

**Isolierung und Charakterisierung des  
putativen Transkriptionsfaktorgens R18  
aus der Wiederauferstehungspflanze  
*Craterostigma plantagineum* Hochst.**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Tobias Hilbricht  
aus Düsseldorf

Satz: L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X  
Druck: MPIZ  
Köln 2001

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln in der Abteilung für Pflanzenzüchtung und Ertragsphysiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Francesco Salamini angefertigt.

Berichterstatter:

Prof. Dr. Francesco Salamini

Prof. Dr. Ulf-Ingo Flügge

Tag der Disputation: 9. Mai 2001

Porque el campo es el edén  
Más lindo del mundo entero  
Chapea el monte, cultiva el llano  
Recoge el fruto de tu sudor.

GUILLERMO PORTABALES  
El Carretero

---

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>iii</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 “Pflanzenphysiologie ist zu einem erstaunlichen Grad die Untersuchung von Wasser” . . . . .	1
1.2 Wasserversorgung als Grundvoraussetzung für Wachstum und Entwicklung bei den Pflanzen . . . . .	4
1.3 Überleben ohne Wasser — Trockentoleranz als weitverbreitete Überlebensstrategie bei Pflanzen . . . . .	5
1.4 Samen und Wiederauferstehungspflanzen als Studienobjekte zur Untersuchung der molekularen Mechanismen der Trockentoleranz	7
1.5 Von der Austrocknung zur Trockentoleranz: die molekularen Reaktionen der Zelle und die Signaltransduktionsketten, die zu ihnen führen . . . . .	9
1.6 Durch Austrocknung und ABA induzierte Genexpression und daran beteiligte Transkriptionsfaktoren . . . . .	11
1.7 Ziel dieser Arbeit . . . . .	12
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>14</b>
2.1 Anzucht und Transformation von <i>Escherichia coli</i> . . . . .	14
2.1.1 Verwendete Stämme von <i>Escherichia coli</i> . . . . .	14
2.1.2 Medien zur Haltung und Anzucht von <i>Escherichia coli</i> . . . . .	15
2.1.3 Transformation von <i>Escherichia coli</i> . . . . .	16
2.2 Anzucht und Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . . . . .	17
2.2.1 Verwendeter Stamm von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . . . . .	17

---

2.2.2	Medien zur Haltung und Anzucht von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . . . . .	18
2.2.3	Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . . . . .	18
2.3	Kultur und Gewebekultur von <i>Craterostigma plantagineum</i> . . . . .	20
2.3.1	Haltung, Ernte und Austrocknung von <i>Craterostigma plantagineum</i> . . . . .	20
2.3.2	Gewebekultur von <i>Craterostigma plantagineum</i> . . . . .	20
2.4	Haltung, Protoplastierung und Transfektion von <i>Nicotiana tabacum</i> . . . . .	22
2.4.1	Haltung von <i>Nicotiana tabacum</i> . . . . .	22
2.4.2	Isolierung von Protoplasten aus <i>Nicotiana tabacum</i> . . . . .	22
2.4.3	Transfektion von Tabak-Protoplasten . . . . .	23
2.5	Biochemische Methoden . . . . .	23
2.5.1	Isolierung von Kernproteinen aus <i>Craterostigma plantagineum</i> . . . . .	23
2.5.2	Bestimmung von Proteinkonzentrationen . . . . .	24
2.5.3	Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen . . . . .	24
2.5.4	Färbung von Proteinen . . . . .	25
2.5.5	Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrocellulose . . . . .	25
2.5.6	Immunodetektion von Proteinen . . . . .	25
2.6	Molekularbiologische Methoden . . . . .	26
2.6.1	Isolierung von Nukleinsäuren . . . . .	26
2.6.2	Quantifizierung von Nukleinsäuren . . . . .	30
2.6.3	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren . . . . .	30
2.6.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen . . . . .	33
2.6.5	Markierung von Nukleinsäuren mit Radioisotopen . . . . .	34
2.6.6	DNA modifizierende Reaktionen . . . . .	35
2.6.7	Herstellung einer One-Hybrid cDNA-Bibliothek aus mRNAs von <i>Craterostigma plantagineum</i> und Durchführung eines Hefe One-Hybrid Versuches . . . . .	35
2.6.8	DNA-Sequenzierung und Sequenzdatenanalysen . . . . .	35
2.6.9	Aufreinigung eines in <i>Escherichia coli</i> exprimierten rekombinanten GST-Fusionsproteins . . . . .	36
2.6.10	Transiente Expression von rekombinanten GFP-Fusionsproteinen in Tabak-Protoplasten . . . . .	37
2.6.11	Transiente Koexpression eines R18-Fusionsproteins mit einem Promoter-GUS-Konstrukt in Tabak-Protoplasten . . . . .	38
2.6.12	Durchsuchung einer genomischen Phagen-DNA-Bank (Plaquehybridisierung) . . . . .	39

---

2.7	Chemikalien, Enzyme und sonstige Materialien . . . . .	39
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>40</b>
3.1	Kernproteine aus Wurzeln und Kallus von <i>Craterostigma plantagineum</i> binden an das durch zwei AGCCC-Elemente charakterisierte Promoterfragment des LEA-Gens CDeT27-45 . . . . .	40
3.2	Isolierung des für ein DNA bindendes Protein kodierenden cDNA-Klons R18 durch einen One-Hybrid-Versuch in Hefe . . . . .	44
3.2.1	Das Pentamer A19 der CDeT27-45 Promotorbindungsstelle interagiert mit Kernproteinen aus ABA behandeltem <i>Craterostigma</i> -Kallus . . . . .	44
3.2.2	Die Reporterhefe YM954-A19 kann in Gegenwart von 5 mM 3-AT nicht auf Minimalmedium ohne Histidin wachsen . . . . .	46
3.2.3	Durchsuchung einer cDNA-Bibliothek aus 2 Tage ABA behandeltem Kallus auf Transfaktoren zum Zielelement A19 mit Hilfe der Reporterhefe YM954-A19 . . . . .	49
3.2.4	Das Translationsprodukt des cDNA-Inserts R18 interagiert in Hefe spezifisch mit dem Pentamer A19 im Reporterplasmid pSK1-A19 . . . . .	53
3.2.5	Das cDNA-Insert des Klones R18 kodiert für ein basisches Protein mit einem C <sub>3</sub> H-Zinkfinger und einer SAP-Domäne und zeigt Homologien zu Sequenzen aus <i>Arabidopsis</i> , Tomate und weiteren Arten . . . . .	53
3.3	Molekularbiologische Charakterisierung des One-Hybrid Klons R18	59
3.3.1	Das cDNA-Insert des Klones R18 ist das Fragment eines größeren, seltenen Transkriptes, das in Wurzeln und Kallus vorkommt . . . . .	59
3.3.2	Das in <i>Escherichia coli</i> als GST-Fusionsprotein exprimierte cDNA-Insert des Klones R18 bindet <i>in vitro</i> an das Pentamer A19 und an das native Promoterfragment 3.5 . . . . .	61
3.3.3	Das R18-GFP Fusionsprotein ist kernlokalisiert . . . . .	64
3.3.4	Das cDNA-Insert des Klons R18 hybridisiert nur mit wenigen Genomfragmenten . . . . .	66
3.3.5	Isolierung und Sequenzierung genomischer R18-Klone . . . . .	66
3.3.6	Untersuchung der Interaktion eines GUS-Reportergenkonstruktes mit cDNA-Klon R18 durch transiente Expression in Tabak-Protoplasten . . . . .	73

---

<b>4 Diskussion</b>	<b>75</b>
4.1 Isolierung des R18-Gens mit Hilfe des Hefe One-Hybrid Systems	75
4.2 R18 kodiert für einen bisher nicht beschriebenen Transkriptionsfaktor . . . . .	78
4.3 Das R18-Protein bindet an das Fragment 3.5 des CDeT27-45 Promotors . . . . .	81
4.4 Mögliche Funktion von R18 . . . . .	83
4.5 Ausblick . . . . .	86
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>88</b>
<b>6 Anhang</b>	<b>90</b>
6.1 Abkürzungen und Akronyme . . . . .	90
6.2 EMSA-Sonden und Oligonukleotidsequenzen . . . . .	93
6.3 Datenbankzugangscodes für die in Abbildung 3.7 aufgeführten Sequenzen . . . . .	94
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>96</b>

---

# 1. Einleitung

---

## 1.1 “Pflanzenphysiologie ist zu einem erstaunlichen Grad die Untersuchung von Wasser”

Pflanzen verbinden die Reiche der belebten und der unbelebten Materie, indem sie aus anorganischen Stoffen mit Hilfe von Sonnenenergie die organischen Substanzen bilden, aus denen sich alles Leben aufbaut und erhält. Daß das Wasser bei diesen Assimilationsprozessen der Pflanzen eine zentrale Rolle spielt und ein existentieller Zusammenhang besteht zwischen Pflanzen, Wasser und Nahrung, ist den Menschen seit jeher bekannt und Gegenstand der Betrachtung. Dies illustrieren etwa die folgenden Bibelverse sehr poetisch in Form einer Frage:

Wer hat dem Wetterguß eine Rinne gegraben und einen Weg dem  
Donnerstrahl,  
um Regen zu senden auf menschenleeres Land, auf die Wüste, da  
niemand weilt,  
die Öde und Wildnis zu sättigen und junges Grün sprossen zu lassen  
aus durstigem Land? (Hiob, 38, 25-27)

Die in diesen Versen des Buches Hiob beschriebene Abhängigkeit pflanzlichen Gedeihens von einer ausreichenden Wasserversorgung (und damit die allen anderen Lebens) wird belegt durch die Korrelation zwischen terrestrischer Biomassenproduktion — 99.9% davon sind pflanzlich [34] — und der Niederschlagsverteilung auf der Erde [71]. Die Ursache für diese Abhängigkeit liegt in den Schlüs-



selfunktionen, die das Wasser in der Pflanze erfüllt. Die Physiologie der Pflanze ist dabei in so hohem Grad bestimmt durch die Eigenschaften des Wassers, daß Salisbury und Ross [97] ihr Lehrbuch der Pflanzenphysiologie mit dem im Titel dieses Abschnittes übersetzten Zitat einleiten: "Plant physiology is, to a surprising degree, the study of water."

Wie in Zellen anderen Ursprungs ist Wasser mit einem Anteil von 85 – 90% an der Zellmasse [82] bei Pflanzen das Lösungsmittel, in dem sich der überwiegende Teil biochemischer Prozesse abspielt. Jedes metabolisch aktive Leben bedarf eines Lösungsmittels, in dem die notwendigen chemischen Reaktionen von Biopolymeren und ihrer Bausteine stattfinden können, weil die Moleküle genügende Bewegungsfreiheit haben müssen, um sich zu treffen, miteinander zu reagieren und sich wieder zu trennen. In kristallinen Festkörpern oder in fester Lösung (eingebettet in Kristalle oder im Glaszustand) sind Moleküle zu unbeweglich und reaktionsträge; andererseits verdampfen Polymere schlecht oder gar nicht und zerfallen in Gasform sehr schnell, weswegen gasförmiges Leben nicht möglich ist. Nur in Flüssigkeiten sind ausreichende Beweglichkeit und Stabilität für Biomoleküle gleichzeitig gegeben [63].

Wasser, die häufigste Flüssigkeit auf der Erdoberfläche, besteht aus sehr kleinen Molekülen, welche durch semipermeable Membranen leicht ein- und austreten können und somit eine Kompartimentierung von Zellen in verschiedene Reaktionsräume zulassen. Ihr gewinkelter Bau und die daraus resultierende Polarität mit einer negativen Partialladung am Sauerstoff sowie einer positiven Partialladung auf der Seite der Wasserstoffatome ermöglicht den H<sub>2</sub>O-Molekülen die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und verleiht Wasser eine Reihe von anomalen physikalischen Eigenschaften [14][31]. So hat Wasser trotz der geringen Größe seiner Moleküle die extrem hohe Flüssigkeitsspanne von 100°C (bei einem Druck von 1 atm), so daß es als Biosolvens über einen großen Temperaturbereich zur Verfügung steht. Die hohe Verdampfungswärme zusammen mit der hohen Wärmekapazität und der großen Wärmeleitfähigkeit ziehen die Eignung als idealer Thermoregulator nach sich. Weiterhin besitzt Wasser einerseits eine Viskosität, die geringer ist als die anderer Flüssigkeiten bei gegebener Temperatur, so daß es dünnflüssig auch im unteren Bereich seiner Flüssigkeitsspanne bleibt, andererseits ist die Kohäsion (Zerreiβfestigkeit) und die Adhäsion (Benetzungsfähigkeit) hoch, was Pflanzen beispielsweise zum Transport gegen die Schwerkraft in den kapillaren Gefäβen des Xylems ausnutzen. Wasser besitzt mit  $7.2 \times 10^9 \frac{N}{m}$  (gegen Luft) die höchste Oberflächenspannung aller Flüssigkeiten; die Tendenz, möglichst kleine geordnete Oberflächen zu bilden, erlaubt hydrophobe Wechselwirkungen in Wasser und die Ausbildung von Membranen. Die auf der geringen

Tabelle 1.1: Eigenschaften des Wassers und ihre Relevanz für die Pflanze

Eigenschaft des Wassers	Relevanz für die Pflanze
geringe Viskosität, hohe Kohäsion, hohe Adhäsion	Eignung als Massentransportmittel in den Kapillargefäßen des Xylems
geringe Kompressibilität	Eignung zur osmotischen Erzeugung hydraulischen Druckes für mechanische Bewegungen, Stützung und Formgebung
hohe dielektrische Konstante	Lösungsmittel für eine Vielzahl polarer bis mäßig apolarer Teilchen wie Ionen, Zuckern, Alkoholen etc.
geringe Quantenabsorption unterhalb von 850 nm	Nutzung von Lichtquanten aus dem sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Wellenspektrums für die Photosynthese
Redoxpaar $2 \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$ stark positiv	Eignung als Protonen- und Elektronendonator in der Photosynthese
hohe Verdampfungswärme, Wärmekapazität und Wärmeleitfähigkeit	Eignung als thermoregulierendes Medium

Kompressibilität des Wassers begründete Möglichkeit der Erzeugung hydraulischen Druckes wird bei Tieren für Flüssigkeitskreisläufe genutzt, bei Pflanzen zur mechanischen Bewegung, Stützung und Formgebung.

Wasser ist beständig im flüssigen Zustand und chemisch stabiler als die gelösten Biomoleküle, so daß es deren Reaktionen nicht stört. Die hohe Dielektrizitätskonstante — nur  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{HCN}$  besitzen eine höhere [31] — gepaart mit der geringen Molekülgröße machen Wasser zu einem ausgezeichneten Lösungsmittel für eine Vielzahl polarer bis schwach apolarer Teilchen (beispielsweise Ionen, Säuren, Basen, Zucker und Alkohole) und erlaubt die Bildung von Solvathüllen (Solvatation, Quellung). Die elektrolytische Dissoziation des  $\text{H}_2\text{O}$ -Moleküls in  $\text{H}^+$  und  $\text{OH}^-$  ist sehr gering ( $K_W = 10^{-14} \frac{\text{mol}^2}{\text{l}^2}$  bei  $22^\circ\text{C}$  [20]). Dadurch ist Wasser eine neutrale Flüssigkeit, die dennoch hydrolytische Reaktionen erlaubt, d. h. die Spaltung von Polymeren oder die Abspaltung von Atomgruppen durch Einbau von Wasser. Aufgrund seines stark positiven Redoxpotentials dient das Redox-

paar  $2 \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$  den Pflanzen als Protonen- und Elektronendonator zur chemischen Fixierung von Lichtenergie in der Photosynthese. Diese Aufzählung der Eigenschaften des Wassers und ihrer biologischen Nutzung zeigen seine Bedeutung für die Pflanzen und sind im Hinblick darauf in der Tabelle 1.1 zusammengefaßt.

## 1.2 Wasserversorgung als Grundvoraussetzung für Wachstum und Entwicklung bei den Pflanzen

Pflanzen nehmen das Wasser über die Wurzeln im Boden auf, leiten es über die durchgehenden Verbindungen der Xylemgefäße im Sproß und durch den Apoplasten zu den Blättern und geben es durch die Stomata an die Luft ab. Dabei transportiert das Wasser im Aufwärtsstrom der Xylemgefäße aus dem Boden gelöste Nährstoffe an Orte des Verbrauchs und dient selbst als Ausgangsstoff in der Photosynthese oder als Reaktionspartner in hydrolytischen Reaktionen.

Die Energie für diesen gegen die Schwerkraft gerichteten Transpirationsstrom des Wassers durch die Pflanze stammt aus der Differenz zwischen dem relativ hohen (wenig negativen) chemischen Potential des Wassers im Boden und dem meist sehr viel niedrigeren (stark negativen) Wasserpotential der Luft, woraus eine sehr starke Saugspannung resultiert [97]. Wasser besitzt aufgrund der durch Kohäsion bedingten hohen Zerreißfestigkeit die Fähigkeit, den durch diese Saugspannung und durch Osmose in den Symplasten ausgehenden Zug bis in den Boden hinter auszudehnen, ohne daß die durchgehenden Wasserfäden reißen. Um unter der saugenden Kraft dieser Spannung nicht zu kollabieren, müssen die Gefäße durch lignifizierte Wandverstärkungen offen gehalten werden [119]. Prinzipielle Kontrollpunkte der Pflanzen für diese Wasserbewegungen sind die Stomata, die als regulatorische Ventile zwischen dem feuchten Blattinneren und der trockenen Luft in einer durch eine impermeable Kutikula geschützten Epidermis liegen.

Die Nutzung des Wassers als Transportmittel entlang des Transpirationsstroms zieht einen erheblichen Wasserbrauch der Pflanzen nach sich; die Wasserökonomiequotienten liegen für Pflanzen zwischen 1 und 10 g gebildete Trockenmasse pro kg verbrauchtem Wasser, wobei nur wenige Prozent in der Pflanze verbleiben, während der weitaus größte Teil von der Pflanze als Wasserdampf abgegeben wird [82]. So ist die ausreichende Wasserversorgung des pflanzlichen Organismus eine Grundvoraussetzung zur Aufrechterhaltung seiner Lebensfunktionen.

### 1.3 Überleben ohne Wasser — Trockentoleranz als weitverbreitete Überlebensstrategie bei Pflanzen

Selbst in Regionen mit statistisch häufigen, über das ganze Jahr verteilten Niederschlägen wie in Mitteleuropa gibt es immer wieder Phasen, in denen den Pflanzen nicht genügend Wasser zur Verfügung steht, ebenso wie es auch hier meist kleinflächige Areale gibt, die aufgrund mikroklimatischer Gegebenheiten und lokaler Bodenbeschaffenheit durch Wassermangel gekennzeichnet sind [121]. In weiten Gebieten der Erde jedoch treten Niederschläge nur periodisch oder selten und unregelmäßig auf, so daß die ausreichende Wasserversorgung der Pflanzen ebenfalls nur periodisch oder selten und unregelmäßig gegeben ist. Bedingt durch die geschilderte Abhängigkeit lebensnotwendiger physiologischer Funktionen von einer genügenden Wasserzufuhr bewirkt Wassermangel bei Pflanzen Trockenstreß, der die pflanzliche Entwicklung je nach Ausprägung beeinträchtigt. Da Trockenstreß in vielen Regionen der Erde regelmäßig und in den übrigen Gegenden wenigstens gelegentlich auftritt, ist er die häufigste und am weitesten verbreitete Form abiotischen Stresses und die wichtigste Ursache eingeschränkten Pflanzenwachstums [16].

Mit vielfältigen morphologischen und physiologischen Vorkehrungen begegnen Pflanzen dem Wassermangel und versuchen, den dadurch hervorgerufenen Trockenstreß zu überleben. So beobachtet man bei einigen Pflanzen, die in regelmäßig dürregefährdeten Gebieten leben, daß sie dicke Kutikeln ausbilden, die Stomata einsenken und die Oberfläche verringern, um den Transpirationswiderstand zu erhöhen; Beispiel hierfür sind die Kakteen und andere Sukkulenten [107]. Xerophyten wie *Allocasuarina* aus Australien haben in Anpassung an häufige Trockenheit ihre Blätter zu schuppenförmigen Gebilden zurückgebildet und machen Gebrauch von photosynthetisch aktiven Sproßabschnitten (Cladoden) zusätzlich zur Erhöhung des Transpirationswiderstandes durch Schluß der Stomata [123]. Im Gegensatz dazu verzichten andere Bewohner arider Zonen wie Vertreter der Gattung *Eucalyptus* ganz auf die Verringerung des Transpirationswiderstandes [106] und bilden stattdessen extrem tiefreichende Wurzelsystem aus, um sich unterirdische Wasserreservoirs zu erschließen. C<sub>4</sub>- und CAM-Kohlenstoff-Fixierung, wie sie bei vielen Xerophyten anzutreffen ist, geben Pflanzen trockener, lichtreicher Standorte einen besseren Wasserökonomiequotienten im Vergleich zu C<sub>3</sub>-Pflanzen [88].

Während aber diese Adaptationen, die man unter dem Begriff der Austrocknungsvermeidung (*drought avoidance* [72]) zusammenfassen kann, meist spezi-

elle Anpassungen darstellen, hat sich die Fähigkeit von Zellen, Organen und sogar ganzer Organismen, vollständige Austrocknung zu überleben (Trockentoleranz, *drought tolerance*) in den meisten systematischen Gruppen des Pflanzenreichs entwickelt [50]. Sogar in der Gruppe der Angiospermen, wo der sporophytische Pflanzenkörper durch eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Austrocknung gekennzeichnet ist, überstehen Strukturen wie Samen oder Pollen extremen Wasserentzug ohne Vitalitätsverlust und sichern ihrer Art eine Verbreitung, die nicht von Perioden mangelhafter Wasserversorgung begrenzt ist. So gibt es Wüstpflanzen, die die kurzen, unregelmäßig auftretenden Regenfälle zum Durchlaufen ihres Reproduktionszyklus nutzen und danach unter Umständen jahrzehntelang bis zum nächsten Regen als Same die Trockenheit überdauern.

Dabei ist die durch Austrocknungstoleranz erreichte Möglichkeit, Zeiten im Zustand einer Anhydrobiose [26] zu überdauern, von Pflanzen weiter ausgenutzt worden, um auch andere Formen abiotischen Stresses zu durchstehen. So ist der trockenolerante Same als sehr widerstandsfähige Diaspore beispielsweise gegenüber Kälte- und Frosteinwirkungen oder bei der Verdriftung durch Meerwasser wesentlicher Teil der Überlebensstrategie vieler Pflanzen.

Im Gegensatz zu der großen Mehrheit der Gefäßpflanzen, bei der sich die Austrocknungstoleranz auf bestimmte Stadien beschränkt und die versucht, das Zellwasserpotential möglichst konstant zu halten (Homoiohydrie [107]), sind einige Kormophyten in der Lage, ihr Zellwasserpotential in Abhängigkeit vom umgebenden Wasserpotential zu ändern (Poikilohydrie) und auch die völlige Austrocknung des vegetativen Pflanzenkörpers zu tolerieren. Diese physiologisch durch Austrocknungstoleranz ihres Sporophyten charakterisierten Gefäßpflanzen werden als Wiederauferstehungspflanzen (*resurrection plants* [42]) bezeichnet. Ungefähr 140 Wiederauferstehungspflanzen sind dokumentiert. Sie verteilen sich innerhalb verschiedener systematischer Gruppen über di- und monokotyle Angiospermen sowie Farne; von den Gymnospermen sind keine poikilohydrischen Spezies beschrieben worden [9][50]. Ein bekannterer Vertreter ist die aus Afrika stammende *Crateostigma plantagineum* ("Rhodesian Violet") aus der Familie Scrophulariaceae.

## 1.4 Samen und Wiederauferstehungspflanzen als Studienobjekte zur Untersuchung der molekularen Mechanismen der Trockentoleranz

Trockentolerante Strukturen sind bei den meisten Pflanzenarten anzutreffen, und Trockentoleranz der ganzen Pflanze ist punktuell über das gesamte Pflanzenreich verbreitet [99]. Dies legt die Vermutung nahe, daß die genetischen Voraussetzungen, die für die Ausbildung der Trockentoleranz notwendig sind, bei allen Pflanzen gegeben sind und daß es möglicherweise nur weniger Änderungen im Ablauf der Entwicklungsprogramme bedarf, um einen Pflanzenkörper austrocknungstolerant werden zu lassen. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Ähnlichkeit der grundsätzlichen molekularen Vorgänge, die bei Samen wie bei Wiederauferstehungspflanzen zum Erwerb der Trockentoleranz führen [56] und die in Abbildung 1.1 schematisch dargestellt sind. Zwar scheint die Austrocknungstoleranz bei Wiederauferstehungspflanzen durch das Vorhandensein eines entwickelten Gefäßsystems zusätzliche Aspekte zu umfassen, doch gleichen sich, so weit bisher identifiziert, die grundsätzlichen Vorgänge beim Erwerb der Trockentoleranz bei Samen und Wiederauferstehungspflanzen.

Zur Untersuchung der molekularen Mechanismen der Trockentoleranz hat die Verwendung von Wiederauferstehungspflanzen wie *Craterostigma plantagineum* als Studienobjekt gegenüber Samen den Vorteil, daß parallele Entwicklungsvorgänge fehlen, die es durch Überlagerung erschweren, die Wege, die zum Erwerb der Austrocknungstoleranz führen, von anderen zu differenzieren. *Craterostigma plantagineum* im speziellen hat zudem den Vorzug der ABA-abhängigen Induzierbarkeit der Trockentoleranz in Kallus-Gewebe, die es ermöglicht, Signalwege, die zur Trockentoleranz führen, parallel oder im Vergleich zur ganzen Pflanze zu untersuchen [5][56].

