor.org/stable/2445863>.
- Shen, Q. & Ho, T.H., 1995. Functional dissection of an abscisic acid (ABA)-inducible gene reveals two independent ABA-responsive complexes each containing a G-box and a novel cis-acting element. *The Plant Cell*, 7(3), pp.295–307.
- Shen, Z.-J. & Malter, J.S., 2015. Regulation of AU-rich element RNA binding proteins by phosphorylation and the prolyl isomerase Pin1. *Biomolecules*, 5(2), pp.412–434.
- Simpson, S.D. et al., 2003. Two different novel cis-acting elements of *erd1*, a *clpA* homologous *Arabidopsis* gene function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence. *The Plant Journal*, 33(2), pp.259–270.
- Singh, A., 2011. Negative feedback through mRNA provides the best control of gene-expression noise. *IEEE transactions on nanobioscience*, 10(3), pp.194–200.

-
- Singh, S., 2014. Guttation: Quantification, microbiology and implications for phytopathology. In *Progress in botany*. Springer, pp. 187–214.
- Storz, G., Opdyke, J.A. & Zhang, A., 2004. Controlling mRNA stability and translation with small, noncoding RNAs. *Current opinion in microbiology*, 7(2), pp.140–144.
- Stougaard, J. et al., 1990. Interdependence and nodule specificity of cis-acting regulatory elements in the soybean leghemoglobin lbc3 and N23 gene promoters. *Molecular and General Genetics MGG*, 220(3), pp.353–360.
- Sunkar, R., Bartels, D. & Kirch, H.-H., 2003. Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. *The Plant Journal*, 35(4), pp.452–464. Available at: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01819.x>.
- Thalhammer, A. et al., 2010. Interaction of two intrinsically disordered plant stress proteins (COR15A and COR15B) with lipid membranes in the dry state. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1798(9), pp.1812–1820. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273610001641>.
- Trenberth, K.E. et al., 2014. Global warming and changes in drought. *Nature Climate Change*, 4(1), pp.17–22.
- Tuba, Z., Protor, C.F. & Csintalan, Z., 1998. Ecophysiological responses of homoiochlorophyllous and poikilochlorophyllous desiccation tolerant plants: a comparison and an ecological perspective. *Plant Growth Regulation*, 24(3), pp.211–217. Available at: <http://dx.doi.org/10.1023/A:1005951908229>.
- Tyedmers, J., Mogk, A. & Bukau, B., 2010. Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11(11), pp.777–788.
- Uga, Y. et al., 2013. Control of root system architecture by DEEPER ROOTING 1 increases rice yield under drought conditions. *Nature Genetics*, 45(9), pp.1097–1102.
- Velasco, R., Salamini, F. & 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), pp.459–471.
- Vicré, M. et al., 2004. Composition and desiccation-induced alterations of the cell wall in the resurrection plant *Craterostigma wilmsii*. *Physiologia Plantarum*, 120(2), pp.229–239. Available at: <http://dx.doi.org/10.1111/j.0031-9317.2004.0234.x>.
- Vieweg, M.F. et al., 2004. The promoter of the *Vicia faba* L. leghemoglobin gene VfLb29 is specifically activated in the infected cells of root nodules and in the arbuscule-containing cells of mycorrhizal roots from different legume and nonlegume plants. *Molecular plant-microbe interactions*, 17(1), pp.62–69.
- von den Driesch; B. 2012. 'Molekulare Charakterisierung unbekannter Trockenstress-Gene isoliert aus *Craterostigma plantagineum*'. Diplomarbeit.
- Wang, L. et al., 2009. A role for a cell wall localized glycine-rich protein in dehydration and rehydration of the resurrection plant *Boea hygrometrica*. *Plant Biology*, 11(6), pp.837–848. Available at: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1438-8677.2008.00187.x>.
- Wang, W., Nema, S. & Teagarden, D., 2010. Protein aggregation—Pathways and influencing factors. *International journal of pharmaceutics*, 390(2), pp.89–99.
- Wheeler, T. & Von Braun, J., 2013. Climate change impacts on global food security. *Science*, 341(6145), pp.508–513.
- Vander Willigen, C. et al., 2003. An ultrastructural study using anhydrous fixation of *Eragrostis nindensis*, a resurrection grass with both desiccation-tolerant and -sensitive tissues. *Functional Plant Biology*, 30(3), pp.281–290.
- Wilusz, C.J., Wormington, M. & Peltz, S.W., 2001. The cap-to-tail guide to mRNA turnover. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2(4), pp.237–246.
- Wright, S.T.C. & Hiron, R.W.P., 1969. (+)-Abscisic acid, the growth inhibitor induced in detached wheat leaves by a period of wilting. *Nature*, 224, pp.719–720.
- Xing, S. et al., 2010. Disruption of the 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (DXR) gene results in albino, dwarf and defects in trichome initiation and stomata closure in *Arabidopsis*. *Cell Research*, 20(6), pp.688–700.
- Xiong, L. et al., 2006. Identification of Drought Tolerance Determinants by Genetic Analysis of Root Response to Drought Stress and Abscisic Acid. *Plant Physiology*, 142(3), pp.1065–1074. Available at: <http://www.plantphysiol.org/content/142/3/1065.abstract>.

-
- Xue, G., 2002. Characterisation of the DNA-binding profile of barley HvCBF1 using an enzymatic method for rapid, quantitative and high-throughput analysis of the DNA-binding activity. *Nucleic Acids Research*, 30(15), pp.e77–e77.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K., 2005. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends in Plant Science*, 10(2), pp.88–94. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1360138504002985>.
- Yin, Y. et al., 1997. RF2a, a bZIP transcriptional activator of the phloem-specific rice tungro bacilliform virus promoter, functions in vascular development. *The EMBO Journal*, 16(17), pp.5247–5259.
- Yoshida, T. et al., 2010. AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *The Plant Journal*, 61(4), pp.672–685.
- Zhou, D.X. et al., 1992. Sequence-specific interaction between S1F, a spinach nuclear factor, and a negative cis-element conserved in plastid-related genes. *Journal of Biological Chemistry*, 267(33), pp.23515–23519.
- Zhu, J.-K., 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual review of plant biology*, 53, p.247.
- 2015 World Population Data Sheet, Population Reference Bureau