Da nur eine begrenzte Anzahl von Pflanzen sich Austrocknungstoleranz auch in reifen Geweben erhält, scheint ein Selektionsvorteil nur in einigen ökologischen Nischen gegeben zu sein, während Wiederauferstehungspflanzen anderswo in Wachstum sowie Reproduktion und Verbreitung benachteiligt sind. Oft sind Wiederauferstehungspflanzen Bewohner felsiger Gebiete in ariden Regionen, in denen zu häufigen, langen Perioden der Trockenheit auch noch Stressbelastungen durch extreme Temperaturschwankungen oder Salzreichtum des Bodens treten [99]. Somit liegt auch hier eine Ähnlichkeit zu den gleichfalls gegenüber vielen Streißformen resistenten Samen vor.

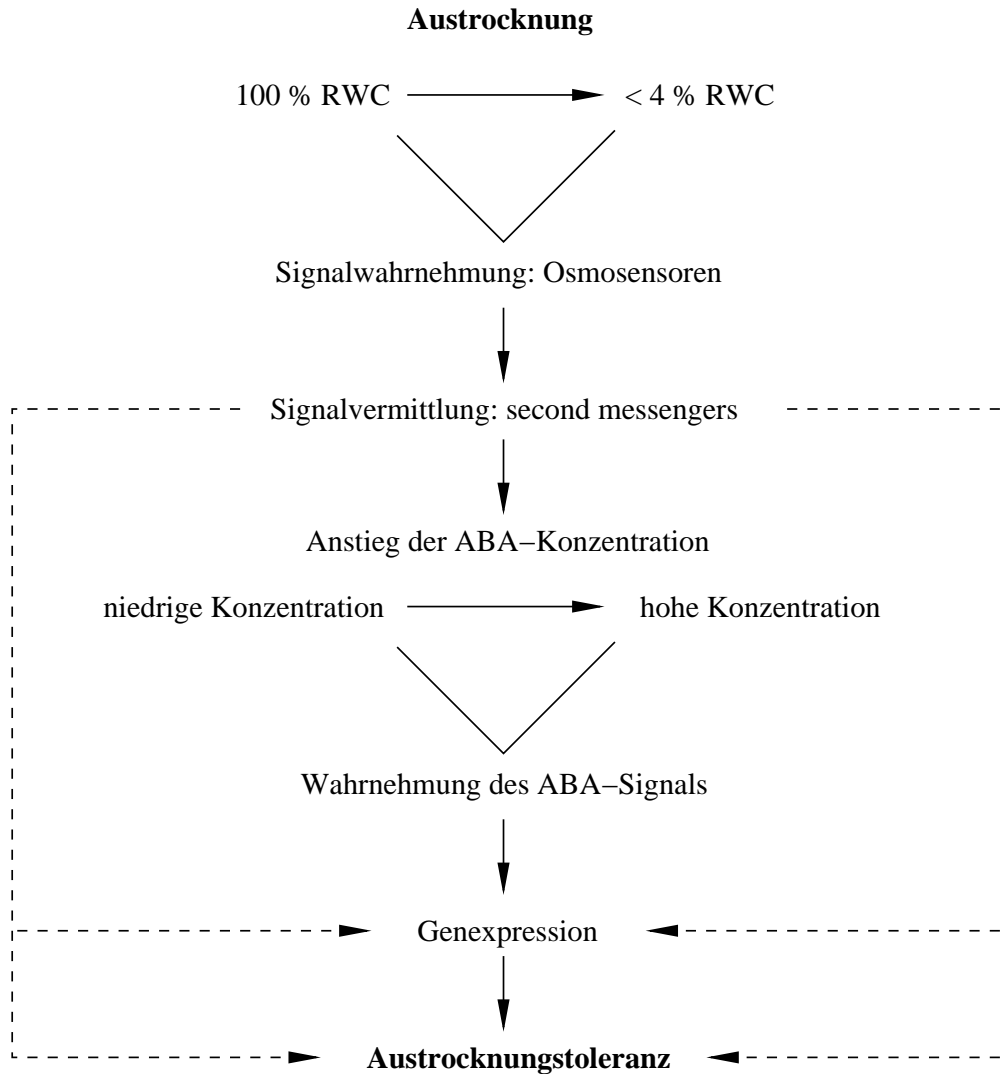


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Wege, die zur Ausprägung der Trockentoleranz in Samen und in Wiederauferstehungspflanzen führen. RWC: relativer Wassergehalt. Neben dem ABA-abhängigen Weg der Signaltransduktion ist gestrichelt der ABA-unabhängige Weg eingezeichnet. Osmosensoren und als Signalvermittler wirkende *second messengers* sind noch nicht identifiziert.

## 1.5 Von der Austrocknung zur Trockentoleranz: die molekularen Reaktionen der Zelle und die Signaltransduktionsketten, die zu ihnen führen

Aufgrund der eingangs beschriebenen Verwendung von Wasser für ein breites Spektrum physiologischer Vorgänge folgen dem Wasserentzug und einer dadurch angestoßenen Ausbildung der Trockentoleranz eine Vielzahl geordneter Prozesse in den Organen und Zellen der Pflanzen nach. Dabei gehören zur vollständigen Ausprägung der Trockentoleranz nicht nur die Vorgänge, die zur Trockentoleranz im engeren Sinne führen, sondern auch die Prozesse, die der späteren Rehydratation dienen.

So wird durch eine verstärkte Glykolyse dem erhöhten Energieverbrauch Rechnung getragen, was sich in einer Expressionssteigerung der Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase und anderer beteiligter Enzyme äußert. Ebenfalls verstärkt gebildet werden einhergehend mit der erhöhten Expression der entsprechenden Enzyme Zucker wie Trehalose, Saccharose, Raffinose oder Stachyose sowie Betain und Prolin als weitere kompatible Lösungsmittel. Diese Stoffe können subzelluläre Strukturen und Proteine durch Ersatz der Hydrathüllen stabilisieren und der Akkumulation chaotroper Ionen wie  $\text{Cl}^-$  und  $\text{NO}_3^-$  durch Sequestrierung entgegenwirken, welche in erhöhter Konzentration zur Dissoziation von Proteinuntereinheiten und Membranelementen führen können [1][26][57]. Überdies wird gerade den Zuckern eine Rolle bei der Ausbildung eines glasartigen Zustandes des Cytosols zugesprochen, das auf diese Weise durch die Reaktionsträgheit seiner Komponenten trockene Zeiten unbeschadet überstehen kann (vgl. Abschnitt 1.1 [63]). Massiv exprimiert werden auch die bereits erwähnten LEA-Proteine, denen eine ähnliche Rolle wie den kompatiblen Lösungsmitteln zugeschrieben wird [16][24] und die als molekulare Marker für die Ausbildung von Trockentoleranz verwendet werden.

Parallel werden Zellstrukturen der Austrocknung durch Änderung der Zellwandextensibilität oder Abbau von Chloroplastenmembranen angepaßt, was die Bildung der dafür notwendigen Enzyme sowie den Abbau von Proteinen nach sich zieht. Letzterem dient die verstärkte Expression von Proteasen, Ubiquitin und Hitzeschockproteinen. Der Beseitigung aktiver Sauerstoffspezies, die aus der Umordnung des Stoffwechsels resultieren, dienen aufregulierte Enzyme wie Glutathionreductase, Superoxiddismutase, Glyoxylatoxidase oder Ascorbatperoxidase. Zur



osmotischen Adaptation und zur Vorbereitung der Rehydratation der Zelle werden Wasser- und Ionenkanäle wie major intrinsic proteins (MIP) bei Trockenstreß verstärkt gebildet [79].

Noch sehr fragmentarisch sind die Kenntnisse über die Signaltransduktionsketten, die zu diesen molekularen Antworten der Pflanzenzellen führen. Vermutlich geht von der Wurzel ein Signal aus, daß die Wasserzufuhr knapper wird [29], doch auch die Blätter werden als Orte der Reizwahrnehmung im Hinblick auf Wassermangel diskutiert [67]. Unklar ist, wie das physikalische Signal Wassermangel in eine biochemische Antwort umgewandelt wird und wie die von einzelnen Zellen ausgehenden Signale über die ganze Pflanze integriert werden. Denkbare zelluläre Meßgrößen sind Turgorabfall, Änderung des Zellvolumens oder der Membranfläche, Verlust der Membranspannung, Änderung der Lösungskonzentration oder Änderung in der Zellwand-Plasmaverbindung [13].

Die Natur der Osmosensoren höherer Pflanzen liegt trotz der Charakterisierung von Kandidaten wie Histidin-Kinasen aus *Arabidopsis* [116] weitgehend im Dunkeln, und unbeantwortet ist die Frage, ob es Unterschiede in der Wahrnehmung des von der Mutterpflanze induzierten Wasserentzugs, wie im Falle des Samens, und der Austrocknung der Wiederauferstehungspflanzen gibt. Welche Rolle MAP (Mitogen Activated Protein) Kinase Kaskaden wie im Falle der HOG (High Osmolarity Glycerol) Signaltransduktionswege der Hefe [91] bei Pflanzen spielen ist noch nicht entgültig geklärt. Die Komponenten der von animalischen Zellen her bekannten second messenger Systeme wie Kinasen, Calcium-regulierte Proteine oder Phospholipasen sind auch aus Pflanzen bekannt und werden in Zusammenhang mit den Antworten pflanzlicher Zellen auf Trockenheitsstreß gebracht [56][105].

Demgegenüber kann es als gesichert gelten, daß Abscisinsäure (ABA) ein biochemischer Signalträger nach Umwandlung des Reizes ist [29]. Das Sesquiterpen Xanthoxin, eine ABA-Vorstufe, wird aus dem Carotenoid Zeaxanthin in der Plastide gebildet, ins Cytosol transportiert und dort in ABA umgeformt [27]. Zahlreiche ABA-Biosynthesemutationen wie *aba1* aus *Arabidopsis thaliana* oder *vp8* aus Mais sind beschrieben worden [80]. Ein Anstieg der ABA-Konzentration auf Austrocknung hin ist sowohl im Zuge der Ausbildung der Trockentoleranz des Samens als auch bei den bisher untersuchten Wiederauferstehungspflanzen beobachtet worden [17][50]. Nicht geklärt ist hingegen, wie der Anstieg der ABA-Konzentration von nachgeschalteten Gliedern der Signaltransduktionskette perzipiert wird und wie die Pflanzenzelle zwischen selbst produziertem ABA und von außen herantransportierter Abscisinsäure unterscheidet [29].

## 1.6 Durch Austrocknung und ABA induzierte Genexpression und daran beteiligte Transkriptionsfaktoren

Einige der mit der Ausprägung der Austrocknungstoleranz assoziierten Vorgänge finden unmittelbar nach Wahrnehmung des Trockenstresses statt und können aufgrund ihrer Reaktionsgeschwindigkeit nicht auf einer veränderten Genexpression basieren. Ein Beispiel für einen derartigen Vorgang ist die Trockenstreß-induzierte Aktivierung der Phospholipase D in *Craterostigma plantagineum* [39], die kein exogenes ABA benötigt. Viele andere Vorgänge im Zusammenhang mit der Ausbildung der Trockentoleranz beruhen demgegenüber auf einer veränderten Genexpression. Hierbei sind verschiedene Muster beschrieben worden. So ist im Falle von *Craterostigma plantagineum* das Transkript eines Homologen des PvSRP-Proteins (Stress Related Protein aus *Phaseolus vulgaris*) bereits eine halbe Stunde nach Austrocknungsbeginn in Blättern nachweisbar und verschwindet nach vier Stunden wieder [11]. Neben diesen transient exprimierten mRNAs gibt es andere, die auf Austrocknung hin verschwinden, wie beispielsweise das PSII-Protein des Wasser-oxidierenden Komplexes, und wieder andere, die heraufreguliert werden, wie eine Reihe von LEA-Gen-Transkripten [5][11].

Außer Genen, die durch das zeitliche Muster ihrer Expression charakterisiert sind, gibt es Gene, die räumlich differentiell auf Austrocknung hin exprimiert werden, wie beispielsweise das Myb-Gen *cpm7* aus *Craterostigma plantagineum*, welches nur in Wurzeln gebildet wird [59].

Je nachdem, ob das als biochemischer Signalträger bereits erwähnte Phytohormon ABA bei exogener Applikation an Stelle von Trockenstreß die Bildung eines Transkriptes auslösen kann oder nicht, sind die ABA-abhängige und die ABA-unabhängige Genexpression unterscheidbar [105]. So ist zum Beispiel die Expression des erwähnten Myb-Gens *cpm7* [59] oder die des Homeodomänen-Leucinzipper-Protein Gens *CPHB-1* aus *Craterostigma plantagineum* [40] durch Trockenstreß, aber nicht durch exogenes ABA induzierbar. Demgegenüber werden die für die Phase der Ausprägung der Trockentoleranz charakteristischen LEA-Gene sowohl auf Trockenstreß als auch Behandlung mit exogenem ABA hin exprimiert [24].

Die Analyse von Promotoren Trockenstreß-induzierter Gene führte zur Identifikation von *cis*-Elementen, die in Zusammenhang mit der differentiellen Expression stehen, sowie der zugehörigen Transkriptionsfaktoren. So ist das *drought*

*response element* DRE [125] von Genen bekannt, die unabhängig von ABA exprimiert werden, wie COR15 $\alpha$  und RD29A aus *Arabidopsis thaliana*. Ebenfalls aus *Arabidopsis thaliana* wurde der an das DRE-Element bindende Transkriptionsfaktor CBF1 isoliert, der die von einigen Pflanzenproteinen her bekannte Apetala2-Domäne als DNA-Bindungsmotiv besitzt [110]; die ebenso an DRE-Elemente bindenden Transfaktoren DREB1 und DREB2 sind gleichfalls durch eine AP2-Domäne charakterisiert [76]. Das im Zusammenhang mit Trockenstreß bestuntersuchte *cis*-Element ist das ABA-responsive element ABRE, welches das G-Box-Kernelement ACGT enthält und aus vielen Promotoren ABA-induzierbarer Gene wie EM aus Weizen [49] oder Rab16A aus Reis [108] bekannt ist [56]. Als *trans*-Elemente, die mit dem ABRE-Motiv interagieren, wurden basische Leucinzipper-(bzip) Proteine isoliert, beispielsweise EmBP1 aus Weizen [49] oder DPBF1 aus *Daucus carota* [64]; ein DPBF1-Homolog aus *Arabidopsis thaliana* ist ABI5 [37].

Während für das ABRE Promotor Element Em1a aus Weizen gezeigt wurde, daß es in mehreren Kopien an einen 35S-Minimalpromotor fusioniert hinreichend ist für die ABA-vermittelte Expression eines Reportergenes [49], stellte es sich im Falle des HVA22-Promotors aus Gerste heraus, daß das ABRE notwendig, aber nicht ausreichend ist für eine ABA-stimulierte transkriptionelle Genaktivierung. Zusätzlich war hier noch das aus vielen ABA-regulierten Promotoren bekannte coupling element CE1 [103] notwendig. Über die Natur der an das CE1-Element bindenden *trans*-Faktoren ist nichts bekannt, während das verwandte CE3-Element [104] zum ABRE-Element funktionell äquivalent zu sein scheint und ebenfalls von einem bzip-Protein erkannt wird [53].

## 1.7 Ziel dieser Arbeit

Aus der Wiederauferstehungspflanze *Craterostigma plantagineum* als Modellsystem zur Untersuchung der molekularen Grundlagen der Austrocknungstoleranz bei Pflanzen ist das Gen CDeT27-45 isoliert worden, das für ein LEA-artiges Protein kodiert [5]. Die Expression des CDeT27-45 Transkriptes erfolgt in den Wurzeln und in Blättern auf Austrocknung sowie auf exogen appliziertes ABA hin [90]. Die Untersuchung des Promotors dieses Gens führte zur Identifikation eines minimalen Bereiches, der die ABA-stimulierte Expression eines Reportergens in *Craterostigma*-Protoplasten vermitteln kann [81]. Außer vier ABRE-Elementen fanden sich innerhalb dieses Bereiches zwei AGCCC-*cis*-Elemente. Der Bereich mit diesen aus dem Promotor des embryo-spezifisch exprimierten Gens der  $\alpha$ -Untereinheit des Samenspeicherproteins  $\beta$ -Conglycinin aus *Glycine max* bekannt

ten Elementen [18] erwies sich als notwendig, aber nicht ausreichend zur ABA-vermittelten Reportergenexpression in *Craterostigma*-Protoplasten [85]. Ein 28 Basen umfassendes Promotorfragment mit den beiden AGCCC-Motiven war in Gegenwart von Kernproteinen geschützt vor DNaseI im DNase-footprint assay, und Gelverzögerungsexperimente mit diesem Promotorfragment und Kernproteinen aus *Craterostigma*-Callus führten zu retardierten DNA-Proteinkomplexen [85].

Aus diesen Befunden ergibt sich die Frage nach den Faktoren, die an den Promotorbereich mit den AGCCC-Elemente binden. Im Hinblick auf diese Frage sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst die Bindungsaktivitäten an die AGCCC-Elemente aus dem CDeT27-45 Promotor bezüglich ihrer Verbreitung in verschiedenen Geweben charakterisiert werden. Die aus diesen Untersuchungen gewonnenen Erkenntnisse sollten in dem zur Identifizierung von *cis*-Element-spezifischen Interaktionspartnern geeigneten Hefe One-Hybrid Versuch zur Isolierung von Proteinen verwendet werden, die als Transfaktoren an ein *cis*-Element mit dem AGCCC-Motiv binden. Dazu sollte ein Hefe One-Hybrid System etabliert werden und mit seiner Hilfe eine cDNA-Bibliothek nach cDNA-Klonen durchsucht werden, die für Proteine kodieren, die mit dem die AGCCC-Motive umfassenden *cis*-Element interagieren. Isolierte Klone sollten in Hefe und *in vitro* im Hinblick auf die Spezifität ihrer DNA-Interaktion überprüft werden. Klone, deren Interaktion mit dem AGCCC-*cis*-Element sich bestätigte, sollten molekularbiologisch bezüglich ihrer Transkriptionsfaktoreigenschaften charakterisiert werden.

---

## 2. Material und Methoden

---

### 2.1 Anzucht und Transformation von *Escherichia coli*

#### 2.1.1 Verwendete Stämme von *Escherichia coli*

##### **KC8 [64]**

Genotyp pyrF::Tn5 hsdR leuB600 trpC9830 lac $\Delta$ 74 strA galK hisB436

Um Plasmide aus Hefe-DNA-Präparationen mit Hilfe von Auxotrophiemarkern zu isolieren, wurde dieser Bakterienstamm als Wirt verwendet.

##### **DH10B [44]**

Genotyp F<sup>-</sup> mcrA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 deoR recA1 endA1 araD139  $\Delta$ (ara,leu)7697 galU galK  $\lambda^-$  rpsL nupG

Dieser Bakterienstamm wurde zur Transformation und Amplifikation der Hefe One-Hybrid cDNA Bibliothek verwendet sowie für Subklonierungen.

##### **XL1-BlueMRF' [111]**

Genotyp  $\Delta$ (mcrA)183  $\Delta$ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac[F'proAB lacIqZ $\Delta$ M15 Tn10 (Tetr)]

XL1-BlueMRF' wurde für einfache Plasmidamplifikationen und als Wirtsstamm für  $\lambda$ -Phagenbanken verwendet.

**BL21 [113]**

Genotyp F<sup>-</sup> ompT gal [dcm] [Ion] hsdSB (rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup>)

BL21 ist ein proteasedefizienter Stamm, der als Wirt zur Expression von GST-Fusionsprotein eingesetzt wurde.

**2.1.2 Medien zur Haltung und Anzucht von *Escherichia coli*****LB-Medium**

10g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Bacto-Hefeextrakt, 10 g/l NaCl; mit 1 M NaOH pH auf 7.5 einstellen; für feste Medien zusätzlich 15 g/l Agar.

**NZ-Medium**

10 g/l NZ-Amin, 5 g/l Bacto-Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 2 g/l MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1 g/l Pepton; für feste Medien zusätzlich 15 g/l Agar bzw. 6g/l Agarose ("NZ-Agarose")

**NZ-Topagar**

NZ-Medium mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 6 g/l Agarose anstelle von Agar.

**TYP-Medium**

16 g/l Trypton, 16 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 2.5 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; mit 1 M NaOH pH auf 7.5 einstellen.

**M-9 Medium**

6 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 g/l NaCl, 1g/l NH<sub>4</sub>Cl, 15 g/l Agar wurden in 900 ml H<sub>2</sub>O autoklaviert und anschließend auf 50 °C abgekühlt. Dann wurden 2 ml/l 1 M MgSO<sub>4</sub>, 0.1 ml/l 1 M CaCl<sub>2</sub>, 10 ml/l 20% Glucose, 1 ml/l 1 M Thiamin-HCl und 100 ml 10×Dropout-Lösung (s. Medien zur Haltung und Anzucht von Hefen) zugesetzt.

**TB-Medium**

TB I: 23 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 164 g/l  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; TB II: 12 g/l Trypton, 24 g/l Hefeextrakt, 4 ml/l Glycerol; vor Gebrauch 1 Teil TB I mit 9 Teilen TB II mischen.

**SOC-Medium**

20 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Bacto-Hefeextrakt, 10 ml/l 1 M NaCl und 2.5 ml/l 1 M KCl mit Wasser auf ein Volumen von 980 ml bringen und autoklavieren; nach Abkühlung auf Raumtemperatur 10 ml/l 2 M  $\text{MgSO}_4$  und 10 ml/l 2 M Glucose steril zusetzen.

**Zusätze für Selektivmedien**

IPTG wird dem Medium in einer Endkonzentration von 1 mM, X-Gal von 0.02% [w/v], Ampicillin von 100  $\mu\text{g/ml}$ , Tetracyclin von 12.5  $\mu\text{g/ml}$  zugegeben.

**2.1.3 Transformation von *Escherichia coli*****Transformation durch Elektroporation**

Mit einer Einzelkolonie wurden 4 ml TYP-Medium inokuliert und über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Mit 2.5 ml dieser Vorkultur wurden 250 ml TYP-Medium inokuliert und bei 37°C und 200 rpm inkubiert, bis die Kultur eine  $\text{OD}_{600}$  von 0.5 erreicht hatte. Die Bakterien wurden für 30 Minuten auf Eis gestellt, dann wurden die Zellen mit 4000 rpm für 5 Minuten pelletiert. Das Pellet wurde in 250 ml eiskaltem sterilem Wasser resuspendiert und wie zuvor zentrifugiert. Diese Waschschrte wurden nacheinander mit 125 und 50 ml Wasser wiederholt, dann wurden die Zellen mit 50 ml eiskaltem sterilem 10% [v/v] Glycerol gewaschen. Zuletzt wurden die Bakterien in 1 ml 10% Glycerol aufgenommen und in Aliquots von 50  $\mu\text{l}$  in  $\text{N}_2$ liq schockgefroren. Zur Transformation durch Elektroporation wurde ein 50  $\mu\text{l}$  Aliquot der elektrokompetenten Zellen zu 10 - 50 ng in  $\text{H}_2\text{O}$  gelöster DNA in einer eisgekühlte 0.1 cm Elektroporationsküvette gegeben und für 1 Minute auf Eis inkubiert. Anschließend wurde mit 18 kV/cm bei 200  $\Omega$  Widerstand und einer Kapazität von 25  $\mu\text{F}$  elektroporiert, was zu Pulslängen von ca 4.5 ms führte. Die elektroporierten Zellen wurden in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und 1 Stunde bei 37°C und 200 rpm inkubiert, bevor sie in geeigneten Verdünnungen auf selektiven Medien ausplattiert wurden.

### **Transformation chemisch kompetenter Zellen**

3 ml LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft; anschließend wurde die Kultur über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert. 400 µl dieser Übernachtskultur wurden in 40 ml LB-Medium überimpft und ca 3-4 Stunden bei 37°C und 200 rpm im Schüttelinkubator angezogen, bis eine OD<sub>600</sub> von 0.5 erreicht wurde. Die Anzuchtkultur wurde in ein steriles Falcon überführt und 5 Minuten bei 4°C und 4000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml eiskalter 0.1 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert, dann wurde wie zuvor zentrifugiert. Die Zellen wurden in 10 ml eiskalter 0.1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und ein weiteres Mal wie oben zentrifugiert. Anschließend wurde das Bakterienpellet in 2 ml der eiskalten 0.1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung aufgenommen und auf Eis mindestens eine Stunde inkubiert. Die so gewonnenen chemisch kompetenten Zellen können drei Tage bei 4°C aufbewahrt und zur Transformation verwendet werden. Zur Transformation wurden 10-100 ng DNA mit 0.1 M eiskalter CaCl<sub>2</sub>-Lösung auf 100 µl gebracht und zu 100 µl chemisch kompetenten Bakterien gegeben. Der Transformationsansatz wurde vorsichtig gemischt und für eine Stunde auf Eis gestellt. Der Ansatz wurde dann für genau 90 Sekunden bei 42°C im Wasserbad inkubiert. Nach der Hitzebehandlung wurden 800 µl LB-Medium zugefügt und die transformierten Zellen eine Stunde bei 37°C und 200 rpm inkubiert bevor sie in geeigneten Verdünnungen auf selektiven Medien ausplattiert wurden.

## **2.2 Anzucht und Transformation von *Saccharomyces cerevisiae***

### **2.2.1 Verwendeter Stamm von *Saccharomyces cerevisiae***

YM954 [122]

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



### 2.2.2 Medien zur Haltung und Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae*

#### YPD-Medium

10 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Pepton, 20 g/l Glucose; für feste Medien zusätzlich 15 g/l Agar.

#### SC-Medium

6.7 g/l YNB, 20 g/l Glucose, 100 ml/l 10×Dropoutlösung (siehe Selektivmedien); für feste Medien zusätzlich 15 g/l Agar.

#### Selektivmedien

Je nach Selektionsziel wurden Dropoutlösungen verwendet, die eine oder mehrere der folgenden Komponenten enthielten: 400 mg/l Adenin, 1000 mg/l Leucin, 300 mg/l Lysin, 200 mg/l Uracil, 200 mg/l Tryptophan, 200 mg/l Histidin. 3-Aminotriazol, ein kompetitiver Inhibitor der Enzymaktivität des His3-Proteins in *Saccharomyces cerevisiae*, wurde eingesetzt, um ein Wachstum des Hefestammes YM954 aufgrund von Restaktivität bezüglich der His-3 Proteinexpression zu unterdrücken [32].

### 2.2.3 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* erfolgte unter Verwendung von Lithiumacetat nach Gietz und Schiestl [45].

- 10×TE: 0.1 M Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7.5
- 10×LiAc: 1 M Lithium Acetat, pH 7.5 (mit Essigsäure eingestellt)
- 1×TE/LiAc-Lösung: 1 Teil 10×TE, 1 Teil 10×LiAc und 8 Teile Wasser, stets frisch angesetzt
- PEG/LiAc-Lösung: 8 Teile 50% [w/v] PEG4000, 1 Teil 10×TE und 1 Teil 10×LiAc, stets frisch angesetzt
- Lachsspermien-DNA: Stammlösung sonifizierter Lachsspermien-DNA von Merck in einer Konzentration von 10 mg/ml

**Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* im kleinen Maßstab**

Eine Einzelkolonie wurde in 1 ml YPD durch Vortexen resuspendiert und zur Inokulation von 50 ml YPD verwendet. Die Vorkultur wurde bei 30°C und 200 rpm geschüttelt, bis eine OD<sub>600</sub> >1.5 erreicht worden war (ca 18 Stunden). 30 ml dieser Vorkultur wurden zu 300 ml YPD gegeben und ca 4 Stunden bei 30°C und 200 rpm geschüttelt, bis eine OD<sub>600</sub> von ca 0.5 erreicht wurde. Die Zellen wurden in 50 ml Falcons mit 1000g für 5 Minuten abzentrifugiert, in je 8 ml TE resuspendiert, in einem Falcon vereinigt und wie zuvor zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet in 1.5 ml frisch hergestelltem 1×TE/LiAc aufgenommen. Zur Transformation wurden in einem 1.5 ml Eppendorf 100 ng Plasmid-DNA und 100 ng Lachsspermien-DNA als Träger-DNA gemischt. Hierzu wurden 100 µl der kompetenten Hefezellen gegeben und der ganze Ansatz durch Vortexen gemischt. Anschließend wurden 600 µl PEG/LiAc-Lösung zugefügt, erneut durch Vortexen gemischt und dann bei 30°C für 30 Minuten bei 200 rpm inkubiert. Nun wurden 70 µl DMSO zugefügt und sachte gemischt. Der Transformationsansatz wurde für 15 Minuten im Wasserbad bei 42°C inkubiert, die Zellen anschließend für eine Minute auf Eis gestellt und dann für 5 Sekunden bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, die Zellen in 500 µl TE resuspendiert und in geeigneten Verdünnungen auf selektivem Medium ausplattiert.

**Transformation von Plasmidbibliotheken in *Saccharomyces cerevisiae***

Kompetente Hefezellen wurden wie zuvor beschrieben hergestellt. Zur Transformation wurden in einem 50 ml Falcon 20 µg cDNA-Plasmidbibliothek mit 2 mg Lachsspermien-DNA als Träger-DNA gemischt. Zu diesem Ansatz wurde 1 ml kompetente Hefezellen gegeben und erneut gut gemischt, dann wurden 6 ml PEG/LiAc-Lösung zugefügt und 10 Sekunden mit maximaler Stärke gevortext. Es folgte eine Inkubation bei 30°C bei 200 rpm für 30 Minuten, bevor 700 µl DMSO zugefügt wurden und vorsichtig gemischt wurde. Der Ansatz wurde nun für 15 Minuten bei 42°C im Wasserbad inkubiert, 2 Minuten auf Eis gestellt und anschließend 5 Minuten bei 1000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 ml SC-His resuspendiert. Verteilt auf 2 50 ml Falcons wurden die Zellen 1 Stunde bei 30°C und 200 rpm inkubiert, wie zuvor zentrifugiert und das Pellet in 7 ml TE aufgenommen. 10 µl der gut resuspendierten Zellen

wurden in 1 ml TE gegeben und 200  $\mu$ l hiervon zur Kontrolle der Transformations-effizienz auf SC-Trp-Medium ausplattiert. Je 500  $\mu$ l des Hauptansatzes wurden auf SC-His-Leu-Trp-Medium in 150 mm Petrischalen ausplattiert, welches 5 mM 3-AT enthielt.

## **2.3 Kultur und Gewebekultur von *Craterostigma plantagineum***

### **2.3.1 Haltung, Ernte und Austrocknung von *Craterostigma plantagineum***

#### **Haltung von *Craterostigma plantagineum***

*Craterostigma plantagineum* wurde in einem Hydrokultursystem (Lecato fein, Hydro GmbH Köln) in Conviron Klimakammern bei ca 60% relativer Luftfeuchte, 14 h Beleuchtung mit 60.000 lux und einer Tag/Nachttemperatur von 24/20°C kultiviert [5].

#### **Ernte und Austrocknung von *Craterostigma plantagineum***

Zur Untersuchung von Blättern und Wurzeln wurden gesunde Pflanzen ohne nekrotische Blattränder verwendet. Blätter und Wurzeln wurden mit einer Rasierklinge abgetrennt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zu Austrocknungsbehandlungen wurden ebenfalls nur gesunde Pflanzen ohne Nekrosen verwendet. Die Pflanzen wurden dabei samt Wurzeln aus dem Hydrokultursystem gezogen und ohne Wasser in der Conviron Klimakammer gehalten.

### **2.3.2 Gewebekultur von *Craterostigma plantagineum***

#### **Gewebekulturmedium für *Craterostigma plantagineum***

##### **Stammlösungen für MSAR-Medium**

- Makroelemente-Stammlösung: 20 g/l  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 40 g/l  $\text{KNO}_3$ , 6.4 g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.8 g/l  $\text{K}_2\text{HPO}_4$
- Mikroelemente-Stammlösung: 6.2 g/l  $\text{H}_3\text{BO}_4$ , 16.8 g/l  $\text{MnSO}_4$ , 8.6 g/l  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 250 mg/l  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 26 mg/l  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 26 mg/l  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

- FeEDTA-Stammlösung: 7.46 g/l Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O, 5.56 g/l FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O
- CaCl<sub>2</sub>-Stammlösung: 75 g/l CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O
- KI-Stammlösung: 375 mg/l KI
- MSAR-Vitamin-Stammlösung: 50 g/l Myoinositol, 2.5 g/l Thiamin, 0.5 g/l Nicotinsäure, 0.5 g/l Pyridoxin

### **Zusammensetzung MSAR-Medium**

50 ml/l Makroelemente-Stammlösung, 1 ml/l Mikroelemente-Stammlösung, 6.6 ml/l FeEDTA-Stammlösung, 5.8 ml/l CaCl<sub>2</sub>-Stammlösung, 2.2 ml/l KI-Stammlösung, 30 g/l Saccharose, 250 mg/l Antioxidationsmischung (Ascorbat und Citrat im Verhältnis 3:2); pH 5.8 mit 1 M KOH einstellen; für feste Medien zusätzlich 4 g/l Gelrite; nach dem Autoklavieren und Abkühlung auf 50°C wurden 1 ml/l Vitaminstammlösung sowie 2 mg/l IAA, 0.5 mg/l 2,4-D, 0.2 mg/l Kinetin und 0.2 mg/l 9iP zugesetzt.

### **Induktion von Kallus von *Craterostigma plantagineum***

Zur Induktion von Kallus von *Craterostigma plantagineum* wurden sehr junge Blätter vorsichtig mit sterilem Schmirgelpapier (400er Körnung) behandelt und auf festes MSAR-Medium gegeben. Die Kultur erfolgte unter kontrollierten Licht- und Temperaturverhältnissen (16 h Lichtperiode, 200  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , 24°C). Die Kalli, die sich wenige Wochen nach der Induktion zeigen, wurden vom Muttergewebe entfernt und alle drei Wochen auf frischem Medium subkultiviert [41].

### **ABA-Behandlung von *Craterostigma plantagineum* Kallus**

Zur Untersuchung ABA induzierter Gene wurde Kallus von *Craterostigma plantagineum* auf festem MSAR-Medium kultiviert, welches 5 mg/l ABA (gemischte Isomere, Sigma) enthielt [5].

## 2.4 Haltung, Protoplastierung und Transfektion von *Nicotiana tabacum*

### 2.4.1 Haltung von *Nicotiana tabacum*

Tabakpflanzen der Varietät Petit Havana SR1 wurden auf hormonfreiem MS-Medium (Fertigsalz der Firma Duchefa, [84]) in steriler Kultur bei 24°C gehalten.

Nach Aufzucht der Pflanzen aus Samen und Ernte von Blättern zur Protoplastierung wurden die verbleibenden Sprosse höchstens einmal zur vegetativen Vermehrung und erneuten Ernte verwendet.

### 2.4.2 Isolierung von Protoplasten aus *Nicotiana tabacum*

- K3-Medium: MS-Medium mit 0.4 M Saccharose auf 600 mOsm eingestellt, 100 mg/l Inosit, 250 mg/l Xylose, 1 ml/l Vitaminlösung (s. MSAR-Medium), 0.2 mg/l 2.4-D, 1 mg/l NAA sowie 0.2 mg/l Kinetin, pH 5.8
- W5-Medium: 154 mM NaCl, 125 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM KCl, 5 mM Glucose, pH 5.8
- MaMg-Lösung: 0.45 Mannitol, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 % [w/v] MES-KOH, pH 5.8

Zur Isolierung von Protoplasten aus *Nicotiana tabacum* wurden 5 g Blattmaterial in 100 ml K3-Medium mit 0.1 % Cellulase (Sigma) und 0.4 % Macerozym R10 (Serva) bei 28°C über Nacht im Dunkeln inkubiert. Durch langsames Schwenken wurden die Protoplasten aus dem Gewebe gelöst und durch Filtration durch ein 100 µm Kunststoffsieb von Geweberesten getrennt. Eine Zentrifugation von fünf Minuten bei 100 g separierte die floatierenden Protoplasten von der pelletierenden Debris. Medium und Gewebereste wurden mit einer peristaltischen Pumpe abgesaugt und die Protoplasten mit W5-Medium durch eine zweiminütige Zentrifugation bei 50 g pelletiert. Anschließend wurden die Protoplasten in MaMg-Lösung resuspendiert und auf eine Dichte von  $3 \times 10^6$  Zellen pro ml eingestellt.

### 2.4.3 Transfektion von Tabak-Protoplasten

- PEG-Lösung: 25 % [w/v] PEG-1500, 450 mM Mannitol, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM HEPES, pH 6

330  $\mu$ l Protoplasten in MaMg-Lösung wurden zu je 5  $\mu$ l Plasmid-DNA (1  $\mu$ g/ $\mu$ l) und 5  $\mu$ l Lachsspermien-DNA (10  $\mu$ g/ $\mu$ l) gegeben, der Ansatz wurde gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Anschließend wurden 600  $\mu$ l PEG-Lösung langsam zugegeben und vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde der Transfektionsansatz mit K3-Medium auf 6 ml gebracht, vorsichtig gemischt und anschließend 4 (Transfektion mit GFP-Fusionen, Abschnitt 3.3.3) bzw. 16-20 Stunden (GUS-Fusionen, Abschnitt 3.3.6) bei 28°C im Dunkeln inkubiert.

## 2.5 Biochemische Methoden

### 2.5.1 Isolierung von Kernproteinen aus *Craterostigma plantagineum*

- Extraktionspuffer: 10 mM HEPES, pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM 2-methyl-2,4-pentandiol, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0.5 mM PMSF
- Lysispuffer: 100 mM KCl, 15 mM HEPES, pH 7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 3.5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 100  $\mu$ M PMSF
- 2 $\times$ Bindungspuffer: 15 mM HEPES, 8 mM Tris pH 7.5, 120 mM KCl, 140  $\mu$ M EDTA, 14% Glycerol, 3.5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 100  $\mu$ M PMSF

Die Extraktion von Kernproteinen erfolgte in Anlehnung an ein Protokoll von Nelson et al. [85]. Alle Schritte der Proteinisolierung wurden auf Eis oder im Kühlraum durchgeführt, Puffer, Zentrifugen, Rotoren und sonstige Geräte auf 4°C vorgekühlt. Zur Präparation wurden unter flüssigem Stickstoff zu einem feinem Pulver zermörserte Calli, Blätter und Wurzeln verwendet. 10-15 g Pflanzenmaterial wurden in 125 ml Extraktionspuffer aufgetaut, der in einem mit Rasierklingen bestückten Waring-Blender vorgelegt worden war. Es wurde 2 mal eine Sekunde und einmal sieben Sekunden homogenisiert und der Extrakt anschließend durch Nylongaze mit 300 und 50  $\mu$ m Maschenweite filtriert. Das Filtrat wurde mit 1200g

fünf Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 3 ml Lysispuffer resuspendiert. Das Lysat wurde in ein 14 ml Schraubdeckelfalcon überführt, auf 4 ml mit Lysispuffer gebracht und mit 0.4 ml 4 M Ammoniumsulfat versetzt. Der Ansatz wurde 30 Minuten im Kühlraum auf dem Roller gemischt, dann für fünf Minuten bei 5000g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und für eine Stunde bei 200.000g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in ein 14 ml Schnappdeckelfalcon gegeben, das Volumen bestimmt und 0.3 g mit dem Mörser fein gemahlenes Ammoniumsulfat per ml in drei Portionen zugegeben, was 51% Sättigung entspricht oder 2 M Endkonzentration. Der Ansatz wurde wiederum 30 Minuten im Kühlraum auf dem Roller gemischt und anschließend 10 Minuten bei 15.000g zentrifugiert. Das Präzipitat wurde in 400  $\mu$ l 2 $\times$ Bindungspuffer gelöst und gegen denselben Puffer über Nacht dialysiert. Die Kernproteine wurden aliquotiert und bei -70°C gelagert.

### 2.5.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen in detergentenfreien Lösungen erfolgte nach Bradford [12] mit dem BioRad Proteinassay (BioRad, München). Dabei dienten BSA-Verdünnungsreihen zur Kalibrierung der Messung.

### 2.5.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Proteine wurden durch denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) in einem diskontinuierlichem Gelsystem nach Lämmli [68] aufgetrennt. Die Proteinextrakte wurden vor der Elektrophorese mit einem Volumen Lämmli-SDS-Probenpuffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 10 % [v/v] Glycerin, 2 % [w/v] SDS, 5 % [v/v]  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0.1 % [w/v] Bromphenolblau) versetzt und 3 Minuten bei 95°C inkubiert. Es wurden 1.5 mm dicke Gele eingesetzt mit einem 4% Sammelgel (4% [w/v] Acrylamid, 0.1% [w/v] N,N'-Methylenbisacrylamid, 125 mM Tris pH 6.8, 0.1 [w/v] SDS, 0.05% [w/v] APS, 0.1% [v/v] TEMED) und einem 12% Trenngel (12% [w/v] Acrylamid, 0.3% [w/v] N,N'-Methylenbisacrylamid, 375 mM Tris pH 8.8, 0.1 [w/v] SDS, 0.1% [w/v] APS, 0.04% [v/v] TEMED). Als Elektrophoreselaufpuffer diente 0.3% [w/v] Tris pH 8.3, 1.4% [w/v] Glycin, 0.1% [w/v] SDS. An die Gele wurden konstant 25 mA angelegt bei einer oberen Spannungsbegrenzung von 150V.

### 2.5.4 Färbung von Proteinen

- Färbelösung: 0.2% [w/v] Coomassie Brilliant Blau, 7% [v/v] Essigsäure, 50% [v/v] Methanol
- Entfärbelösung: 7% [v/v] Essigsäure, 50% [v/v] Methanol

Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine wurden mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt. Dazu wurden die Gele bei Raumtemperatur 1-2 Stunden in Färbelösung geschwenkt. Danach wurden die Gele solange in Entfärbelösung geschwenkt, bis sich die Proteinbanden genügend deutlich vom Hintergrund abhoben. Die gefärbten Gele wurden auf zwei Lagen Whatman Filterpapier unter einer Einmachfolie auf einem Geltdrockner getrocknet.

### 2.5.5 Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrocellulose

Mit einer Semidry-Blotting-Apparatur (Sartorius, Göttingen) wurden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (Protran Nitrocellulose, Schleicher & Schuell, Dassel) nach dem im Pharmacia Sonderdruck RE-72 veröffentlichten Protokoll von transferiert [89]. Als Blotpuffer diente 40 mM Glycin, 50 mM Tris pH 7.5, 0.04% [w/v] SDS, 20% [v/v] Methanol. Bei 2 mA/cm<sup>2</sup> wurde eine Stunde geblottet. Gut erkennbare Banden eines "prestained" Markers auf der Blotmembran sind ein Indiz für guten Proteintransfer. Weiterhin können Proteine auf der Membran durch die reversible Anfärbung mit Ponceau-Rot sichtbar gemacht werden. Für diese Transferkontrolle wurde der Blot eine Minute in Ponceau-Rot-Lösung (0.5% Ponceau-S-Rot in 1% Essigsäure) gefärbt und anschließend in Wasser gelegt, bis sich einzelne Banden zeigten. Mit 0.1 M NaOH ließ sich der Blot wieder entfärben und für Immunreaktionen verwenden [96].

### 2.5.6 Immunodetektion von Proteinen

- TBS: 50 mM Tris-HCl pH 7.5 bzw 9.6, 150 mM NaCl
- Blockpuffer: TBS pH 9.6 mit 5% [w/v] Magermilchpulver
- Waschpuffer I: TBS pH 9.6 mit 0.5% [v/v] Nonidet-P40
- Waschpuffer II: TBS pH 7.5 mit 0.5% [v/v] Nonidet-P40



Mit spezifischen Antiseren wurden auf Nitrocellulose transferierte Proteine immunologisch nachgewiesen. Dazu wurde die Membran mindestens 2 Stunden in Blockpuffer geschwenkt, um freie Membranflächen abzusättigen. Anschließend wurde die Membran eine Stunde mit dem primären Antikörper in einer Verdünnung von  $10^{-3}$  in TBS pH 9.6 inkubiert bei Raumtemperatur unter Schwenken. Die Membran wurde dreimal 10 Minuten bei Raumtemperatur in Waschpuffer I geschwenkt, dann folgte eine 45 minütige Inkubation mit dem sekundären Antikörper, einem Peroxidase-gekoppelten Anti-Kaninchenimmunoglobulin G-Antikörper, in einer Konzentration von  $10^{-4}$ . Es folgten zwei zehnmünütige Waschschrirte mit Waschpuffer II und zwei zehnmünütige Waschschrirte mit TBS pH 7.5, dann wurden Proteine mit der "Enhanced Chemoluminiszenz-Methode (ECL)" detektiert. Es wurde das "ECL-Western blotting system" der Firma Amersham-Buchler nach Vorschrift des Herstellers eingesetzt. Röntgenfilme (Kodak-X-Omat AR5) wurden dem Luminiszenzsignal für 10 Sekunden bis 5 Minuten exponiert.

## 2.6 Molekularbiologische Methoden

### 2.6.1 Isolierung von Nukleinsäuren

#### Isolierung von DNA aus $\lambda$ -Bakteriophagen

- $\lambda$ -Verdünnung: 10 mM  $MgSO_4$ , 10 mM Tris·HCl, pH 7.5
- Phagenpräzipitationslösung: 20 % [w/v] PEG 8000, 2 M NaCl in  $\lambda$ -Verdünnung

DNA des Bakteriophagen  $\lambda$  wurde aus Plattenlysaten nach Sambrook et al. [98] isoliert. Dazu wurde ein einzelner Bakteriophagen-Plaue auf einer NZ-Topagaroseplatte ausgestochen und in 1 ml SM-Puffer gegeben. Nach Zugabe eines Tropfens Chloroform wurde der Ansatz für mindestens 2 Stunden bei 4 °C gelagert, um die Phagenpartikel aus der Topagarose diffundieren zu lassen. Parallel wurden Bakterien des Stammes XL1-BlueMRF' in NZ-Medium bis zu einer  $OD_{600}$  von 0.5 herangezogen, pelletiert und anschließend in 10 mM  $MgSO_4$  aufgenommen. 100  $\mu$ l der Phagensuspension wurden zu 100  $\mu$ l der Bakterien in  $MgSO_4$  gegeben und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von ca 3 ml 48°C warmer NZ-Topagarose wurde die Bakteriensuspension auf frisch hergestellte 90 mm NZ-Agarose-Platten gegossen und nach Erstarrung der NZ-Topagarose invertiert über Nacht bei 37°C inkubiert.

Mit 3 ml  $\lambda$ -Verdünnung wurden die Phagenpartikel durch 2 stündiges Schwenken bei Raumtemperatur aus der Topagarose eluiert und durch eine zehnminütige Zentrifugation bei 4000g und 4°C von Bakteriendebris gereinigt. Der Überstand wurde in einem Polypropylen-Zentrifugenröhrchen mit 1  $\mu$ l RNaseA (1 mg/ml) und DNaseI (1 mg/ml) versetzt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 3 ml Phagenpräzipitationslösung zugefügt, durch Vortexen gemischt und eine Stunde in Eiswasser inkubiert. Die präzipitierten Phagen wurden durch eine zehnminütige Zentrifugation bei 10000g und 4°C gewonnen; der Überstand wurde durch invertierte Lagerung der Zentrifugenröhrchen vollständig entfernt.

Die Phagenpartikel wurden in 0.5 ml TE resuspendiert, mit 5  $\mu$ l 10 % SDS versetzt und 5 Minuten bei 68°C inkubiert. Nach Zugabe von 10  $\mu$ l 5 M NaCl wurde die Phagen-DNA einmal mit Phenol-Chloroform und einmal mit Chloroform gereinigt. Die wässrige Phase wurde mit 0.5 ml eiskaltem Isopropanol versetzt, der Ansatz gemischt und eine Stunde bei -70°C gelagert. Die DNA wurde durch Zentrifugation bei 13000g für 15 Minuten bei 0°C pelletiert, mit 70 % Ethanol gewaschen, erneut kurz zentrifugiert und anschließend getrocknet. Die getrocknete DNA wurde zuletzt in 50  $\mu$ l TE resuspendiert.

### **Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli***

#### *Plasmidpräparation im kleinen Maßstab ("Minipräp")*

- TELT-Puffer: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 62.5 mM EDTA, 2.5 M LiCl, 0.4% [v/v] Triton-X-100

Einzelne Kolonien wurden über Nacht bei 37°C und 200rpm in 3 ml TB-Medium herangezogen. Je ca 1.4 ml der sehr dichten Kulturen wurden am nächsten Morgen in ein 1.5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben und 3 Minuten bei 14.000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Pellet in 200  $\mu$ l TELT-Puffer resuspendiert. Versetzt mit 20  $\mu$ l Lysozymlösung (10 mg Lysozym pro ml TE-Puffer) wurden die Ansätze 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie für genau 60 Sekunden in kochendes Wasser gestellt wurden. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei Raumtemperatur und 14.000rpm wurde das schleimige Pellet mit einem sterilen Zahnstocher entfernt und 100  $\mu$ l -20°C kalter Isopropanol zum Überstand gegeben. Das Pellet, das sich nach zehnminütiger Zentrifugation bei 4°C und 14.000rpm bildete, wurde in 100  $\mu$ l RNase-Lösung (1  $\mu$ l DNase-freie RNase-Stammlösung [10 mg/ml] pro ml TE-Puffer) resuspendiert und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Es schloß sich eine Chloroform-Phenol-Extraktion

(Chloroform:Phenol:Isoamylalkohol 24:25:1) an, bevor die Plasmid-DNA durch Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  5 M NaCl und 250  $\mu\text{l}$   $-20^{\circ}\text{C}$  kaltem Ethanol gefällt und durch eine zehnmünütige Zentrifugation bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 14.000 rpm pelletiert wurde. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in  $\text{H}_2\text{O}$  resuspendiert.

**Isolierung von Plasmid-DNA im mittleren Maßstab ("Midipräp")** Die Isolierung von Plasmid-DNA im mittleren Maßstab erfolgte durch alkalische Lyse der Zellen nach der Methode von Birnboim und Doly [10].

### **Isolierung von Hefe-DNA**

- Hefe-DNA Extraktionspuffer: 10 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % [w/v] SDS, 2 % [v/v] Triton-X-100

Hefe-DNA wurde nach Kretsch (unveröffentlicht) isoliert. Dazu wurden 1.5 ml einer dichtgewachsenen Hefekultur in einem Eppendorfgefäß zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 100  $\mu\text{l}$  Hefe-DNA Extraktionspuffer resuspendiert. Anschließend wurde eine Spatelspitze Glaskugeln zugefügt und 3 Minuten gevortext. Nach einer Zentrifugation mit 14000 g für 5 Minuten wurde der Überstand abgenommen und der Rest verworfen. Die DNA wurde mit Ethanol präzipitiert, gewaschen, in TE-Puffer mit RNase I eine halbe Stunde bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert und anschließend je zweimal phenolisiert und Chloroform-behandelt. Die DNA wurde wiederum mit Ethanol gefällt, gewaschen, getrocknet und in TE resuspendiert.

### **Isolierung von genomischer DNA aus *Craterostigma plantagineum***

- Lysispuffer: 100 mM Tris-HCl pH 9.5, 1.35 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% [w/v] CTAB, 1% [w/v] PEG6000
- Puffer QBT, QC, QF sowie Qiagen-Tip 20 sind Produkte der Firma Qiagen, Hilden

Pro DNA-Extraktionsansatz wurden 0.5 g unter flüssigem Stickstoff fein gemörseretes Pflanzenmaterial (Blätter, Callus) in ein 14 ml Falcon gegeben und mit 2.5 ml  $74^{\circ}\text{C}$  warmen Lysispuffer versetzt. Nach Zugabe von 6.25  $\mu\text{l}$   $\beta$ -Mercaptoethanol wurde gut gevortext und 20 Minuten bei  $74^{\circ}\text{C}$  unter gelegentlichem Mischen inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt und nach

Zugabe von 1 Volumen eines 25:24:1-Gemisches aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol 10 Minuten bei 4°C mit 5000g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Falcon überführt und mit einem Volumen Isopropanol wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Nach einer Zentrifugation von 20 Minuten bei 4°C mit 5000 g wurde das Pellet in 0.5 ml 1 M NaCl bei 62°C inkubiert, bis es sich löste. Der Ansatz wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, bevor 24 µl DNase-freie RNase-Stammlösung (10 mg/ml) zugesetzt wurden und 30 Minuten bei 37°C inkubiert wurde. Gemischt mit 0.2 ml H<sub>2</sub>O und 0.4 ml Puffer QBT wurde die DNA-Präparation über eine mit QBT-Puffer äquilibrierte Qiagen-Säule ("Qiagen-Tip 20") gegeben und mit 2 mal 1 ml Waschpuffer QC gewaschen. Die DNA wurde mit 1 ml Elutionspuffer QF eluiert und mit Isopropanol gefällt. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 15 µl Tris-HCl, pH 8.5 resuspendiert. Die so gewonnene genomische DNA wurde bei 4°C gelagert.

### **Isolierung von polyA<sup>+</sup>-RNA aus *Craterostigma plantagineum***

Die Isolierung von polyA<sup>+</sup>-RNA erfolgte nach Bartels und Thompson [6].

- Puffer I: 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 9, 10 mM EDTA, 2% [w/v] SDS, 2 mg/ml Proteinase K
- Puffer II: 400 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.2% [w/v] SDS
- Puffer III: 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl
- Puffer IV: 10 mM Tris-HCl pH 7.5

20 g unter flüssigem Stickstoff fein gemörserteres Pflanzenmaterial wurden mit 100 ml Puffer I versetzt, kräftig geschüttelt und 15 Minuten bei 37°C und 50 rpm gemischt. Der Ansatz wurde zweimal mit dem gleichen Volumen Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert und einmal mit dem doppelten Volumen Chloroform:Isoamylalkohol (24:1). Die wässrige Phase wurde mit 1/10 Volumen 4 M NaCl versetzt und 20 Minuten bei 4°C und 15.000g zentrifugiert. 0.2 g Oligo-(dT)-Cellulose wurden zu dem Überstand gegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur und 50 rpm inkubiert. Die Oligo-(dT)-Cellulose wurde mit 2000g für 1 Minute abzentrifugiert, der Überstand verworfen. Je dreimal wurde die Oligo-(dT)-Cellulose mit den Puffern II und III gewaschen, bevor sie in eine 10 ml Säule transferiert wurde. Die Oligo-(dT)-Cellulose wurde mit Puffer III gewaschen, bis

die  $OD_{260}$  0 erreichte, dann wurde die polyA<sup>+</sup>-RNA mit 5 ml 55°C warmen Puffer IV eluiert. Das Eluat wurde mit 5 ml Puffer II und 0.2 g Oligo-(dT)-Cellulose versetzt und wie zuvor inkubiert und gewaschen. Nach Transfer auf eine 10 ml Säule wurde die polyA<sup>+</sup>-RNA in fünf Fraktionen von je 500  $\mu$ l 55°C warmen Puffer IV eluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden 5 Minuten bei 10.000 rpm und 4°C zentrifugiert, um Verunreinigungen durch die Cellulosematrix zu beseitigen, dann wurde die polyA<sup>+</sup>-RNA durch Zugabe von 1/10 Volumen 4 M NaCl und 2 Volumen Ethanol über Nacht bei -20°C präzipitiert. Nach einer Zentrifugation von 20 Minuten bei 4°C und 14.000 rpm wurde die RNA mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in H<sub>2</sub>O resuspendiert. Konzentration und Reinheit der RNA-Präparation wurden durch Bestimmung der  $OD_{260}$  und  $OD_{280}$  spektrophotometrisch bestimmt. Die Lagerung der polyA<sup>+</sup>-RNA erfolgte bei -70°C.

### 2.6.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Am Spektralphotometer wurde die optische Dichte von Nukleinsäurelösungen bei 260, 280 und 350 nm bestimmt. Für doppelsträngige DNA wird angenommen, daß 1.0  $A_{260}$  50  $\mu$ g/ml DNA entsprechen; für RNA entspricht 1.0  $A_{260}$  40  $\mu$ g/ml RNA. Für DNA sollte der Quotient der  $OD_{260}/OD_{280}$  zwischen 1.8 und 2.0 (RNA: zwischen 1.6 und 1.8) liegen, während die  $OD_{350}$  möglichst nahe bei 0 liegen sollte [30].

### 2.6.3 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

#### Auftrennung von DNA und RNA in nativen Agarosegelen

- Ladepuffer: 1% [w/v] Bromphenolblau, 1% [w/v] Xylenxylol, 50% [v/v] Glycerol, 50% [v/v] 10×TAE
- 10×TAE: 400 mM Tris-Acetat pH 8.2, 200 mM Natriumacetat, 20 mM EDTA

Native Agarosegele wurden zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA und Gesamt-RNA verwendet. Der Zusatz von Agarose richtete sich bei DNA nach der Größe der aufzutrennenden Fragmente und lag zwischen 0.7 und 1.5% [w/v]; zur Analyse von Gesamt-RNA wurden Gele verwendet, die 1% [w/v] Agarose enthielten. Die Agarose wurde durch Aufkochen in 1×TAE-Puffer gelöst und auf

ca 60°C abgekühlt, bevor sie ins Gelbett gegossen wurde. Die Auftrennung erfolgte mit 1xTAE als Laufpuffer. Die Nukleinsäureproben wurden mit 1/10 Volumen Ladebuffer versetzt, der das Auftragen erleichtert und eine Abschätzung des Gellaufs erlaubt. Die Elektrophorese erfolgte bei konstant 100 mA Stromstärke. Anschließend wurden die Nukleinsäuren 15 Minuten in 0.5 µg/ml Ethidiumbromid in 1xTAE inkubiert, 5 Minuten in 1xTAE entfärbt und auf einem UV-Transilluminator fotografiert. Anhand der stets mitaufgetragenen DNA-Größenmarker wurde die Länge von Nukleinsäuren abgeschätzt. Mit Hilfe von DNA-Banden, die eine bekannte Menge darstellten, ließen sich andere Banden bezüglich ihrer Quantität abschätzen.

### Southern Blot

- Denaturierungslösung: 1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH
- Neutralisationslösung: 1.5 M NaCl, 1 M Tris-HCl pH 7.5
- 20xSSC: 3 M NaCl, 300 mM Natriumcitrat pH 7
- Southern-Hybridisierungspuffer: 600 mM NaCl, 10 mM PIPES pH 6.8, 1 mM EDTA, 0.1% [w/v] SDS, 10xDenhardt's, 100 µg/ml denaturierte Lachsspermien-DNA
- 100xDenhardt's: 2% [w/v] BSA, 2% [w/v] Ficoll400, 2% [w/v] Polyvinylpyrrolidon360
- Waschpuffer: 2xSSC, 0.1% [w/v] SDS

Die Hybridisierung elektrophoretisch aufgetrennter DNA-Fragmente erfolgte nach Southern [109]. Im Anschluß an die Auftrennung der DNA in einem Agarosegel wurde das Gel 30 Minuten bei 50 rpm in Denaturierungslösung geschwenkt, dann folgte eine 30 minütige Inkubation bei 50 rpm in Neutralisationslösung. Der Kapillartransfer der DNA erfolgte über Nacht mit 10xSSC auf eine Nylonmembran (Hybond N, Amersham), danach wurde die DNA durch UV-Behandlung mit dem "Stratalinker" der Firma Stratagene fixiert. Die Prähybridisierung zur Absättigung freier Membranflächen erfolgte in Southern-Hybridisierungspuffer für 4 Stunden bei 65°C unter leichtem Schütteln. Unter gleichen Bedingungen wurde in einem minimalen Volumen frischen Hybridisierungspuffers die Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden (s. Abschnitt ) über Nacht durchgeführt. Nach

der Hybridisierung wurde die Membran 3 Mal für je 20 Minuten bei 65°C gewaschen, bevor sie in Frischhaltefolie eingeschlagen zur Autoradiographie eines Röntgenfilms (Kodak X-Omat AR5) verwendet wurde. Die Exposition erfolgte bei -70°C. Ein Filter konnte nacheinander mit mehreren Sonden analysiert werden. Dabei war es wichtig, die Membranen nach der Hybridisierung stets feucht zu halten, damit DNA-Sonden durch ca fünfzehnminütiges Waschen in H<sub>2</sub>O bei 80°C entfernt werden konnten.

### Northern Blot

- Northern-Hybridisierungspuffer: 50% [v/v] deionisiertes Formamid, 5×SSC 10 mM PIPES pH 6.8 0.1% [w/v] 1×Denhardt's (s. o.)
- RNA-Ladepuffer: 10% [v/v] 5×MOPS, 17.5% [v/v] 37% Formaldehyd, 50% [v/v] Formamid, 0.1% [w/v] Bromphenolblau
- 5×MOPS: 200 mM MOPS, 50 mM Natriumacetat pH 7 (NaOH), 5 mM EDTA
- Formamid, deionisiert: 100 ml Formamid werden mit 5 g Ionenaustauscher (Analytical Grade Mixed Bed Resin Ag 501-X8 Resin, Biorad, München) eine Stunde gerührt und abschließend die Matrix des Ionenaustauschers abfiltriert.

Zur Unterdrückung von Sekundärstrukturen wurden Gesamt- und polyA<sup>+</sup>-RNA für einen Northern Blot in Agarosegelen mit Formaldehyd (1% [w/v] Agarose, 1×MOPS, 2.2 M Formaldehyd) aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1×MOPS, 2.2 M Formaldehyd. Die RNA-Proben wurden mit 2 Volumen RNA-Ladepuffer gemischt und 5 Minuten bei 65°C inkubiert bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V für 4-5 Stunden. Anschließend wurden die RNAs über Nacht durch Kapillartransfer mit 10×SSC auf eine Nylonmembran (Hybond N, Amersham) übertragen und wie beim Southern-Blot fixiert. Die Prähybridisierung erfolgte für mindestens 4 Stunden bei 65°C unter Schwenken in Northern-Hybridisierungspuffer. Bei 42°C erfolgte die Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde (siehe Abschnitt 2.6.5) in einem minimalen Volumen frischen Northern-Hybridisierungspuffers über Nacht im Schüttelwasserbad. Der hybridisierte Filter wurde gewaschen und exponiert wie beim Southern-Blot beschrieben.

### **Auftrennung von DNA-Protein-Komplexen in nativen Polyacrylamidgelen**

DNA-Protein Interaktionen wurden durch einen "Electrophoretic Mobility Shift Assay" (EMSA) charakterisiert. Dazu wurden Kernproteinextrakte mit radioaktiv markierten Ziel-DNAs inkubiert und anschließend in einem nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Protein-DNA-Komplexe wandern langsamer als freie, ungebundene DNA, was zu retardierten Banden in der Autoradiographie führt. EMSAs wurden mit Kernproteinen aus *Craterostigma plantagineum* (siehe Abschnitt 2.5.1) und mit rekombinanten, in *Escherichia coli* exprimierten Fusionsproteinen durchgeführt.

- 2× Bindungspuffer für Kernproteine und Fusionsproteine: 14% [v/v] Glycerin, 15 mM Hepes pH 7.5 (mit KOH eingestellt), 8 mM Tris-HCl pH 7.5, 120 mM KCl, 140  $\mu$ M EDTA, 7 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 100  $\mu$ M PMSF

Im Standard-Bindungsansatz für Kernproteine wurden 10-20  $\mu$ g Kernprotein-Extrakt mit 2× Bindungspuffer auf 10  $\mu$ l gebracht und in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l mit 10.000 cpm Ziel-DNA und mindestens 1  $\mu$ g pdAdT pro 10  $\mu$ g Kernproteinextrakt 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Standard-Bindungsansatz für Fusionsproteine wurden 1-10  $\mu$ g Fusionsprotein unter den zuvor beschriebenen Bedingungen eingesetzt; allerdings wurden zur Reaktion mit Fusionsproteinen 0.2-1  $\mu$ g pdAdT zur Unterdrückung unspezifischer Wechselwirkungen verwendet. Für Konkurrenzexperimente wurde nicht markierte Ziel-DNA dem Reaktionsansatz bei konstantem Gesamtvolumen zugegeben. An das native Polyacrylamidgel (4% [w/v] Acrylamid, 0.1% [w/v] N,N'-Methylenbisacrylamid, 0.2× TAE, 7% [v/v] Glycerin, 0.06% [w/v] APS, 0.06% [v/v] TEMED) wurde für eine Stunde eine Spannung von 100 V angelegt, bevor die Proben bei anliegender Spannung geladen wurden. Die Auftrennung erfolgte 3 Stunden bei 150 V mit 0.2× TAE als Laufpuffer. Die Gele wurden auf Whatman-Filterpapier eine Stunde bei 60°C unter Vakuum getrocknet und ein Röntgenfilm (Kodak X-Omat AR5) bei -70°C exponiert.

#### **2.6.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

DNA-Fragmente wurden durch Elektroelution an eine DEAE-Ionenaustauscher-Membran (NA 45, Schleicher & Schuell, Dassel) gebunden. Dazu wurde die DEAE-Membran vor Benutzung 10 Minuten in 10 mM EDTA und 5 Minuten in 0.5 M NaOH inkubiert, mehrmals mit sterilem Wasser gewaschen und bei 4°C in sterilem Wasser gelagert. Unmittelbar vor dem zu isolierenden DNA-Fragment



wurde mit einer Rasierklinge ein Schnitt in das Agarosegel gemacht und ein Streifen der aktivierten DEAE-Membran mit einer Pinzette in den Schnitt gebracht. In der Elektrophoresekammer in  $1 \times$  TAE-Laufpuffer wurden 100 mA Strom für 10 Minuten so angelegt, daß die DNA aus dem Gel in Richtung der DEAE-Zellulose eluiert wird. Die DEAE-Membran wurde zur Elution der DNA eine Stunde bei  $65^\circ\text{C}$  in  $400 \mu\text{l}$   $1 \text{ M NaCl}$   $10 \text{ mM Tris-HCl}$   $\text{pH } 8$   $1 \text{ mM EDTA}$  inkubiert, dann wurde kurz zentrifugiert, der Überstand abgenommen und durch Zugabe von 2 Volumen Ethanol wurden die DNAs gefällt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation mit  $14.000 \text{ rpm}$  bei  $4^\circ\text{C}$  für 15 Minuten pelletiert, mit 70% Ethanol gewaschen und in  $\text{H}_2\text{O}$  oder TE aufgenommen.

## 2.6.5 Markierung von Nukleinsäuren mit Radioisotopen

### Random-Primer-Labeling von DNA mit Radioisotopen

Nach dem Random-Primer-Verfahren von Feinberg und Vogelstein [36] wurden DNA-Fragmente unter Verwendung des Radioisotops  $[\alpha^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  markiert. Hitzedenaturierte DNA (50-100 ng) wurde mit  $20 \mu\text{Ci}$   $[\alpha^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  in OLB-Puffer mit Hilfe von 2 U Klenow-Enzym über drei Stunden bei Raumtemperatur markiert. Nicht inkorporierte Nukleotide wurden durch Gelfiltration über eine 1 ml Sephadex-G50-Säule abgetrennt. Die spezifische Aktivität der Sonden wurde mit einem Beckman LS 1701 Szintillationszähler (Beckman Instruments, Fullerton, USA) bestimmt. Vor Verwendung in Southern- oder Northern-Hybridisierungen wurden die Sonden hitzedenaturiert.

### Auffüllung 5'-überhängender DNA-Enden mit Radioisotopen

Für EMSA-Experimente wurden 5'-überhängende Enden der Ziel-DNA mit radioaktiven  $[\alpha^{32}\text{P}]\text{dNTPs}$  aufgefüllt, wobei das eingesetzte radioaktive Nukleotid von der Basensequenz des Überhanges abhängig war. 50-100 ng Ziel-DNA wurden mit  $20 \mu\text{Ci}$  des radioaktiven Isotops mit 2 U Klenow-Enzym 15 Minuten bei Raumtemperatur in  $10 \text{ mM Tris-HCl}$   $\text{pH } 8$   $10 \text{ mM MgCl}_2$   $50 \text{ mM NaCl}$   $1 \text{ mM DTT}$  markiert. Nicht inkorporierte Nukleotide wurde bei Sonden mit mehr als 40 Basen länge durch Gelfiltration über eine 1 ml Sephadex-G50-Säule abgetrennt, bei kürzeren Sonden nach Angaben des Herstellers mit dem "Nucleotide Removal Kit" der Firma Qiagen, Hilden. Die spezifische Aktivität der Sonden wurde wie zuvor beschrieben bestimmt.

### 2.6.6 DNA modifizierende Reaktionen

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen, Dephosphorylierung linearisierter Vektoren, Ligation von DNA-Fragmenten und Phosphorylierungsreaktionen von Oligonukleotiden sowie alle weiteren nicht näher beschriebenen molekularbiologischen Standardmethoden wurden nach Sambrook et al. [98] durchgeführt.

### 2.6.7 Herstellung einer One-Hybrid cDNA-Bibliothek aus mRNAs von *Craterostigma plantagineum* und Durchführung eines Hefe One-Hybrid Versuches

5  $\mu\text{g}$  polyA<sup>+</sup>-RNA (siehe Abschnitt 2.6.1) aus Kallus von *Craterostigma plantagineum*, der 2 Tage mit ABA behandelt worden war (s. Abschnitt ), dienten als Ausgangsmaterial zur Herstellung einer One-Hybrid cDNA-Bibliothek. Die cDNA-Synthese erfolgte abgeleitet nach Gubler und Hoffman [48] mit dem "SuperScript cDNA Synthesis Kit" der Firma Gibco [44]. Nach der Größenselektion wurden die cDNAs gerichtet in die SalI- und NotI-Schnittstellen des TRP-markierten One-Hybrid-Vektors pPC86 [19] kloniert. Der cDNA-Vektor-Ligationsansatz wurde in kompetente Wirtszellen des Stammes DH10B elektroporiert. Transformierte Zellen wurden durch eine Inkubation über Nacht bei 30°C und 150 rpm in selektivem LB-Medium amplifiziert und die Plasmid-DNA wie in Abschnitt 2.6.1 beschrieben extrahiert.

Zur Durchsuchung der amplifizierten Bibliothek in einem Hefe One-Hybrid Versuch wurde in Anlehnung an ein Clontech-Protokoll [23] die Bibliothek in Aliquots von 20  $\mu\text{g}$  wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben in die Histidin-auxotrophe Reporterhefe des Stammes YM954 [122] mit dem LEU-markierten centromeren Plasmid pSK1 [64] transformiert.  $6 \times 10^4$  transformierte Zellen wurden pro 15 cm Petrischalen auf SC-Medium ohne Histidin, Leucin und Tryptophan mit 5 mM 3-AT ausplattiert und sechs Tage bei 30°C inkubiert.

### 2.6.8 DNA-Sequenzierung und Sequenzdatenanalysen

DNA-Fragmente wurden mit automatischen DNA-Sequenzierern (model 377, Applied Biosystems) durch die Sequenziergruppe des Max-Planck-Instituts für Züchtungsforschung (ADIS) sequenziert.

Nukleinsäure- und Proteinsequenzdaten wurden mit den Programmen *assemble*, *bestfit*, *gap*, *map*, *pileup*, *pretty*, *seqedit*, *stringsearch* und *translate* aus dem Wisconsin Packet Version 9.1 der Genetics Computer Group (GCG, Madison, Wisconsin, USA) unter UNIX durchgeführt.

Unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> wurden Sequenzvergleiche mit Protein- und Nukleinsäuredatenbanken [2] im Internet durchgeführt.

Unter <http://www.dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/multialign/multi-align.html> wurden Sequenz-Alignments (Gegenüberstellungen) errechnet.

Mit Hilfe von [http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) wurden diese Sequenz-Gegenüberstellungen grafisch aufbereitet.

### 2.6.9 Aufreinigung eines in *Escherichia coli* exprimierten rekombinanten GST-Fusionsproteins

- Lysispuffer: 50 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 150  $\mu$ M PMSF
- 2 $\times$ PBS: 275 mM NaCl, 5 mM KCl, 16 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 3.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.4
- PBS-EDTA: PBS mit 5mM EDTA
- PBS-EDTA-PMSF: PBS mit 5 mM EDTA und 150  $\mu$ M PMSF
- Glutathion-Puffer: 50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM reduziertes Glutathion

Rekombinantes GST-Fusionsprotein für EMSA-Analysen (siehe Abschnitt 2.6.3) wurde im Wirtstamm BL21 (siehe Abschnitt 2.1.1) exprimiert. Dazu wurde das zu untersuchende cDNA-Fragment des Klonen R18 in frame mit der Glutathion-S-Transferase (GST) in die SallI- und NotI-Schnittstellen des Vektors pGEX4T-2 [89] kloniert und das entstandene GST-cDNA-Fusionsplasmid in den Bakterienstamm BL21 transformiert. Eine Übernachtskultur transformierter Zellen wurde in 3 ml LB-Amp bei 37°C und 200 rpm herangezogen. Mit 1 ml dieser Vor- kultur wurden 100 ml LB-Amp inokuliert und bei 37°C und 200 rpm inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0.5 erreicht worden war. Die Induktion des Fusionsproteins erfolgte durch Zugabe von IPTG in das Medium zu einer Endkonzentration von 1 mM. Nach einer Inkubation von 3 Stunden bei 30°C und 200 rpm wurden die Zellen durch eine fünfminütige Zentrifugation bei Raumtemperatur mit 1500

g geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Induktion des Fusionsproteins wurde mit Coomassie-gefärbten SDS-Gelen (siehe Abschnitt 2.5.4) und durch Immunodetektion mit einem gegen GST gerichteten Antikörper (siehe Abschnitt 2.5.6) überprüft. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis oder bei 4°C im Kühlraum mit eisgekühlten Puffern und auf 4°C gekühlten Geräten durchgeführt. Die pelletierten Zellen wurden in 3 ml Lysispuffer resuspendiert und auf Eis ca 5 Mal für 10 Sekunden unter Vermeidung von Schaumbildung sonifiziert, bis die Zellsuspension sich gerade etwas klärte. Das Lysat wurde 20 Minuten bei 48.000 g zentrifugiert und der Überstand weiterverwendet. Die Isolierung des Fusionsproteins erfolgte durch eine Affinitätschromatographie über eine Glutathion-Agarose-Säule. Die 1 ml ergebende Menge Glutathion-Agarose (Sigma) wurde über Nacht in einer 10 ml Säule in Wasser gequollen. Nach Ablauf des Wassers wurde die Säule nacheinander mit 5 Bettvolumen PBS, 5 Bettvolumen Glutathion-Puffer und 5 Bettvolumen PBS-EDTA-PMSF bei einer Durchflußrate von 150  $\mu$ l/Minute gewaschen. Über die Säule wurde das durch Zentrifugation geklärte Lysat gegeben und anschließend 5 Bettvolumen PBS-EDTA-PMSF, 5 Bettvolumen PBS-EDTA und zur Elution des GST-Fusionsproteins 5 Bettvolumen Glutathion-Puffer. Das Eluat wurde in einen Dialyseschlauch gegeben und über Nacht gegen 2 $\times$  Bindungspuffer (siehe Abschnitt 2.6.3) dialysiert. Nach der Dialyse wurde das Fusionsprotein mit Hilfe einer Amicon-Ultrafiltrationseinheit (Centricon-50-SR-Concentrator, Amicon, Witten) auf 400  $\mu$ l 2 $\times$  Bindungspuffer konzentriert und in Aliquots von 50  $\mu$ l in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

### **2.6.10 Transiente Expression von rekombinanten GFP-Fusionsproteinen in Tabak-Protoplasten**

Nach Transfektion mit einem GFP-Fusionskonstrukt im Vektor pCK-GFP-S65C [92] wurden die Tabak-Protoplasten in einem Gesamtvolumen von 6 ml in K3-Medium für 4 Stunden bei 28°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde ein Aliquot der flotierenden Protoplasten auf transiente Expression des R18-GFP-Fusionsproteins mit dem Lichtmikroskop untersucht. Die Fluoreszenz grünen (GFP) und roten (Chloroplasten) Lichts wurde fotografisch in Echtfarben festgehalten.

### 2.6.11 Transiente Koexpression eines R18-Fusionsproteins mit einem Promoter-GUS-Konstrukt in Tabak-Protoplasten

- Extraktionspuffer: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM EDTA, 10 mM β-Mercaptoethanol, 0.1 % [v/v] Triton-X-100, pH 7
- Substratlösung: 10 mM 4-Methylumbelliferyl-D-Glucuronid (MUG, Sigma) in Extraktionspuffer
- Stop-Lösung: 0.2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
- ABA-Stammlösung: 100 mM ABA (Sigma, gemischte Isomere) in EtOH

Die Untersuchung der transienten Expression von Promoter-GUS-Konstrukten im Vektor pRT104 [114] erfolgte in Anlehnung an das bei Kleines et al. 1999 beschriebene Vorgehen [65]. Dazu wurden die Tabak-Protoplasten nach Transfektion in einem Gesamtvolumen von 6 ml in K3-Medium für 16-20 Stunden bei 28°C im Dunkeln inkubiert. Inkubationen in Gegenwart von ABA erfolgten nach Zusatz von ABA-Stammlösung an das K3-Medium zu einer Endkonzentration von 100 μM. Anschließend wurden 7 ml W5-Medium zugefügt, vorsichtig gemischt und die Protoplasten durch Zentrifugation für 2 Minuten bei 50 g pelletiert. Der Überstand wurde bis auf 1 ml abgegossen und die Protoplasten in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation bei 2000 rpm für 2 Minuten wurde der verbliebene Überstand abgenommen und die Protoplasten in N<sub>2</sub>liq. schockgefroren. Die weitere Lagerung erfolgte bei -70°C.

In 200 μl Extraktionspuffer wurden die aufgetauten Protoplasten zur Freisetzung ihres Zellinhalts 10 mal auf- und abpipettiert. Der Zellextrakt wurde für 1 Minute bei 5000 rpm zur Abtrennung von Zelltrümmern zentrifugiert und ein Aliquot von 72 μl des Überstandes in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß abgenommen. Das Aliquot wurde mit 8 μl Substratlösung versetzt und bei 37°C inkubiert. Die Proteinkonzentration der GUS-Reaktionsaliquots wurde durch Vergleich mit einer BSA-Eichkurve nach Bradford bestimmt. Nach 30, 60 und 120 Minuten wurden den Reaktionen Aliquots von je 20 μl abgenommen und mit 1 ml Stop-Lösung versetzt. Die Messung der Fluoreszenz (365 nm Anregung, 455 nm Emission) erfolgte an einem Luminiscence Spectrometer LS30 von Perkin-Elmer.

### **2.6.12 Durchsuchung einer genomischen Phagen-DNA-Bank (Pla-quehybridisierung)**

Eine Bank von  $\lambda$ -Phagen mit genomischen DNAs aus *Craterostigma plantagineum*, die von Stratagene [111] hergestellt worden war, wurde mittels Plauehybridisierung nach Phagenklonen durchsucht, die zur eingesetzten Sonde homologe Inserts tragen. Die Kultur der Phagen und des Bakterienstammes XL1-BlueMRF' erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Nach Inkubation der plattierten Phagen über Nacht wurde ein Nitrocellulose-Filter (Schleicher & Schuell, Dassel) eine Minute aufgelegt und mit der Plaue-Seite nach oben anschließend auf mit 10 % SDS getränktem Whatman-Filterpapier für fünf Minuten inkubiert. Es folgten fünf Minuten auf Whatman-Filterpapier getränkt mit Denaturierungslösung, danach zwei je fünfminütige Inkubationen auf Neutralisationslösung (siehe Abschnitt 2.6.3). Die DNAs auf den anschließend in 20×SSC kurz gewaschenen Filtern wurden mit dem "Autocrosslink"-Programm im "Stratalinker" (Stratagene, Heidelberg) mit UV-Licht fixiert. Prähybridisierung und Hybridisierung erfolgten nach dem Protokoll des Southern Blots (siehe Abschnitt 2.6.3).

## **2.7 Chemikalien, Enzyme und sonstige Materialien**

Chemikalien wurden im Reinheitsgrad p.A. von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg), Boehringer (Mannheim), Biomol (Ilvesheim) und Riedel de Haen (Hannover) bezogen.

Nährmedienzusätze stammten von den Firmen Gibco BRL [44] und Difco (Detroit, USA).

Radioisotope wurden von Amersham Buchler (Braunschweig) bezogen.

Die eingesetzten Enzyme stammten, sofern nicht anders angegeben, von Boehringer (Mannheim) und New England Biolabs (Schwalbach).

---

## 3. Ergebnisse

---

### 3.1 Kernproteine aus Wurzeln und Kallus von *Craterostigma plantagineum* binden an das durch zwei AGCCC-Elemente charakterisierte Promoterfragment des LEA-Gens CDeT27-45

Die DNA-Bindungsaktivitäten an das durch zwei AGCCC-Elemente charakterisierte Promotorfragment 3.5 des LEA-Gens CDeT27-45 waren mit Hilfe von DNaseI-footprint Versuchen und Gelretardationsexperimenten anhand von Kernproteinen aus Kallus von *Craterostigma plantagineum* identifiziert worden [85]. Diese Bindungsaktivitäten sind stark ausgeprägt in ABA-behandeltem Kallus und nur schwach in unbehandeltem Kallus.

Um einen Überblick über eine mögliche gewebespezifische Verbreitung der DNA-Bindungsaktivitäten von Kernproteinen an das Promotorfragment 3.5 des LEA-Gens CDeT27-45 zu gewinnen, sollten Kernproteinextrakte aus Wurzeln, Blättern und Kallus in Bezug auf die Interaktion mit der EMSA-Sonde 3.5 (Sequenz siehe Anhang 6.2) untersucht werden. Gleichzeitig sollte getestet werden, ob etwaige Bindungsaktivitäten in Wurzeln oder Blättern durch Austrocknung induziert werden oder konstitutiv vorliegen.

Dazu wurden Kernproteinextrakte aus frischen und 72 Stunden getrockneten Wurzeln und Blättern (siehe Abschnitt 2.3.1) sowie aus unbehandeltem und 2 Tage ABA-behandeltem Kallus (siehe Abschnitt 2.3.2) wie in Abschnitt 2.5.1 beschrieben hergestellt. Als EMSA-Sonde wurde das Promotorfragment 3.5 des LEA-Gens CDeT27-45 eingesetzt, dessen Sequenz in Abschnitt 6.2 angegeben ist. Das

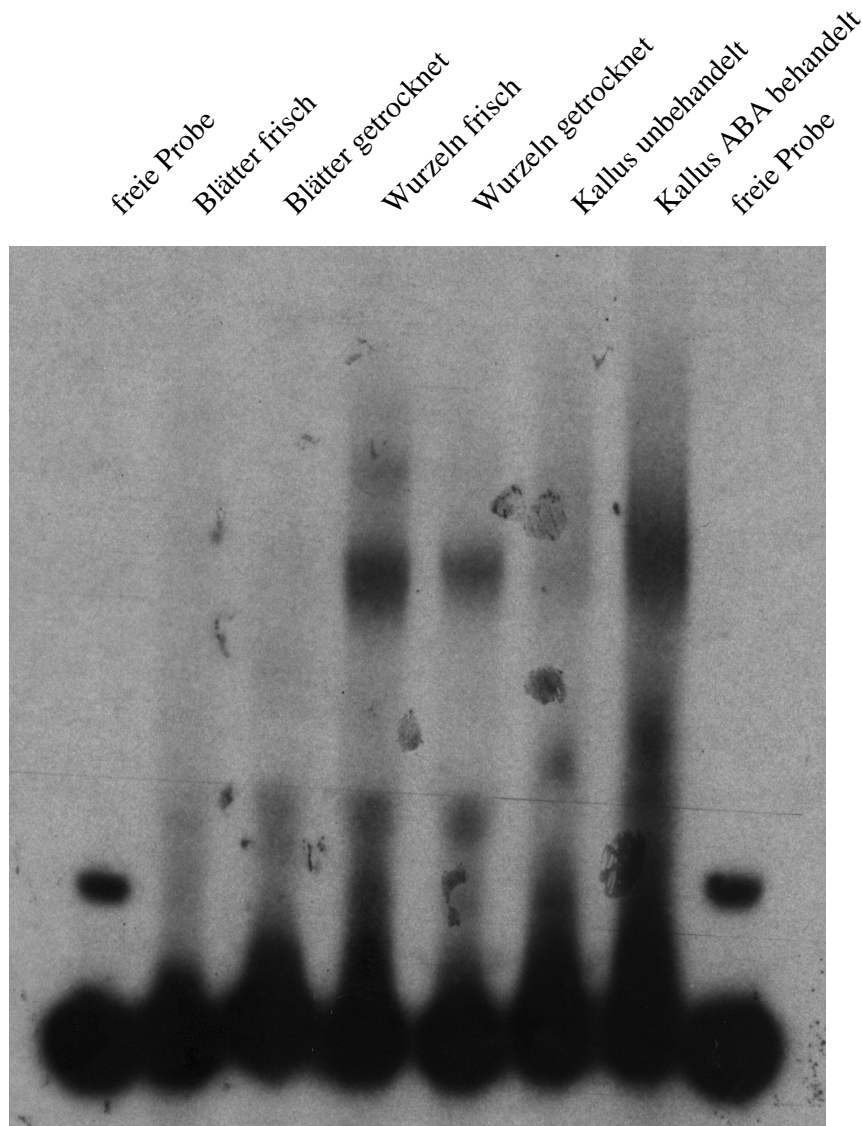


Abbildung 3.1: Untersuchung der gewebespezifischen Verbreitung der Bindungsaktivität von Kernproteinextrakten an das Fragment 3.5 des CDeT27-45 Promoters. Eingesetzt wurden  $17.5 \mu\text{g}$  Kernproteinextrakt aus Wurzeln und Blättern sowie  $10 \mu\text{g}$  aus Kallus-Gewebe. Die Reaktionen erfolgten mit  $10.000 \text{ cpm}$  der EMSA-Sonde 3.5 in Gegenwart von  $2 \mu\text{g}$  pdAdT.



120 Basenpaare umfassende Fragment 3.5 erstreckt sich von den Basen -441 bis -320 des CDeT27-45 Promotors und ist notwendig, aber nicht ausreichend zur ABA vermittelten Expression eines Promotor-GUS-Konstruktes [85]. Es enthält eine im DNaseI-footprint Versuch geschützte Promoterregion (Basen -362 bis -334, siehe Abschnitt 6.2) mit zwei AGCCC-Elementen [18]. Wie in Abschnitt 2.6.5 beschrieben wurde Fragment 3.5 mit [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]dATP an den Enden radioaktiv markiert und 10.000 cpm dieser Sonde wurden mit 17.5  $\mu\text{g}$  (Wurzeln und Blätter) bzw. 10  $\mu\text{g}$  (Kallus) Kernproteinen in Gegenwart von 2  $\mu\text{g}$  pdAdT inkubiert (siehe Abschnitt 2.6.3). Die Auftrennung erfolgte anschließend in einem 3.5%igen nativen Polyacrylamidgel.

Abbildung 3.1 zeigt die Autoradiographie dieses Gels nach der Elektrophorese. Kernproteine aus frischen und getrockneten Wurzeln sowie aus ABA behandeltem Kallus führen zu einem deutlichen Verzögerungssignal der EMSA-Sonde 3.5, während Kernproteine aus unbehandeltem Kallus nur zu einem schwachen, gerade eben sichtbaren Verzögerungssignal führten. Für Kernproteine aus frischen sowie getrockneten Blättern konnte keine Gelverzögerung nachgewiesen werden. Somit ist die von Nelson identifizierte Promotor-Bindungsaktivität vor allem in Wurzeln und in ABA behandeltem Kallus zu finden, aber nicht in Blättern. Die Promotor-bindenden Faktoren sind stärker in Kernproteinextrakten aus ABA behandeltem Kallus vertreten als in Extrakten aus Wurzeln, denn eine geringere Menge Kernproteine aus Kallus (10  $\mu\text{g}$  gegenüber 17.5  $\mu\text{g}$  aus Wurzeln) erzeugt ein stärkeres Gelretardationssignal.

Um Aufschluß über die Spezifität zu erlangen, mit der die Kernproteine an die EMSA-Sonde 3.5 binden, wurden zusätzlich zu Reaktionen, die nur die radioaktiv markierte EMSA-Sonde enthielten, auch Ansätze mit nicht radioaktiv markierter EMSA-Sonde 3.5 als Kompetitor um Bindungsstellen in einem 3.5%igen nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Abbildung 3.2 zeigt die Autoradiographie dieses Geles. Verglichen mit den Reaktionen ohne Kompetitor wird das Verzögerungssignal in Gegenwart eines Überschusses an nicht radioaktiv markierter EMSA-Sonde 3.5 erheblich schwächer, weil nicht markierte Sondenmoleküle markierte Sondenmoleküle an den Bindungsstellen verdrängen. Somit handelt es sich bei den Interaktionen von Kernproteinen aus Wurzeln und Kallus mit der EMSA-Sonde 3.5 um spezifische Bindungen.

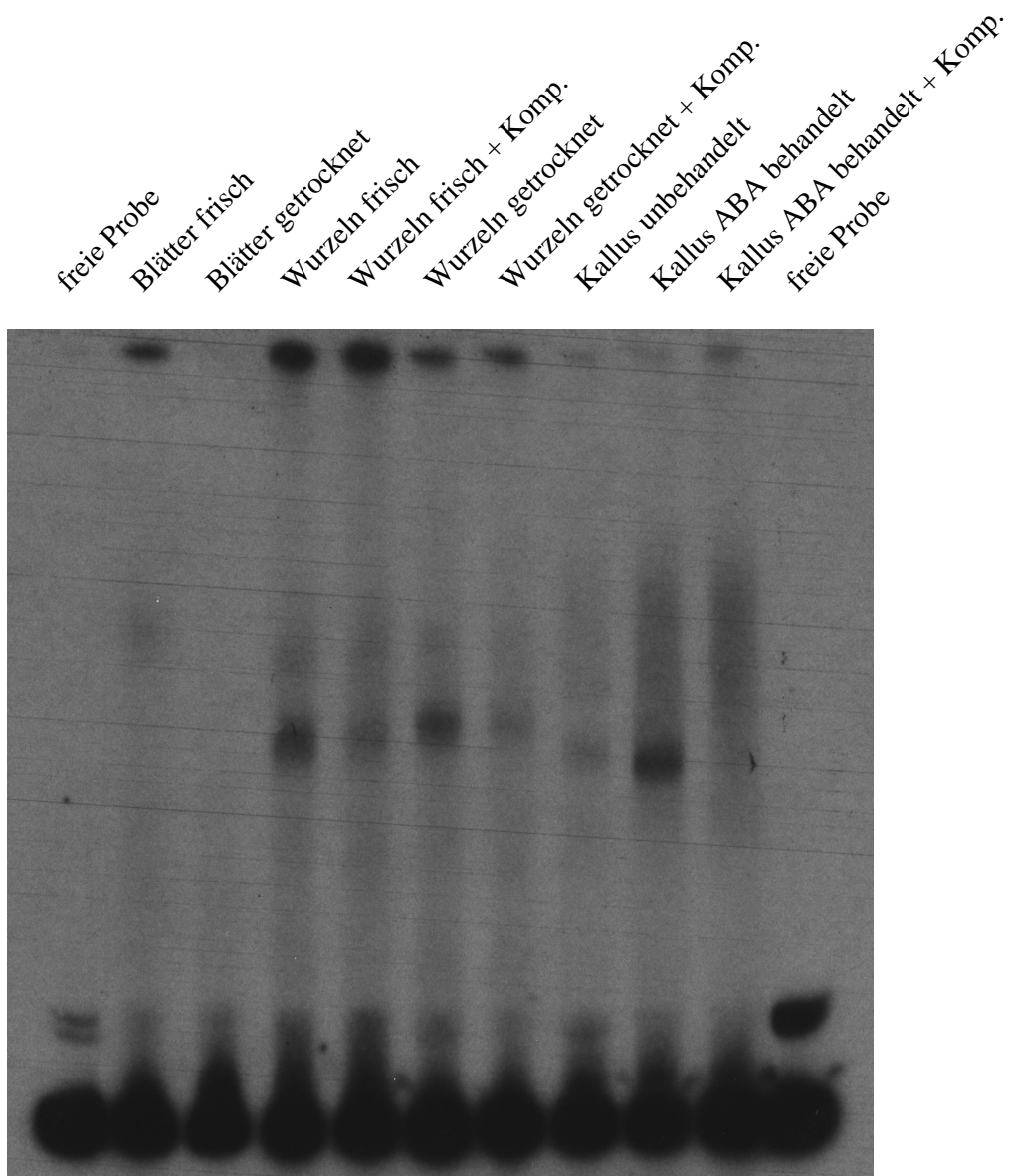


Abbildung 3.2: Untersuchung der Spezifität der Bindung von Kernproteinextrakten aus verschiedenen Geweben an das Fragment 3.5 des CDeT27-47 Promoters. Proteinmengen, pdAdT und EMSA-Sonde wurden wie für Abbildung 3.1 beschrieben eingesetzt. Ein 500facher Überschuss der nicht radioaktiv markierten Sonde 3.5 diente als Kompetitor.

## **3.2 Isolierung des für ein DNA bindendes Protein kodierenden cDNA-Klons R18 durch einen One-Hybrid-Versuch in Hefe**

Mit Hilfe eines One-Hybrid Versuchs in Hefe [120] sollten Proteine isoliert werden, die mit der durch AGCCC-Elemente charakterisierten Promoterbindungsstelle des LEA-Gens CDeT27-45 interagieren [85]. Beim One-Hybrid Versuch werden Hybrid-Proteine, die aus der Fusion der Repräsentanten einer cDNA-Bibliothek mit der Genaktivierungsdomäne Gal4 (Gal4AD) der Hefe entstehen, in Hefezellen auf Bindung an eine bestimmte DNA-Sequenz, dem Zielelement, untersucht. Die Bindung äußert sich infolge der Aktivierung eines an das Zielelement gekoppelten Reportergenes als eine Veränderung des Hefe-Phänotyps, welche durch die Hefe-Genaktivierungsdomäne ausgelöst wird; beispielsweise kann die Aktivierung des His3-Reportergenes zu einem histidinautotrophen Phänotyp führen. Voraussetzungen für einen erfolgreichen Hefe-One-Hybrid-Screen sind daher ein Zielelement, welches von den zu identifizierenden Proteinen gebunden werden kann, eine Reporterhefe, die spezifische Protein-DNA-Wechselwirkung sichtbar macht, sowie eine cDNA-Bibliothek, die Sequenzen enthält, welche für ein bindendes Hybridprotein kodieren. Diese Elemente des Hefe-One-Hybrid-Systems sind in Abbildung 3.3 schematisch dargestellt.

### **3.2.1 Das Pentamer A19 der CDeT27-45 Promotorbindungsstelle interagiert mit Kernproteinen aus ABA behandeltem *Craterostigma*-Kallus**

Um die Bindung von Proteinen an das Zielelement zu verstärken und auch Proteinen möglich zu machen, welche durch die Fusion an die Aktivierungsdomäne Gal4 der Hefe sterisch verändert worden sind, sollte ein Pentamer [38] der durch DNaseI Footprinting ermittelten Bindungsstelle des CDeT27-45 Promotors [85] als Zielelement des Hefe-One-Hybrid-Screens eingesetzt werden. Die Sequenz dieses Pentamers ist in Abschnitt 6.2 wiedergegeben. In einem Gel-Retardations-Assay sollte zuvor überprüft werden, ob das Pentamer als Ziel-DNA von Kernproteinen gebunden wird. Da sich gezeigt hatte, daß die DNA-Bindungsaktivitäten an die native Promotorbindungsstelle in Kernproteinextrakten aus ABA behandeltem Kallus besonders stark vertreten sind (siehe Abschnitt 3.1), wurden für diesen Gel-retardationsversuch mit dem Pentamer A19 Kernproteine aus 2 Tage ABA behan-

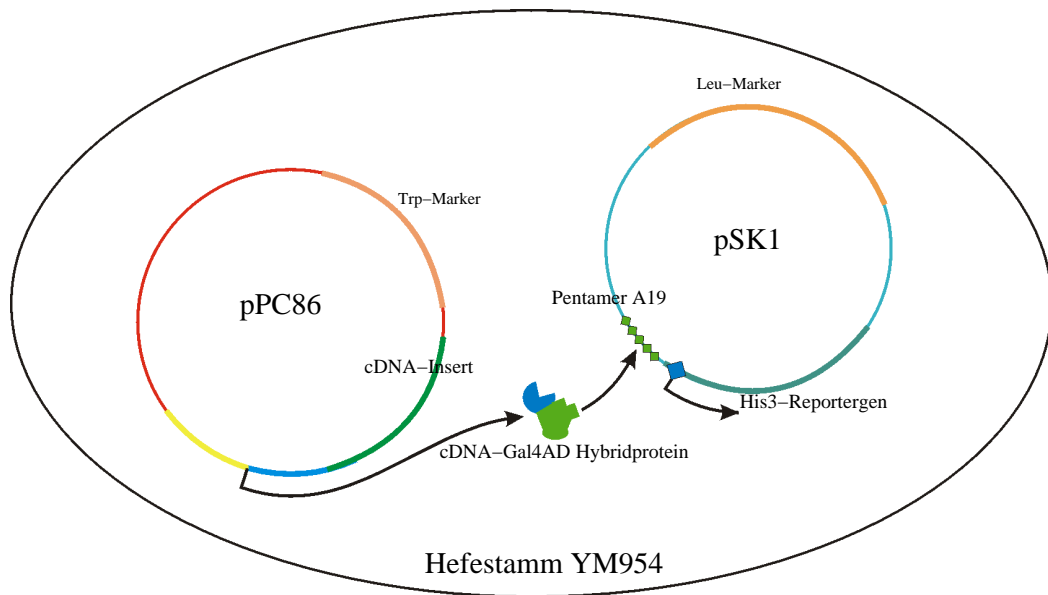


Abbildung 3.3: Elemente des im folgenden beschriebenen One-Hybrid Versuchs in Hefe. In der Hefezelle ist links das Plasmid pPC86 (rot) dargestellt, in dem cDNA-Sequenzen (grün) an die Gal4AD (blau) fusioniert sind und das einen Tryptophan-Marker (orange) zur Selektion in Hefe oder *Escherichia coli* enthält. Die Expression des Hybrid-Proteins (Mitte) wird durch den ADH1 Promotor (gelb, im Plasmid pPC86) angetrieben. Rechts in der Hefe ist das Reporterplasmid pSK1 (hellblau) schematisch wiedergegeben mit dem Pentamer A19 als DNA-Zielelement (5 grüne Vierecke) vor dem His3-Reportergen (cyan), dessen Expression zur Histidin-Autotrophie der ansonsten Histidin-auxotrophen Hefe YM954 führt. Das Plasmid pSK1 kann über den Leucin-Marker (orange) selektioniert werden.

deltem Kallus von *Craterostigma plantagineum* verwendet. Als Kontrolle dienten Kernproteine aus unbehandeltem Kallus, weil hier die Interaktion mit der nativen Promotorbindungsstelle sehr schwach ist.

Das Pentamer wurde mit den Restriktionsendonucleasen EcoRI und HindIII aus dem Vektor pA19 [38][126] herausgeschnitten und das DNA-Fragment aus einem Agarosegel isoliert. Durch Auffüllen der Enden mit [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]dATP und [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]dCTP wurde das Pentamer radioaktiv markiert. Je 10.000 cpm der Probe wurde mit 2.5 - 20  $\mu\text{g}$  der Kernproteine und mit einem 5 - 135 fachen Überschuß nicht radioaktiv markierter Probe inkubiert und in einem 4%igen nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Abbildung 3.4 zeigt das Ergebnis dieser Bindungsstudien. Mit zunehmender Menge Kernproteine aus 2 Tage ABA behandeltem Kallus wird eine zunehmende Menge radioaktiver Probe gebunden, während 20  $\mu\text{g}$  Kernproteine aus unbehandeltem Kallus nur zu einem eben sichtbaren Verzögerungssignal führen. In Gegenwart eines zunehmenden Überschusses nicht radioaktiv markierter Probe werden immer mehr radioaktiv markierte Moleküle an den Proteinbindungsstellen verdrängt, was eine zunehmende Abschwächung des Verzögerungssignals nach sich zieht. Somit zeigte das Pentamer A19 ein der nativen Promoterbindungsstelle vergleichbares Bindungsverhalten und wurde daher als Ziel-DNA im Hefe One-Hybrid Versuch eingesetzt.

### **3.2.2 Die Reporterhefe YM954-A19 kann in Gegenwart von 5 mM 3-AT nicht auf Minimalmedium ohne Histidin wachsen**

Um die One-Hybrid cDNA-Bibliothek durchsuchen zu können, muß gewährleistet sein, daß die Reporterhefe auf selektivem Medium nur aufgrund einer Interaktion zwischen dem Hybrid-Protein und dem Zielelement wachsen kann. Daher war es notwendig, die Reporterhefe vor Verwendung im Hefe One-Hybrid Versuch im Hinblick auf ihr Wachstum auf selektivem Medium zu testen.

In Hefe One-Hybrid Versuchen waren der Hefestamm YM954 und der Vektor pSK1 mit einem Konstrukt, das ein His3-Genderivat aus Hefe enthält, als Reporterplasmid bereits erfolgreich eingesetzt worden [58][64]. Daher sollte der mit dem Reporterplasmid pSK1 transformierte Hefestamm YM954 als Reporterhefe verwendet werden. Dazu wurde das als Zielelement vorgesehene A19-Pentamer mit den Restriktionsendonucleasen BamHI und SacI aus dem Vektor pA19 [38] herausgeschnitten und in das mit den gleichen Enzymen verdaute Plasmid pSK1 ligiert. Das auf diese Weise entstandene Reporterkonstrukt pSK1-A19 wurde nach

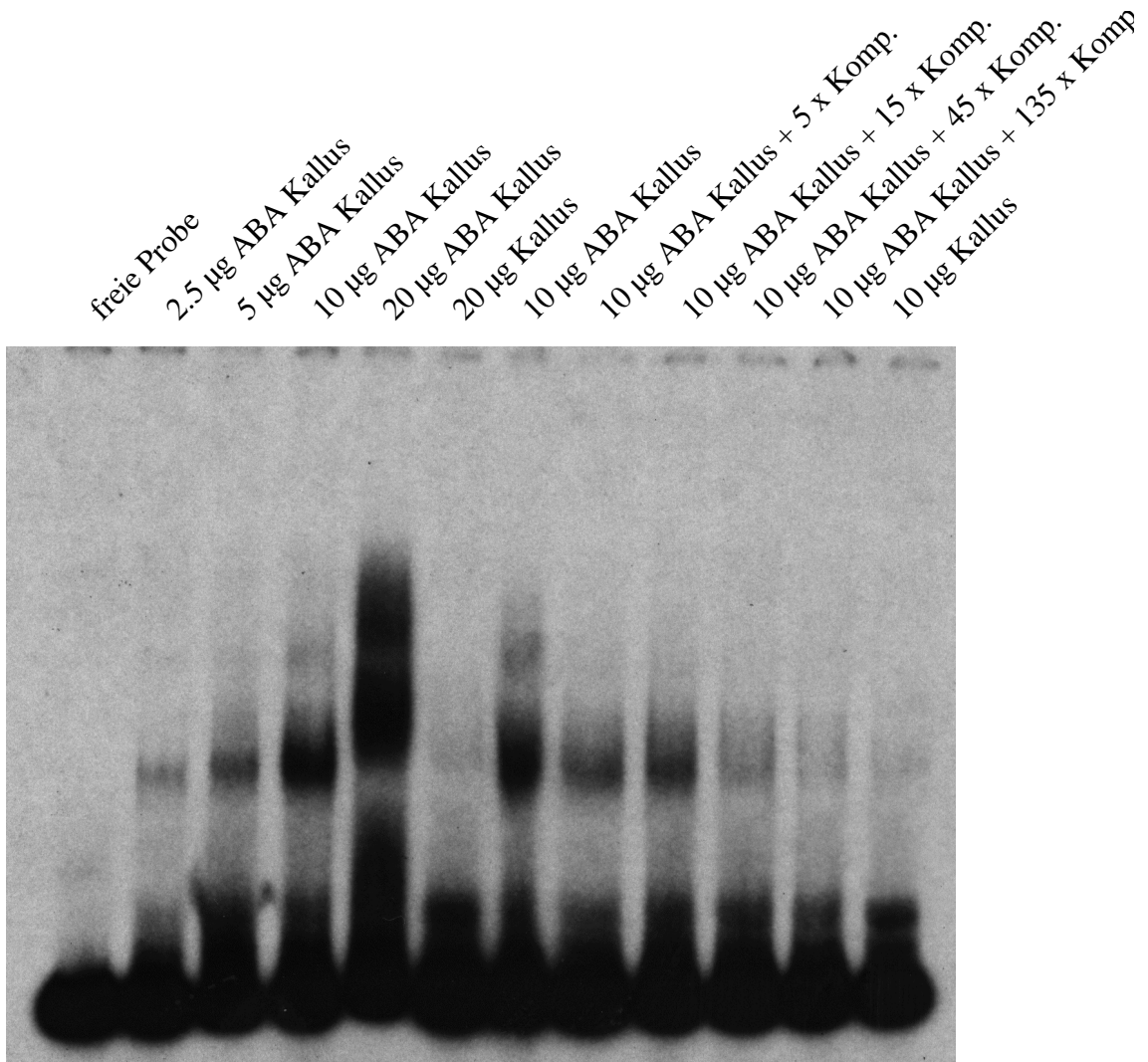


Abbildung 3.4: Bindung von Kernproteinen aus 2 d ABA behandeltem Kallus an das Pentamer A19 der im DNaseI-footprint geschützten Bindungsregion des CDeT27-45 Promoterfragmentes 3.5. In Gegenwart von 2 µg pdAdT reagierten 2.5 - 20 µg Kernproteinextrakte mit 10.000 cpm des Pentamers A19 als EMSA-Sonde. 10 µg Kernproteine aus 2 d ABA behandeltem Kallus wurden zusätzlich mit 5 - 135 fachem Überschuß des nicht radioaktiv markierten Pentamers inkubiert.

Histidin	3-AT [mM]	Wachstum
+	0	+
—	0	wenig
—	2.5	kaum
—	5	—
—	10	—
—	20	—

Tabelle 3.1: Wachstumstest der histidin-auxotrophen Reporterhefe YM954-A19 auf Minimalmedien in Gegenwart verschiedener Konzentrationen des Inhibitors 3-AT

einem Amplifikationsschritt in *Escherichia coli* in den Hefestamm YM954 transformiert und ergab die Reporterhefe YM954-A19.

Der Hefestamm YM954 ist auxotroph bezüglich der Aminosäure Histidin (Genotyp siehe Abschnitt 2.2.1) und wächst daher nicht auf Minimalmedium ohne Histidin. Transformiert mit dem His3-Genderivat im Vektor pSK1 wird aufgrund einer sehr schwachen Restexpression des His3-Gens oft geringfügiges Wachstum von Reporterhefen auf Medium ohne Histidin beobachtet. Daher sollte der kompetitive Inhibitor der Enzymaktivität des His3-Proteins in *Saccharomyces cerevisiae* 3-Aminotriazol (3-AT) dem Selektionsmedium in ansteigenden Konzentrationen zugefügt werden [32]. Ziel war es, die geringste 3-AT-Konzentration zu finden, bei der die Reporterhefe nicht mehr wächst, da der Screen dann hinreichend spezifisch ist, aber schwächere Interaktionen nicht unterdrückt werden. Der Test der Reporterhefe YM954-A19 erfolgte auf Selektivmedium ohne Histidin (siehe Abschnitt 2.2.2), dem 0, 2.5, 5, 10 oder 20 mM des Inhibitors 3-AT zugesetzt worden waren. Um den Bedingungen des One-Hybrid-Screens möglichst nahe zu kommen, war die Reporterhefe für diesen Test zusätzlich mit dem One-Hybrid-Vektor pPC86 ohne Insert transformiert worden. Die Ergebnisse dieser Wachstumstests sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Auf Selektivmedium ohne Histidin war in Gegenwart von 3-AT-Konzentrationen ab 5 mM keinerlei Wachstum mehr zu erkennen. Daher wurden 5 mM 3-AT dem histidinfreien Selektivmedium beigesetzt zur Unterdrückung von Wachstum, das nicht auf einer Aktivierung des Reportergens beruht.

### 3.2.3 Durchsuchung einer cDNA-Bibliothek aus 2 Tage ABA behandeltem Kallus auf Transfaktoren zum Zielelement A19 mit Hilfe der Reporterhefe YM954-A19

Die stärkste Bindungsaktivität an die native Bindungsstelle des CDeT27-45-Promotors war für Kernproteine aus ABA behandeltem Kallus beobachtet worden (siehe Gelverzögerungsexperimente in Abschnitt 3.1). Daher sollte in der Annahme, daß in ABA behandeltem Kallus auch die den bindenden Kernproteinen entsprechenden mRNAs am stärksten vertreten sind, eine cDNA-Bibliothek mit Hilfe von polyA<sup>+</sup>RNA aus 2 Tage ABA behandeltem Kallus hergestellt werden. Diese cDNA-Bibliothek sollte dann in den One-Hybrid Vektor pPC86 kloniert werden und in der Reporterhefe YM954-A19 nach Proteinen durchsucht werden, die an das Pentamer A19 als Zielelement binden.

Die wie unter 2.6.7 beschrieben hergestellte cDNA-Bibliothek repräsentierte  $1.5 \times 10^6$  primäre Klone. Um die Qualität der Bibliothek zu überprüfen, wurde ein Aliquot der cDNA-Bibliothek in *Escherichia coli* transformiert und die One-Hybrid Plasmide von 38 primären Klonen isoliert. Von den 38 untersuchten Klonen trugen 35 ein Insert im Vektor pPC86; die durchschnittliche Länge dieser Inserts betrug 1.1 kB.

Die primären Klone wurden wie unter 2.6.7 beschrieben auf 250 µg amplifiziert und zur Transformation der Reporterhefe YM954-A19 verwendet. Dabei wurde eine Transformationseffizienz von ca  $10^5$  Transformanten pro µg Plasmid-DNA erreicht, so daß  $27.5 \times 10^6$  transformierte Hefezellen auf Selektivmedium auf die Bindungseigenschaften ihrer cDNA-Inserts hin untersucht werden konnten. Nach einer Inkubation von sechs Tagen bei 30°C auf Selektivmedium zeigten sich 309 Hefekolonien. Die Fähigkeit dieser Hefeklone, auf Selektivmedium zu wachsen, bestätigte sich nach Ausstreichen in Wasser resuspendierter Zellen auf Selektivmedium. Die One-Hybrid-Plasmide der im ersten Durchgang positiven Hefeklone wurden durch Transformation von DNA-Isolaten dieser Klone (siehe Abschnitte 2.6.1 und 2.1.3) in den *Escherichia coli* Stamm KC8 (siehe Abschnitt 2.1.1) von den Reporterplasmiden getrennt. Dazu wurden die Bakterien auf M9-Medium ohne Tryptophan, dem Selektionsmarker des Plasmids pPC86 (siehe Abbildung 3.3), selektiert und Plasmid-DNAs isolierter KC8-Zellen durch Präparationen im kleinen Maßstab (siehe Abschnitt 2.6.1) gewonnen.

Das Ergebnis der Sequenzierung der Inserts von 26 zufällig ausgewählten Klonen nach der ersten Selektionsrunde ist in Tabelle 3.2 dargestellt.



Tabelle 3.2: Sequenzhomologien der Inserts von 26 zufällig ausgewählten Klonen nach der ersten Selektionsrunde des One-Hybrid Versuches in Hefe. Aufgeführt sind neben statistisch signifikanten Homologien Angaben darüber, ob das Leseraster (ORF) der Insert-Homologie das gleiche wie das der Gal4AD ist und ob es durchgängig, d.h. ununterbrochen von Stopcodonen ist. Für die Klone 22/3 und 23/1 sind keine Aussagen zu Leserastern möglich, da die Sequenzen von zahlreichen Stopcodonen durchsetzt sind.

Klon	Signifikanteste Homologie zu Datenbanksequenzen	ORF Insert und Gal4AD	
		gleich	durchgängig
1/1	Serin/Threonin Kinase <i>Sorghum bicolor</i>	—	✓
2/1	6-19 cDNA <i>Craterostigma plantagineum</i>	—	—
4/1	YTM1 Microtubuli assoziiertes Protein <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	—	✓
5/1	hypothetisches Protein <i>Arabidopsis thaliana</i>	—	—
7/9	unbekannte genomische Sequenz <i>Arabidopsis thaliana</i>	—	—
7/10	2,4-D induzierbare Glutathion-S-Transferase <i>Gycine max</i>	✓	—
7/15	mitochondriales Rieske Fe-S Protein <i>Zea mays</i>	✓	—
8/1	pcC27-04 <i>Craterostigma plantagineum</i>	—	✓
9/1	—	—	✓
10/1	putatives Auxin reprimiertes Protein <i>Prunus armeniaca</i>	—	—
12/6	pcC3-06 <i>Craterostigma plantagineum</i>	—	✓
13/1	ribosomales Protein (30S Untereinheit) <i>Spinacia oleracea</i>	—	✓
14/1	T23K8.1 <i>Arabidopsis thaliana</i>	—	✓
20/1	EST/unbekanntes Protein <i>Arabidopsis thaliana</i>	—	—
22/3	—	?	?
23/1	—	?	?

Fortsetzung Tabelle 3.2

Fortsetzung Tabelle 3.2

Klon	Signifikanteste Homologie zu Datenbanksequenzen	ORF Insert und Gal4AD	
		gleich	durchgängig
25/1	S-Adenosylmethionin-Sterol-C-Methyltransferase <i>Nicotiana tabacum</i>	—	✓
34/1	Cyclophilin-40 <i>Bos taurus</i>	—	✓
36/1	mitochondriales 26S rRNA Gen <i>Triticum aestivum</i>	/	/
37/1	Hitzeschock-Protein 70 <i>Oryza sativa</i>	✓	✓
38/1	Chaperonin enthaltende T-Komplex Polypeptid $\beta$ -Untereinheit <i>Homo sapiens</i>	—	—
39/1	putatives CUC2 Protein <i>Arabidopsis thaliana</i>	—	—
40/1	ribosomales Protein S15 <i>Arabidopsis thaliana</i>	—	✓
65/1	hypthetisches Protein <i>Arabidopsis thaliana</i>	—	✓
81/1	potentieller Embryogenese-Marker Dc3 <i>Daucus carota</i>	—	✓
125/1	17.3 kD Klasse I Hitzeschock-Protein <i>Glycine max</i>	—	—

In vielen Fällen gab es kein größeres Leseraster *in frame* mit der Gal4-Aktivierungsdomäne, oder die Leseraster der Hybridproteine waren nicht durchgängig, sondern zwischen Gal4AD und dem ORF durch Stopcodonen unterbrochen. Die Homologien deuteten in den meisten Fällen nicht auf Proteine mit Transkriptionsfaktoreigenschaften. Weiterhin fanden sich in Hefeklon 7 drei verschiedene Plasmide, so daß zur Erfassung aller an echten Interaktionen beteiligten Plasmide die One-Hybrid Vektoren-DNAs der 309 positiven Hefeklone aus dem ersten Durchgang isoliert und für eine erneute Transformation der Reporterhefe verwendet wurden. In dieser zweiten Selektionsrunde führten 18 Plasmide zu Hefekolonien auf Selektivmedium. Es gab keine Schnittmenge mit den Sequenzen aus der ersten Selektionsrunde. Die Sequenzen der Inserts dieser Plasmide sind in Tabelle 3.3 aufgeführt. Wie nach der ersten Selektionsrunde wiesen die meisten Insertsequenzen entweder kein größeres Leseraster *in frame* mit der Gal4AD auf, oder

Tabelle 3.3: Homologien der Inserts aller histidinautotrophen Hefeklonen nach der zweiten Runde des One-Hybrid Versuchs. Aufgeführt sind neben statistisch signifikanten Homologien Angaben darüber, ob das Leseraster (ORF) der Insert-Homologie das gleiche wie das der Gal4AD ist und ob es durchgängig, d.h. ununterbrochen von Stopcodonen ist.

Klon	Signifikanteste Homologie zu Datenbanksequenzen	ORF Insert und Gal4AD	
		gleich	durchgängig
R1	polyA bindendes Protein <i>Triticum aestivum</i>	—	✓
R2	hypothetisches Protein <i>Arabidopsis thaliana</i>	✓	✓
R3	Epoxidhydrolase <i>Solanum tuberosum</i>	—	—
R4	Epoxidhydrolase <i>Solanum tuberosum</i>	—	—
R5	—	—	—
R6	—	—	—
R7	—	—	✓
R8	LEA D-34 <i>Gossypium</i>	✓	✓
R9	Rab21 <i>Oryza sativa</i>	✓	✓
R10	putatives Protein <i>Arabidopsis thaliana</i>	—	✓
R11	unbekanntes Protein <i>Arabidopsis thaliana</i>	✓	✓
R12	—	✓	✓
R13	putatives MINE-Protein <i>Chlorella protothecoides</i>	—	✓
R14	—	—	✓
R15	potentieller Embryogenese-Marker Dc3 <i>Daucus carota</i>	—	—
R16	unbekanntes Protein <i>Arabidopsis thaliana</i>	—	—
R17	Ubiquitin aktivierendes Enzym <i>Arabidopsis thaliana</i>	—	✓
R18	im folgenden beschriebenes Zinkfingerprotein	✓	✓

sie kodierten für Proteine ohne die Eigenschaften eines Transkriptionsfaktors. In einer dritten Selektionsrunde war nur das One-Hybrid Plasmid des achtzehnten Retransformanten in der Lage, Hefekolonien auf selektivem Medium hervorzurufen. Das Insert dieses One-Hybrid Plasmides wurde deswegen R18 genannt und im folgenden auf die Spezifität seiner Bindung an das Zielelement untersucht.

### **3.2.4 Das Translationsprodukt des cDNA-Inserts R18 interagiert in Hefe spezifisch mit dem Pentamer A19 im Reporterplasmid pSK1-A19**

Um die Spezifität der Bindung des vom cDNA-Inserts des Klonen R18 kodierten Proteines an das Pentamer des Reporterplasmides pSK1-A19 in Hefe genauer zu untersuchen, wurde der Hefestamm YM954 mit dem Plasmid pSK1 ohne Zielelement A19 transformiert. Die so entstandene Reporterhefe YM954-pSK1 und die im One-Hybrid-Screen eingesetzte Reporterhefe YM954-A19 wurden sowohl mit dem One-Hybrid-Plasmid des Klonen R18 als auch mit dem Plasmid pPC86 ohne Insert transformiert. Repräsentanten der vier möglichen Plasmidkombinationen wurden nach Resuspension in Wasser auf Selektivmedium aufgetragen und sechs Tage bei 30°C inkubiert. Das Ergebnis des Versuches ist in Abbildung 3.5 wiedergegeben und zeigt, daß nur die Plasmidkombination R18 + pSK1-A19 Wachstum der Hefe YM954 auf Selektivmedium ermöglicht. Das Hybridprotein des Klonen R18 bindet also spezifisch an das Pentamer A19 im Reporterplasmid pSK1-A19.

### **3.2.5 Das cDNA-Insert des Klonen R18 kodiert für ein basisches Protein mit einem C<sub>3</sub>H-Zinkfinger und einer SAP-Domäne und zeigt Homologien zu Sequenzen aus *Arabidopsis*, Tomate und weiteren Arten**

Um Aufschluß über das von Klon R18 kodierte Hybridprotein zu erhalten, wurde das cDNA-Insert mit Hilfe der Primer Yan1 und Yan2 (siehe Anhang 6.2) sequenziert. In Abbildung 3.6 ist die Nukleinsäuresequenz des cDNA-Inserts von Klon R18 zusammen mit der Aminosäureabfolge im Leseraster der Gal4AD wiedergegeben.

Über den zur Klonierung der cDNA-Bibliothek verwendeten Sall-Adapter hinweg (siehe Anhang 6.2) umfaßt das offene Leseraster 385 Aminosäuren der Insertsequenz vor dem ersten Stopcodon. Es schließt sich eine über 128 Basen er-

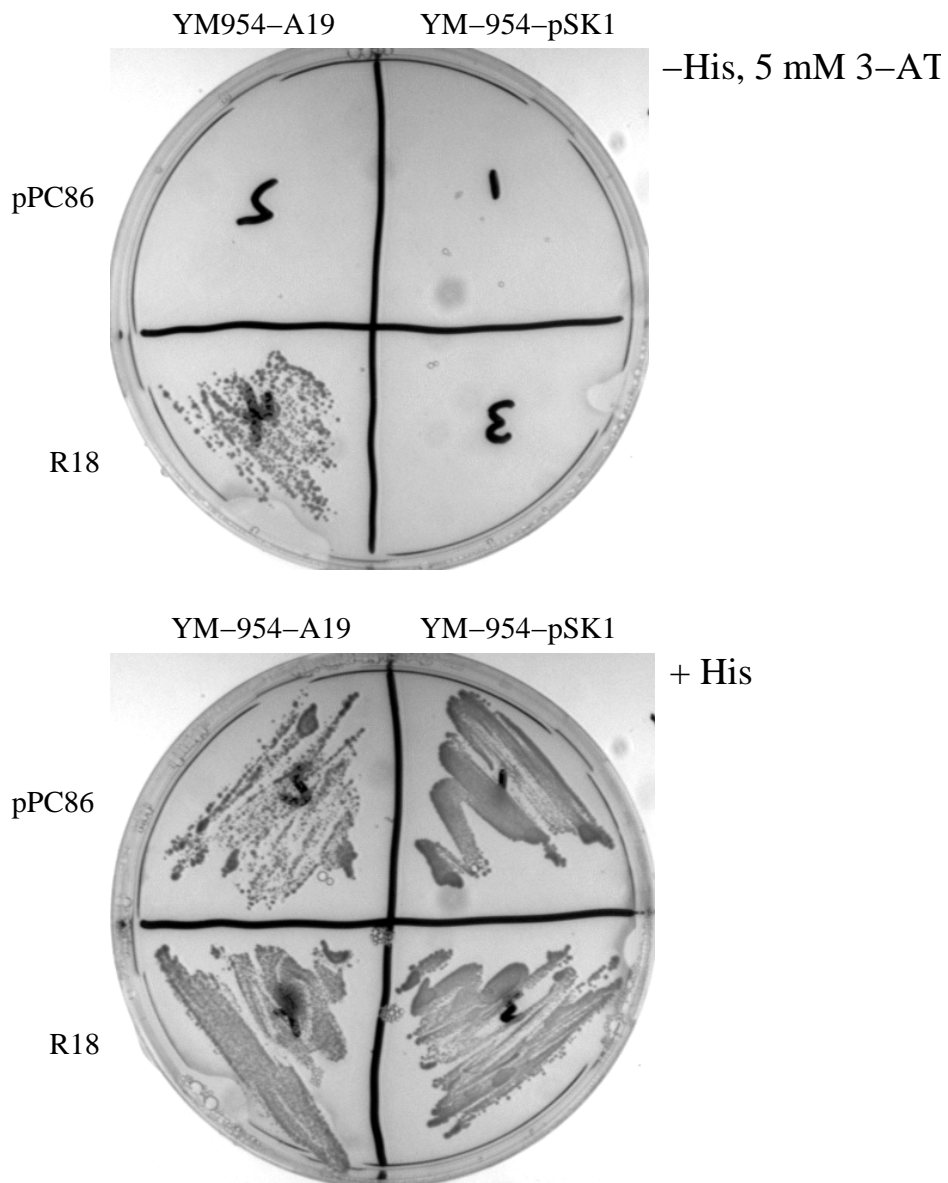


Abbildung 3.5: Spezifität der Interaktion von One-Hybrid Klon R18 und dem Pentamer A19. Abbildung oben: Wachstum der Reporterhefen YM-954-A19 (Reporterplasmid mit Pentamer A19) und YM-954-pSK1(ohne Pentamer A19) in Gegenwart des Klones R18 bzw. des One-Hybrid Plasmids pPC86 ohne Insert auf selektivem Medium. Abbildung unten: Kontrollen auf Medium mit Histidin.

Abbildung 3.6: Nukleinsäure- und Peptidsequenz des cDNA-Inserts von One-Hybrid Klon R18 sowie der angrenzender Bereiche des Plasmids pPC86. Die zur Klonierung verwendeten SallI- und der NotI-Adapter sind einfach unterstrichen, Basen der Gal4AD sind unterschlängelt.

```

-79 ATGCTATATAACTATCTATTTCGATGATGAAGATACCCACCAACCCAAAAAAGAGGGT -20
-27 M L Y N Y L F D D E D T P P N P K K E G -8
-19 GGTTCGACCCACGCGTCCGCCGTATTGTGAAGAGTACGAAGACAACCTGGAGGAGGGC 41
-7 G S T H A S A R I V K S T K D N L E E G 13
42 GTGAAGTTGAGAAGACTGGTGGTCCAGAGCTGAGCAAGGAGGACCAAAAATGTTATGAA 101
14 V E V E K T G G P E L S K E D Q K C Y E 33
102 ACCATTCTGACAATGGTTGAAGGTGGTCAGGTGGAGAGCTTAAAAGTCGATCAATGCAAA 161
34 T I L T M V E G G Q V E S L K V D Q C K 53
162 ATATATCTTAGGAAACACAAGTTGAGATTGACTGGAAACAAAGCCACACTTATTCAGCGA 221
54 I Y L R K H K L R L T G N K A T L I Q R 73
222 ATTAAGGAGCATAATGCATTGTCAATGGTGGCGGGAAAAGAAGTATCCTGTGTCTAGT 281
74 I K E H T C I V N G G G E K K Y P V S S 93
282 TTTGTGCTGAATTGCAAAGGTGATGCATGCCTGGGGGATGTAGTCATGTTCGAACAAAAC 341
94 F V L N C K G D A C L G D V V M F E Q N 113
342 GTATATGAAATGTTTAAATTTGGCATCTCGCAGTGCTGCTGGTCCCCCTTGTGGCAAAAAG 401
114 V Y E M F N L A S R S A A G P P C G K R 133
402 CTTGTTGACAGCCGTATCATCAAGGAAAGTATGGAGCAGCCAAGCAACAACATACATTT 461
134 L V A G R I I K E S Y G A A K Q Q H T F 153
462 ACGATTGAAGTCCATGGAGCAAAGGAGAGAAGCCATTGCCCTCCGCTTCACCCTTTGCTT 521
154 T I E V L W S K G E K P L P P L H P L L 173
522 ATTAAAGGCAGGAATCTATACAAGTTAAAGACATTGAGGCAGAAATGGGAAGATGAAGGC 581
174 I K G R N L Y K L K T L R Q K W E D E G 193
582 GAAAGGGAGAAGATTTTATTAGAAAAGCATTCTAGAGGTGACGTAGCACGTTGTCACAGG 641
194 E R E K I L L E K H S R G D V A R C H R 213
642 GACGCACGCATAGAGCGAAGGGAAATGCGAAAAAAGCGATAAATGCAGAAGCAAATAGG 701
214 D A R I E R R E M R K K A I N A E A N R 233
702 GGAACCAGGAAAACAAAACAACGGGCCATTCCACAAATCATGAGAAGCGAATTAGC 761
234 G T R K Q N N G P I H S T N H E K R I S 253
762 GGATCTGTAAAGCAGAAGGATCTCATAACGGACTTGGATGATACAAGTTTTCACCACAAG 821
254 G S V K Q K D L I T D L D D T S F H H K 273
822 AAACAGAATATCCCGGAGCTAGTGGATCGAACTCGGAAAATCAGGGAAAACATTATAGA 881
274 K Q N Y P G A S G S N S G N Q G N H Y R 293
882 CCACCACCCATTGGTATCCCAAGCACCATTTTGGCGCCATTTGTTAGGATTAATAGCTGT 941
294 P P P I G I P S T I L P P F V R I N S C 313
942 GGCTTTGACCGTAGCTTCCAGCCAAGTATTTGAGCAACATCAACATGAGTAGGACGAAC 1001
314 G F D R S F Q P T S L S N I N M S R T N 333
1002 TTTTACATCATCTTGTTCATCCAGAGATCAGAGACAACATGTTCAATCCCGGGATTAC 1061
334 F L H H L V H P R D Q R Q H V Q S R D Y 353
1062 GTGCGAAATCAGATTGTCAGGTATTATGCTCAAGGACGGTGTCAATTCGGAGATAGGTGC 1121
354 V R N Q I C R Y Y A Q G R C H F G D R C 373
1122 AAGTATTTGCATGAACCTCCTGTAGAATATGATTAATCGCATTATCACCCAATATTGCAA 1181
374 K Y L H E L P V E Y D * S H Y H P I L Q 393
1182 GATTTGATTGACTTGGTCCCCTCTTTGGCAATACCCATATACTTGCTACTGAATATTTG 1241
394 D L I D L V P S F G N T H I L A T E Y L 413
1242 TATATTTGTTTCAAATTTTTTTAGCTTGTGCATACATCTATCAAAAAAAAAAAAAAGGGC 1301
414 Y I C F K F F * L V I H L S K K K K K G 433
1302 GGCCGCCACCGGGTGGAGCTCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGT
434 G R H R G G A P I R P I V S R

```

streckende untranslatierten Region an, dann eine 15 Adenine lange poly-Adenin-Sequenz und schließlich die NotI-Restriktionsschnittstelle des zur Herstellung der cDNA-Bibliothek verwendeten Oligo-dT-Adapters (siehe Anhang 6.2). In den anderen möglichen Leserastern gibt es keine längeren Aminosäuresequenzen.

Die Aminosäuresequenz im Gal4AD-Leseraster kodiert durch den hohen Anteil an Lysin und Arginin (45 von 385 Aminosäuren) für ein basisches Protein mit einem pI von 9.6. Am Carboxyterminus des ORF findet sich ein C<sub>3</sub>H-Zinkfinger, zu dem ein BLAST-Datenbankvergleich ähnliche Sequenzen bekannter Zinkfingerproteine aus *Homo sapiens*, *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana* und anderen Arten lieferte. In Abbildung 3.7 D ist die dem C<sub>3</sub>H-Zinkfinger-Motiv entsprechende Abfolge C-X<sub>2-8</sub>-C-X<sub>2-16</sub>-C-X<sub>2-6</sub>-H (mit C = Cystein, H = Histidin und X = nicht konservierte Aminosäure) von drei Cysteinen und einem Histidin farbig hervorgehoben.

Am N-terminalen Ende entspricht der Bereich der Aminosäuren 44-78 der R18-Sequenz dem SAP-Motiv, das aus einer Reihe DNA-bindender Proteine beschrieben worden ist, die in Abbildung 3.7 B im Sequenzvergleich mit R18 aufgeführt sind. In 10 von 11 der nach Aravind und Koonin [3] für die SAP-Domäne charakteristischen Positionen entspricht die Sequenz der translatierten R18-cDNA dem SAP-Motiv. In Teilabbildung 3.7 B sind typische SAP-Domänen R18 gegenübergestellt und die durch Pfeile markierten charakteristischen Positionen wiedergegeben.

Für den Bereich der Aminosäuren 181-232 gibt das Programm PHD (unter [http://www.public.iastate.edu/~pedro/pprotein\\_query.html](http://www.public.iastate.edu/~pedro/pprotein_query.html)) eine Helix-Loop-Helix (HLH) Struktur an. Die eine Helix umfaßt 21 Aminosäuren, die andere 25. Mit 16 basischen Aminosäuren ist der Bereich der Helix-Loop-Helix-Struktur reich an positiven Ladungen. Die Helices sind nicht amphipatisch und entsprechen nicht der Consensus-Sequenz, die von vielen beschriebenen Transkriptionsfaktoren mit Helix-Loop-Helix-Domänen abgeleitet worden ist. Weiterhin sind kurze, basenreiche Abschnitte wie RKHK (57-60) oder RREMRRK (219-225) vorhanden, bei denen es sich um Kernlokalisierungssignale handeln kann.

Abbildung 3.7: Homologien und Strukturelemente des One-Hybrid Klons R18 (auf der nächsten Seite). Teilabbildung A zeigt einen Vergleich des 5'-Bereiches von R18 mit Sequenzen aus der Datenbank. In Teilabbildung B ist R18 Sequenzen mit der putativen SAP DNA-Bindungsdomäne gegenübergestellt. Die Farbkodierung der durch Pfeile markierten konservierten Positionen innerhalb der SAP-Domäne folgt Aravind und Koonin [3]: gelb hydrophobe und aliphatische Reste, polare Reste magenta, große Reste grau und das stark konservierte Glycin grün. In Teilabbildung C sind Homologien zum mittleren Teil von R18 wiedergegeben. Teilabbildung D zeigt rot hervorgehoben das C<sub>3</sub>H-Zinkfinger-Motiv in der Sequenz von R18 im Vergleich zu verschiedenen Vertretern mit diesem Motiv aus der Datenbank. Teilabbildung E faßt die Strukturelemente des One-Hybrid Klons R18 schematisch zusammen und gibt ihre Positionen innerhalb der Sequenz wieder. Als schwarze Pfeile sind die Primer R18-NcoI-5' und R18-NcoI-3' eingezeichnet, die zur Amplifizierung eines NcoI-R18-Fragmentes verwendet wurden (Sequenzen der Primer siehe Anhang 6.2). Die Datenbankzugangscodes der hier aufgeführten Sequenzen sind im Anhang 6.3 zu finden



**A** Tomato, EST Frucht\_gfsm, nt 361-599  
 Tomato, EST Frucht\_rot, nt 349-673  
 Craterostigma, R18, aa 38-112  
 Pinus taeda, EST Sprossspitze, nt 271-492  
 Arabidopsis, hyp. Protein, aa 83-158

VMSLVVSRHQLGVAGRNKKHGKHLITKALHLL  
 IEAMTVQHEPSTLRKLVGVPVKKGKELISLRLHLM  
 VKKLVVSEHEKREKRLSDKGLKAKMERLQAAL  
 HSKLVSLVQADVSDKLVKRVKPKLQFL  
 YSSLVVVGKDLTKRNLSSVCSLKKVIVORLKEHT  
 VESLVVVDGKILRKHKLRLITGKTIORLKEHT  
 v lrv e l k l k k l l v k e l l i l l

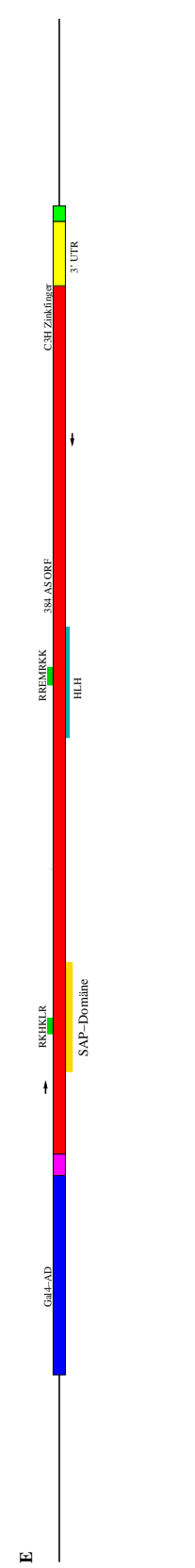
**B** P1A51 Homo sapiens aa 11-45  
 ARP Arabidopsis, aa 88-122  
 SAP-A Homo sapiens, aa 8-42  
 SIF1p Saccharomyces cerevisiae, aa 43-77  
 SIF2p Saccharomyces cerevisiae, aa 44-78  
 Ttop1 Saccharomyces cerevisiae, aa 4-38  
 R18 Craterostigma plantagineum, aa 44-78  
 Consensus

**C** Tomato, EST Ovat, nt 141-500  
 Tomato, EST Frucht\_rot, nt 11-260  
 Reisi, EST Rispe, nt 1-147  
 Arabidopsis, hyp. Protein, aa 183-277  
 Craterostigma, R18, aa 143-221

IVKESYGAAKQOHTFTVEVLSQGVKQLPPLFPLVVKGRNLYKMKTFRQ...KMRDEBERLVLGKHKRGDAARFIRATRKSS  
 LVKESYGAAKQOHTFTVEVLSQGVKQLPPLFPLVVKGRNLYKMKTFRQ...RWRDEBERLVLGKHKRGDAARFIRATRKSS  
 VIKESYGEKQOHTFTIIVFWSKGVGKLPPLFPLVVKGRNLYRMMTFRQIDR...RWRDEBERLVLGKHKRGDAARFIRATRKSS  
 VIKESYGEKQOHTFTIEVLSQGVKQLPPLFPLVVKGRNLYRMMTFRQIDR...RWRDEBERLVLGKHKRGDAARFIRATRKSS  
 VIKESYGAARKQOHTFTIEVLSQGVKQLPPLFPLVVKGRNLYKMKTFRQ...KMRDEBERLVLGKHKRGDAARFIRATRKSS

**D** Mensch, ZNF127, aa 396-427  
 Craterostigma, R18, aa 356-385  
 Arabidopsis, RNA bindendes Protein, aa 159-188  
 Caenorhabditis elegans, Piel, aa 186-216  
 Arabidopsis, ZNF5, aa 264-314

SNKARVFAEGRGNPFQDTSFKR...RWRDEBERLVLGKHKRGDAARFIRATRKSS  
 RNLRYVAQGR...CHFGDRCKYLLR...RWRDEBERLVLGKHKRGDAARFIRATRKSS  
 RAHLSFPI...RFGDRCKYLLR...RWRDEBERLVLGKHKRGDAARFIRATRKSS  
 RQLSLPH...ERGNCRGPRCKRFD...RWRDEBERLVLGKHKRGDAARFIRATRKSS  
 GEPDLYVYSRYGICRFGPS...RWRDEBERLVLGKHKRGDAARFIRATRKSS



Der BLAST-Datenbankvergleich förderte homologe EST-Sequenzen aus Tomate, *Arabidopsis* und *Pinus taeda* zu Tage sowie ein aus einer genomischen Sequenz abgeleitetes Protein aus *Arabidopsis thaliana*. Die Homologien dieser Sequenzen gruppieren sich um die Bereiche der SAP-Domäne (Abbildung 3.7 A) und den HLH-Bereich (Abbildung 3.7 C) und sind stellenweise hoch mit Identitäten über 75 %.

Somit handelt es sich bei R18 um ein bisher unbekanntes Zinkfingerprotein mit einer SAP-Domäne und einer nicht charakterisierten Helix-Loop-Helix Struktur, welches Ähnlichkeiten zu Sequenzen aus anderen Spezies aufweist. Abbildung 3.7 E faßt die Strukturelemente des cDNA-Inserts von Klon R18 zusammen.

### **3.3 Molekularbiologische Charakterisierung des One-Hybrid Klons R18**

Da das cDNA-Insert des One-Hybrid-Klones R18 für ein bisher unbekanntes Zinkfingerprotein kodiert, welches in Hefe spezifisch an das Pentamer A19 bindet, sollte es molekularbiologisch charakterisiert und im Hinblick auf notwendige Eigenschaften für einen Transkriptionsfaktor untersucht werden.

#### **3.3.1 Das cDNA-Insert des Klones R18 ist das Fragment eines größeren, seltenen Transkriptes, das in Wurzeln und Kallus vorkommt**

Durch Northern-Analysen wurden Größe und Expressionsmuster der mRNA ermittelt, die das cDNA-Insert des Klones R18 repräsentiert. 6 µg der polyA<sup>+</sup>RNA, die zur Herstellung der cDNA-Bibliothek verwendet worden war, wurden dazu mit dem radioaktiv markierten cDNA-Insert des Klones R18 hybridisiert. Nach der Autoradiographie wurde derselbe Filter nacheinander mit Sonden für das 1.8 kB große Transkript des LEA-Genes CDeT11-24 [118] sowie für das 0.9 kB große Transkript von CDeT27-45 [5] hybridisiert. Die in Abbildung 3.8 A nebeneinander und horizontal gleich ausgerichteten Autoradiographien zeigen, daß die cDNA des Klones R18 eine 1.7–1.8 kB große mRNA repräsentiert.

Die Hybridisierung eines Northernfilters mit je 4 µg polyA<sup>+</sup>RNA aus Blättern (frisch, 24 und 72 Stunden getrocknet), Wurzeln (frisch und 72 Stunden getrocknet) sowie Kallus (frisch, 2 und 4 Tage ABA behandelt) von *Craterostigma plantagineum* mit dem radioaktiv markierten Insert des Klones R18 ergab Signale

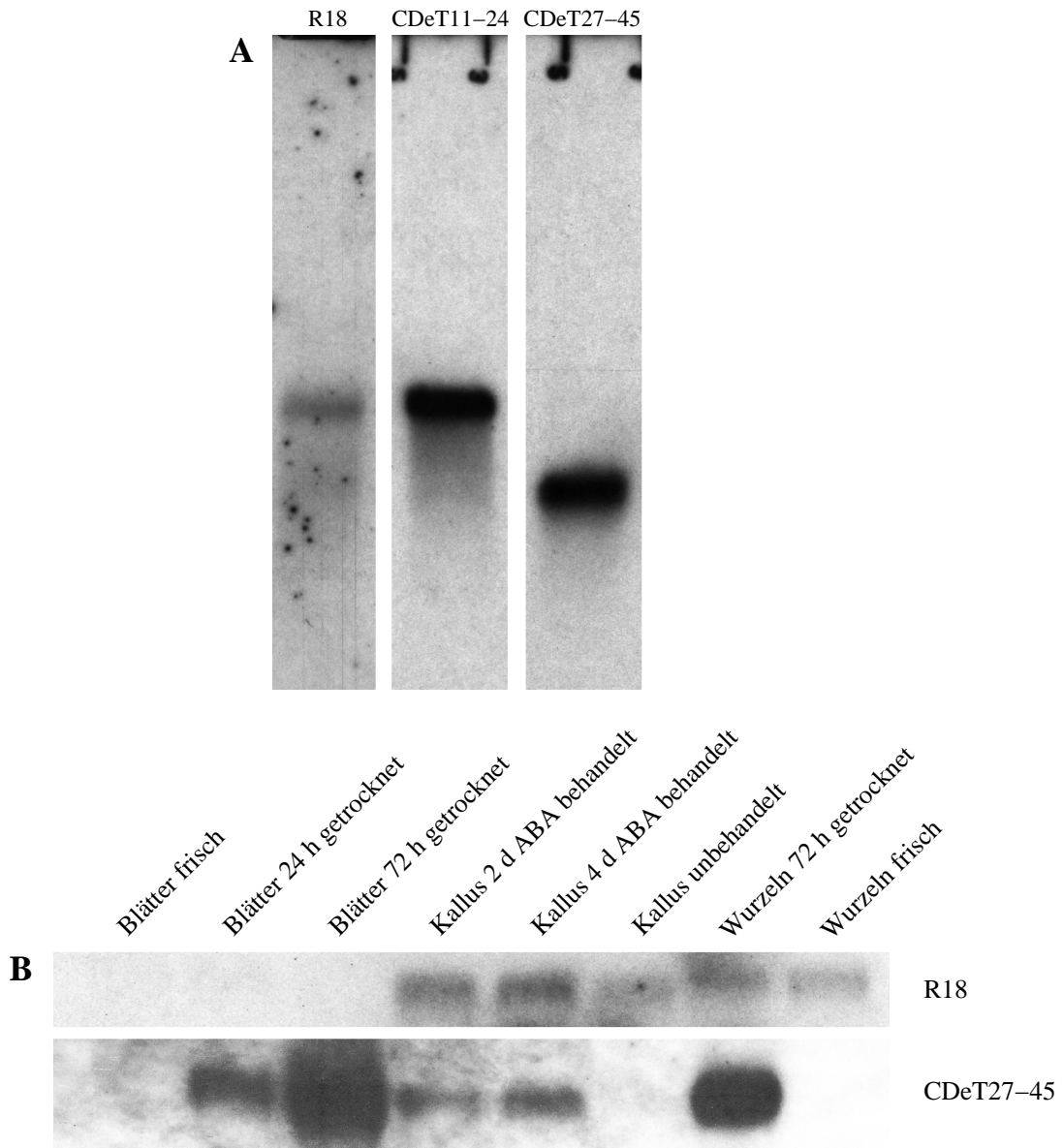


Abbildung 3.8: Northern Analyse zur Bestimmung von Größe und Expressionsmuster der von cDNA-Klon R18 vertretenen mRNA. A Derselbe Filter mit  $6 \mu\text{g}$  polyA<sup>+</sup>-RNA aus 2 Tage ABA behandeltem Kallus wurde nacheinander mit Sonden für die mRNAs von R18 (spezifische Aktivität von  $1.8 \times 10^7$  cpm), CDeT11-24 ( $4 \times 10^6$  cpm) und CDeT27-45 ( $4 \times 10^6$  cpm) hybridisiert. Der hybridisierte Filter wurde 96 h (R18) bzw. 3 h (CDeT11-24 und CDeT27-45) exponiert. B Je  $4 \mu\text{g}$  polyA<sup>+</sup>-RNA wurden mit Sonden für die mRNAs von R18 und CDeT27-45 hybridisiert. Northernanalyse in Teilabbildung B freundlicherweise von Frau Barbara Eilts zur Verfügung gestellt.

für Wurzeln (frisch und getrocknet) sowie für Kallus (frisch und ABA behandelt). Die Hybridisierung desselben Filters mit einer Sonde für CDeT27-45 ergab die erwarteten Signale für getrocknete Blätter, getrocknete Wurzeln sowie ABA behandelten Kallus [5][90]. Somit liegt die dem cDNA-Insert R18 entsprechende mRNA in Wurzeln und in Kallus, aber nicht in Blättern vor. Die Expression erfolgt unabhängig von Austrocknung oder ABA Behandlung (vergleiche Abbildung 3.8 B).

Bei der R18-mRNA handelt es sich um ein seltenes Transkript, denn das in Abbildung 3.8 gezeigte Signal wurde verglichen mit den Signalen für CDeT11-24 oder CDeT27-45 durch eine Sonde mit sehr viel höherer spezifischer Radioaktivität ( $1.8 \times 10^7$  cpm für R18 bzw.  $4 \times 10^6$  cpm für CDeT11-24 und CDeT27-45) und eine vielfach längere Expositionszeit (96 h für R18 bzw. 3 h für CDeT11-24 und CDeT27-45) des Films erreicht.

### **3.3.2 Das in *Escherichia coli* als GST-Fusionsprotein exprimierte cDNA-Insert des Klones R18 bindet *in vitro* an das Pentamer A19 und an das native Promoterfragment 3.5**

Zur Bestätigung der Bindung des von cDNA-Klon R18 kodierten Proteins an das Pentamer A19 und zur Untersuchung der Bindung an das native Promoterfragment 3.5 sollten Bindungsstudien mit dem als Glutathion-S-Transferase- (GST)-Fusionsprotein in *Escherichia coli* exprimierten cDNA-Insert des Klons R18 durchgeführt werden. Hierfür wurde das cDNA-Insert mit den Restriktionsendonucleasen SalI und NotI aus dem One-Hybrid Plasmid pPC86 geschnitten und in den mit den gleichen Enzymen verdauten Expressionsvektor pGEX4T-2 [89] kloniert; in pGEX4T-2 liegen der GST-Anteil und das von R18 kodierte Protein in demselben Leseraster des Hybridproteins. Nach Transformation des so entstandenen Vektors pGEX-R18 in Bakterien vom *Escherichia coli* Stamm BL21 (siehe Abschnitt 2.1.1) wurde die Expression wie in Abschnitt 2.6.9 beschrieben durch Zugabe von IPTG induziert. Der Erfolg der Induktion wurde durch Immunodetektion mit Hilfe eines gegen den GST-Anteil des Fusionsproteins gerichteten Antikörpers in einer Western-Analyse (siehe Abschnitt 2.5.6) überprüft. Teilabbildung A in Abbildung 3.9 gibt einen Westernblot mit je 10 µg Gesamtprotein der löslichen Fraktion vor und nach einer dreistündigen Induktion bei 30°C wieder und zeigt nur für induzierte Zellen eine Bandenleiter, die in Höhe der erwarteten Fusionsproteingröße

von 70 kD beginnend herunter bis zur Größe des GST-Anteils alleine (26 kD) reicht. Somit wurde des Fusionsprotein sowohl vollständig als auch in Fragmenten exprimiert.

Da eine weitere Optimierung der Expression in Bezug auf den Anteil vollständigen Fusionsproteins nicht möglich war, wurde es wie in Abschnitt 2.6.9 beschrieben über eine Glutathion-Agarose-Säule durch Affinitätschromatographie angereichert und aufgereinigt. Parallel wurde unter Verwendung des Vektors pGEX-4T-2 ohne Insert der GST-Anteil alleine exprimiert und aufgereinigt. Teilabbildung B in Abbildung 3.9 zeigt ein Coomassie-gefärbtes SDS-Gel (siehe Abschnitte 2.5.3 und 2.5.4), in dem 5 und 10  $\mu\text{g}$  der Fusionsproteinpräparation R18-GST sowie je 5  $\mu\text{g}$  der GST-Präparation (26 kD) bzw. Rinderserumalbumin (BSA, 66 kD) aufgetrennt wurden. Dem Westernblot in Teilabbildung 3.9 A entsprechend ist für die GST-Präparation eine Banden-Leiter zu erkennen, die etwas oberhalb der BSA entsprechenden Proteingröße von 66 kD beginnend hinunterreicht bis 26 kD, der Proteingröße des GST-Anteils alleine. Die aus der Affinitätschromatographie mit Glutathion-Agarose hervorgegangene R18-GST-Fusionsprotein Präparation bestand also aus vollständigen Molekülen und aus Fragmenten davon.

Die R18-GST Fusionsprotein Präparation wurde zunächst für einen Gelverzögerungsassay mit dem Pentamer A19 als EMSA-Sonde verwendet, um die in Hefe beobachtete Interaktion zu bestätigen. Dazu reagierten wie in Abschnitt 2.6.3 beschrieben 1.25, 2.5 und 5  $\mu\text{g}$  der R18-GST Fusionsprotein Präparation sowie 10  $\mu\text{g}$  der GST-Präparation mit 10.000 cpm des Pentamers A19 als EMSA-Sonde in Gegenwart von 200 ng pdAdT. Die Autoradiographie des Geles nach der Auftrennung ist in Teilabbildung C wiedergegeben. Während die freie Probe und 10  $\mu\text{g}$  der GST-Präparation keine Gelverzögerung hervorrufen, bewirkt eine zunehmende Menge der R18-GST-Präparation eine zunehmend stärkere Gelverzögerung. Das in *Escherichia coli* exprimierte cDNA-Insert des Klonen R18 bindet also *in vitro* an das Pentamer A19.

Zur Überprüfung der Interaktion des R18-GST Fusionsproteins mit dem nativen Promotorfragment 3.5 wurde ein Gelverzögerungsassay mit dem Promotorfragment 3.5 als EMSA-Sonde und je 2.5  $\mu\text{g}$  der R18-GST Fusionsprotein Präparation in Gegenwart und Abwesenheit eines 160fachen Überschusses an nicht radioaktiv markierter EMSA-Sonde als Kompetitor um Bindungsstellen durchgeführt. Dazu reagierte das R18-GST Fusionsprotein in Gegenwart von 1  $\mu\text{g}$  pdAdT wie in Abschnitt 2.6.3 beschrieben mit der EMSA-Sonde. Teilabbildung D in Abbildung 3.9 zeigt die Autoradiographie des Geles nach der Auftrennung. Das R18-GST Fusionsprotein führt mit Promotorfragment 3.5 zu einem deutlichen Verzögerungssignal. Das Verzögerungssignal besteht aus einem oberen, einem mittleren

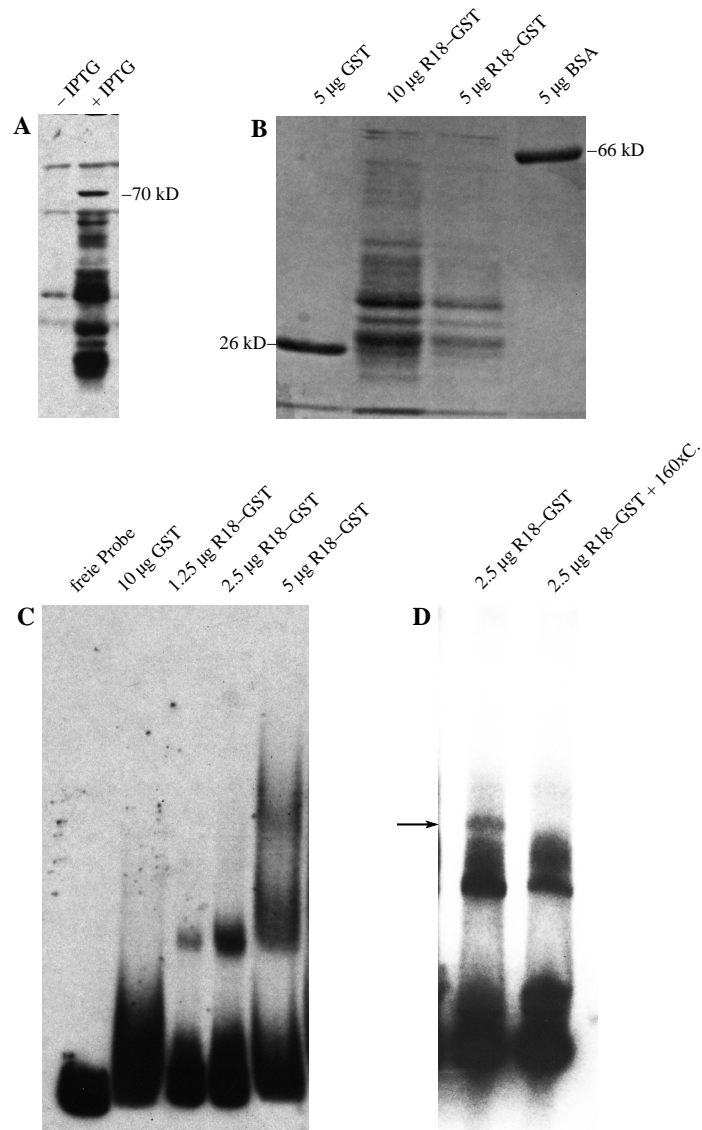


Abbildung 3.9: Expression und Aufreinigung eines in *Escherichia coli* exprimierten R18-GST Fusionsproteines und seine Verwendung in Gelverzögerungsassays. A Westernblot mit löslichen Proteinen aus induzierten (+IPTG) und nicht-induzierten (-IPTG) Zellen des *E. coli* Stammes BL21. B Coomassie-gefärbtes SDS-Gel. C Gelverzögerungsassay mit Pentamer A19 als EMSA-Sonde. D Gelverzögerungsassay mit dem nativen Promoterfragment 3.5 als EMSA-Sonde und Kompetitor.

und einem unteren Teil. Der obere Teil verschwindet in Gegenwart eines 160fachen Überschusses an nicht radioaktiv markierter EMSA-Sonde 3.5 ganz, der mittlere und untere Teil werden abgeschwächt. Somit ist die Bindung des R18-GST Fusionsproteins an das native Promotorfragment 3.5 als EMSA-Sonde zum Teil kompetierbar.

Somit bindet das in *Escherichia coli* exprimierte R18-GST Fusionsprotein *in vitro* sowohl an das Pentamer A19 als auch an das native Promotorfragment 3.5 und bestätigt den in Hefe gewonnenen Befund. Die Bindung des R18-GST Fusionsproteins an das native Promotorfragment 3.5 als EMSA-Sonde ist zum Teil kompetierbar.

### 3.3.3 Das R18-GFP Fusionsprotein ist kernlokalisiert

Um zu untersuchen, ob es sich bei R18 um ein kernlokalisiertes Protein handelt, sollte ein Fusionsprotein des cDNA-Inserts von Klon R18 mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) in Tabakprotoplasten exprimiert werden. Dazu wurde ein 900 bp großes R18-Fragment mit Hilfe der Primer R18-NcoI-5' und R18-NcoI-3' (siehe Anhang 6.2 zur Sequenz und Abbildung 3.7 Teil E zur Lage der Primer in der R18 cDNA-Sequenz) mit NcoI-Schnittstellen an beiden Enden durch PCR amplifiziert und in den Vektor pCK-GFP-S65C [92] kloniert. Hierbei entstanden die Vektoren pGFP-R18 und pGFP-antisenseR18; letzterer diente als Kontrolle im folgenden Experiment.

Tabakprotoplasten wurden wie unter 2.4.2 beschrieben hergestellt, mit pGFP-R18 und pGFP-antisenseR18 transfiziert (siehe Abschnitt 2.4.3) und auf Expression des Fusionsproteins unter dem Lichtmikroskop untersucht (siehe Abschnitt 2.6.10). Abbildung 3.10 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung. Die Teilabbildungen A und B zeigen einen Protoplasten der mit pGFP-R18 transfiziert worden ist, links mit einem Filter fotografiert, der nur grünes Licht durchläßt, rechts mit einem Filter, der rotes und grünes Licht passieren läßt. Die grüne Fluoreszenz konzentriert sich ausschließlich auf den Bereich des Zellkerns. Demgegenüber ist für den mit pGFP-antisenseR18 transfizierten Protoplasten, der in den Teilabbildungen C (grünes Licht) und D (rotes und grünes Licht) dargestellt ist, die grüne Fluoreszenz über das gesamte Cytoplasma verteilt. Somit enthält die von R18 kodierte Proteinsequenz Kernlokalisierungssignale, die den Transport des R18-GFP Fusionsproteins in den Nukleus bewirken.

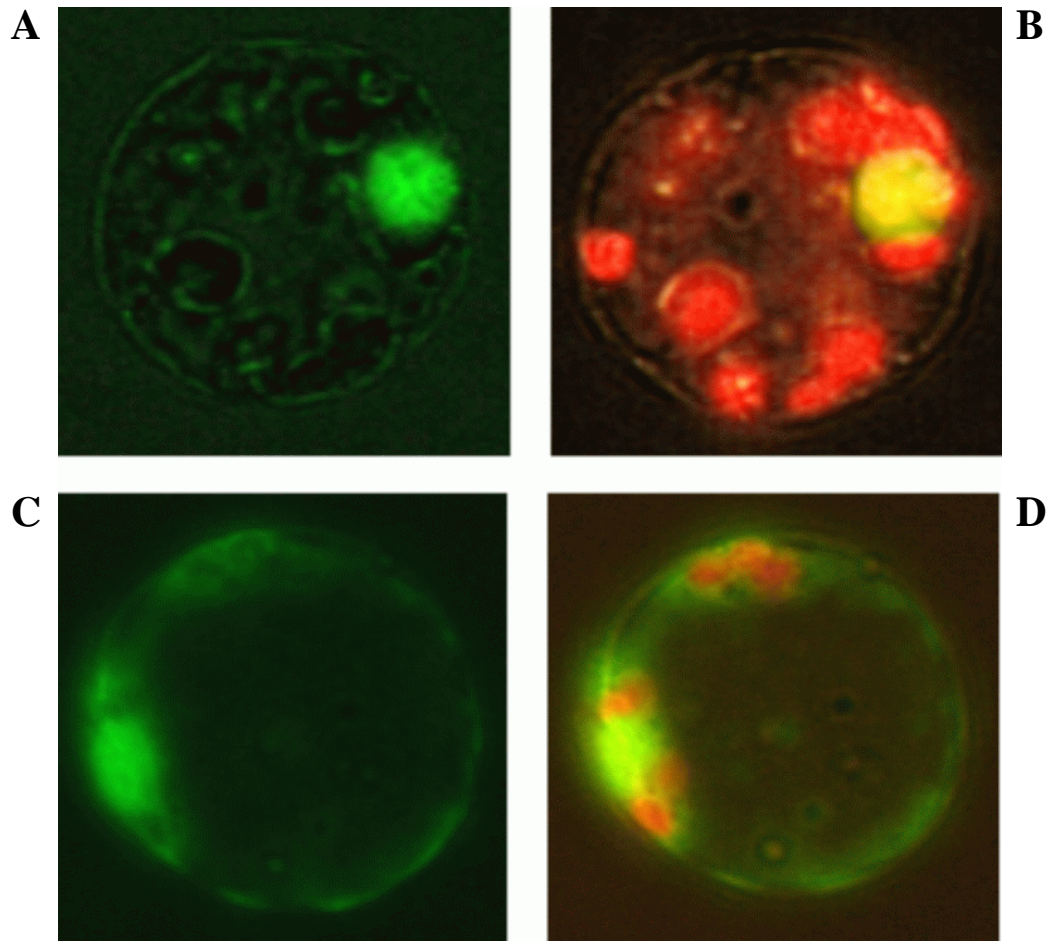


Abbildung 3.10: Expression eines R18-GFP Fusionsproteins in Tabakprotoplasten. A und B: mit R18-GFP transfizierter Protoplast. C und D: mit R18antisense-GFP transfizierter Protoplast.



### 3.3.4 Das cDNA-Insert des Klons R18 hybridisiert nur mit wenigen Genomfragmenten

Um Aufschluß über die Häufigkeit des vom cDNA-Fragment R18 vertretenen Gens im Genom von *Craterostigma plantagineum* zu erlangen, wurde eine Southern Analyse durchgeführt (vergleiche Abschnitt 2.6.3). Je 10  $\mu\text{g}$  genomischer *Craterostigma* DNA wurden dazu mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI bzw. HindIII geschnitten, in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf einem Nylonfilter fixiert. Teilabbildung A in Abbildung 3.11 zeigt die Autoradiographie dieses Filters nach Hybridisierung mit dem cDNA-Insert des Klones R18. Schnitt mit EcoRI ergibt ein stärkeres Signal bei 6 kB und ein schwächeres bei 5 kB. Schnitt mit HindIII ergibt je ein Signal bei 7, 4 und 3 kB. R18 vertritt also ein Gen, das in einer oder in wenigen Kopien im Genom vorliegt.

### 3.3.5 Isolierung und Sequenzierung genomischer R18-Klone

Da die Isolation eines vollständigen R18-cDNA-Klones aus einer  $\lambda$ -ZAP-Bibliothek von 2 Tage ABA behandeltem Callus [33] aufgrund seiner schwachen Expression nicht möglich war und auch ein 5'-RACE-Versuch nicht erfolgreich war, sollten die entsprechenden genomische Klone aus einer genomischen *Craterostigma*-DNA-Bibliothek [111] isoliert werden.

Nach Plaquehybridisierung von 200.000 pfu (siehe Abschnitt 2.6.12) konnten 10  $\lambda$ -Klone isoliert werden, die mit der R18-cDNA hybridisierten. Die DNA dieser Klone wurde isoliert (siehe Abschnitt 2.6.1), mit den Restriktionsendonukleasen XbaI, EcoRI und AseI geschnitten und nach einer Gelelektrophorese auf eine Hybond-Membran transferiert. Nach Hybridisierung mit der R18-cDNA zeigte es sich, daß die 10 Klone zwei Gruppen darstellten, von denen die eine achtmal und die andere zweimal vertreten war. Bei der Gruppe mit acht Vertretern zeigt die Autoradiographie ein EcoRI-Fragment von 6 kB, bei der Gruppe mit zwei Vertretern wird ein EcoRI-Fragment von 5 kB markiert. Die Autoradiographie eines Southern Blotts (siehe Abschnitt 2.6.3) mit EcoRI geschnittener Phagen-DNA je eines Vertreters der beiden Gruppen mit der R18-cDNA ist in Abbildung 3.11 B wiedergegeben.

Die EcoRI-Fragmente je eines Vertreters der beiden Gruppen, gc3A (6 kB) und gc19 (5kB), wurden isoliert und in den Vektor pBluescript kloniert. Um zu erfahren, wo sich innerhalb der 5 bzw. 6 kB großen Fragmente die bekannte Sequenz des cDNA-Fragmentes R18 befindet, wurde eine PCR-Analyse mit den R18-spezifischen Primern R18-I (an den Basen 56-76 auswärts gerichtet anset-

zend, vergleiche Abbildung 3.12) und R18-II (an den Basen 120-140 auswärts gerichtet ansetzend, vergleiche Abbildung 3.12) gegen den an die *multiple cloning site* flankierende pBluescript-Sequenzen bindenden Universe-Primer durchgeführt (Primer-Sequenzen s. Anhang 6.2). Die Ergebnisse dieser PCR-Analyse sind in Teil C der Abbildung 3.11 dargestellt. Für gc3A ergaben sich PCR-Produkte von 4 (R18-I) bzw. 4.1 kB (R18-II), für gc19 zeigten sich Banden bei 3 (R18-I) bzw. 3.1 kB (R18-II). Daraus ergibt sich, daß 5' von der bekannten Sequenz der R18-cDNA 4 kB (gc3A) bzw. im Falle von gc19 3 kB liegen.

Da somit der bekannte cDNA-Abschnitt am 3'-Ende innerhalb der isolierten EcoRI-Genomfragmente enthalten war, wurden die beiden genomischen Klone gc3A und gc19 mit Hilfe der Primer R18-I, R18-III, R18-IV, R18-VII sowie R18-NcoI-5' (Sequenzen siehe Anhang 6.2, Positionen siehe Abbildung 3.12) sequenziert. Abbildung 3.12 gibt die beiden so gewonnenen genomischen Nukleotid-Sequenzen in Gegenüberstellung mit der entsprechenden Sequenz des cDNA-Inserts des Klons R18 wieder. Abbildung 3.13 zeigt den Vergleich der translatierten cDNA-Sequenz mit den translatierten Exons der beiden genomischen Klone.

Die Nukleotidsequenz der R18-cDNA verteilt sich bei beiden genomischen Klonen auf 9 Exons und ist zu 99 % identisch mit der Sequenz des genomischen Klons gc19 (13 unterschiedliche Positionen von 1298). Translation der Exons des genomischen Klons gc19 führt zu einer Peptidsequenz, die sich an 8 von 385 Positionen vom Translationsprodukt der R18-cDNA unterscheidet und somit zu 98 % identisch ist. Die 9 Exons des genomischen Klons gc3A unterscheiden sich auf Nukleotidebene in 51 Positionen (entspricht einer Identität von 96 %) und auf Aminosäureebene in 23 Positionen (entspricht einer Identität von 94 %) von der Sequenz der R18-cDNA bzw. ihres Translationsproduktes.

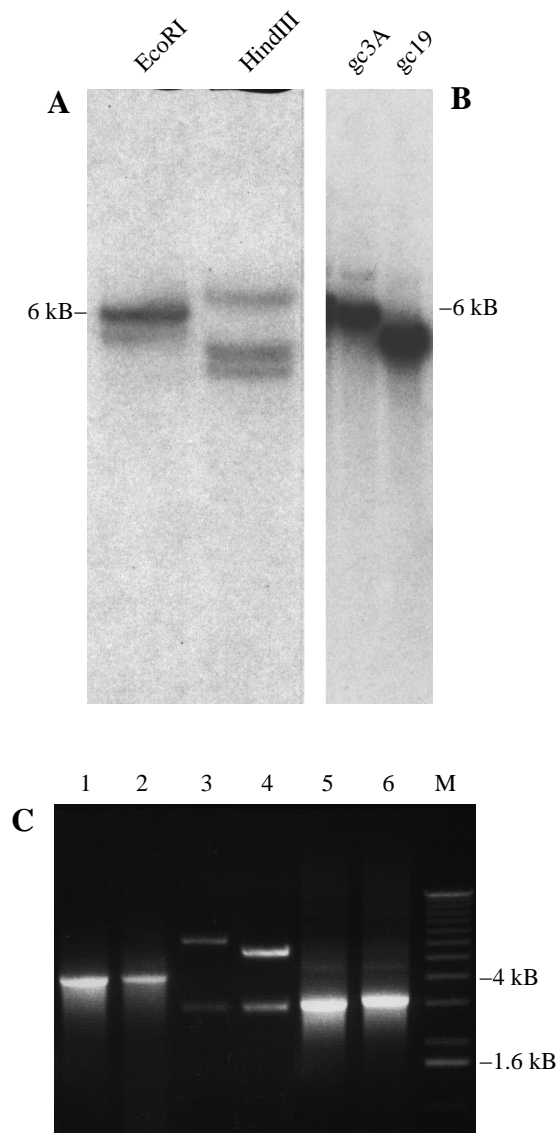


Abbildung 3.11: Southern-Analyse zur Bestimmung der Häufigkeit der von Klon R18 vertretenen Gene und Isolation der genomischer R18-Klone. A Southernblot mit je 10  $\mu\text{g}$  genomischer DNA aus *Craterostigma plantagineum*. B Southernblot mit EcoRI geschnittener DNA der Phagenklone gc3A und gc19. C PCR-Analyse zur Lokalisierung der cDNA-Sequenz innerhalb der genomischen Klone gc3A und gc19. Spuren 1-3 gc3A, Spuren 4-6 gc19. Spuren 1 und 4 Primer R18-I gegen universe, Spuren 2 und 6 Primer R18-II gegen universe, Spuren 3 Plasmid pBluescript mit EcoRI-Fragment gc3A, Spur 4 Plasmid pBluescript mit EcoRI-Fragment gc19.

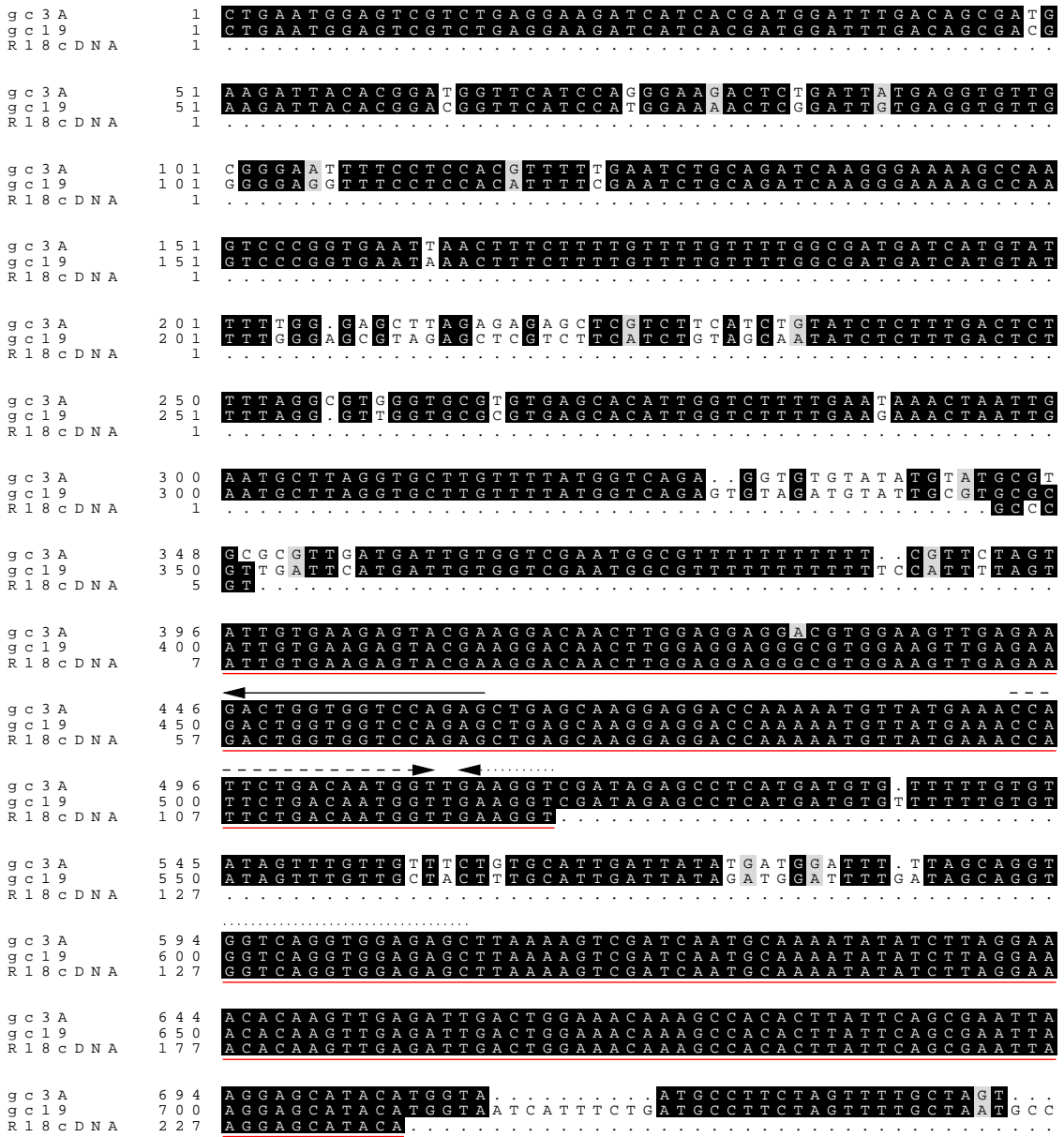


Abbildung 3.12: Vergleich der Nukleotidsequenzen der genomischen Klone gc3A und gc19 mit dem cDNA-Klon R18. Exons sind durch rote Unterstreichung hervorgehoben. Die zur Sequenzierung verwendeten Primer sind als Pfeile eingezeichnet: R18-I durchgezogene Linie, R18-NcoI-5' gestrichelte Linie, R18-II gepunktete Linie, R18-VII als Strich-Punkt-Linie und R18-NcoI-3' als Strich-Punkt-Punkt-Linie.

Fortsetzung des Vergleichs der Nukleotidsequenzen der genomischen Klone gc3A und gc19 mit dem cDNA-Klon R18

gc3A	731	...AAACA AAAAAGATCGGTGTGTTAGTTTC ACTGATTGCTGATACTTCACTTG
gc19	750	AAA AAAA AAAAAGATGGTGTGTTAGTTTC ACTGATTGCTGATACTTCACTTG
R18 cDNA	238	...AAA AAAA AAAAAGATGGTGTGTTAGTTTC ACTGATTGCTGATACTTCACTTG
gc3A	778	ATAATCA TTTTCAGCATTTGTC AATGGTGGCGGGGAAAAAGAAAGTATCCAGTGTG
gc19	800	ATAATCA TTTTCAGCATTTGTC AATGGTGGCGGGGAAAAAGAAAGTATCCAGTGTG
R18 cDNA	238	...TTG CATTTGTC AATGGTGGCGGGGAAAAAGAAAGTATCCAGTGTG
gc3A	828	TCTAGTTT TGTGCTGAATTGCAAGAGGTTAGTGTATGATA TTTTATTTGAACA
gc19	849	TCTAGTTT TGTGCTGAATTGCAAGAGGTTAGTGTATGATA TTTTATTTGAACA
R18 cDNA	277	TCTAGTTT TGTGCTGAATTGCAAAA
gc3A	878	TGATTTGT TAAAAAATTC AATGTTGGTTCGTTATGGCCTTTCGTTTGTGT
gc19	899	TGATTTGT TAAAAAATTC AATGTTGGTTCGTTATGGCCTTTCGTTTGTGT
R18 cDNA	301	...TTCGTTTGTGT
gc3A	928	AAAGCGAGAACTGATTTCTGAAACAACCAAGGTCATTTGTTTGAAGATTCCTG
gc19	949	AAAGCGAGAACTGATTTCTGAAACAACCAAGGTCATTTGTTTGAAGATTCCTG
R18 cDNA	301	...GTTGATGTCATGGCCTGGGATGTAGTCAAT
gc3A	978	CCCTGAAAT CAAAATCATGCAGGTGATGCATGCTGGGGGATGTAGTCAAT
gc19	999	CCCTGAAAT CAAAATCATGCAGGTGATGCATGCTGGGGGATGTAGTCAAT
R18 cDNA	301	...GGTGA TGTCATGGCCTGGGGATGTAGTCAAT
gc3A	1027	GTTTCGAAC AAAACGTTATATGA AATGTAAGCCTTTGTCGAC CCCCCTGTCAAAG
gc19	1049	GTTTCGAAC AAAACGTTATATGA AATGTAAGCCTTTGTCGAC CCCCCTGTCAAAG
R18 cDNA	330	GTTTCGAAC AAAACGTTATATGA AATGTAAGCCTTTGTCGAC CCCCCTGTCAAAG
gc3A	1077	ATCATTGT TTTTCTTTTCA GTTTTCACCAATATCAGTCTATGCTTTAGCATTTC A
gc19	1099	ATCATTGT TTTTCTTTTCA GTTTTCACCAATATCAGTCTATGCTTTAGCATTTC A
R18 cDNA	355	...TTTTCATTTC A
gc3A	1127	CTGTGA GCACTTGATCTG TAGTCTACCAATGATA AAAAATTTAAACA GTTGT TTA
gc19	1149	CTGTGA GCACTTGATCTG TAGTCTACCAATGATA AAAAATTTAAACA GTTGT TTA
R18 cDNA	355	...CTGTGA GCACTTGATCTG TAGTCTACCAATGATA AAAAATTTAAACA GTTGT TTA
gc3A	1177	TGTATATGTATCTG AACTTGCTTCAAGCTCAGAGCACTATATTTCCAGTTAGTCT
gc19	1197	TGTATATGTATCTG AACTTGCTTCAAGCTCAGAGCACTATATTTCCAGTTAGTCT
R18 cDNA	355	...TATATTTCCAGTTAGTCT
gc3A	1227	TCTATTCTTTAGAGAGATGACTTTACACAAGACTCTTCAATGCTTCCAGGTTA
gc19	1246	TCTATTCTTTAGAGAGATGACTTTACACAAGACTCTTCAATGCTTCCAGGTTA
R18 cDNA	355	...TTTCCAGGTTA
gc3A	1277	TAAATTTGGCATCTCTGCTAGTGCCTACTGGTCCCCCTTGTGGCAAAAAGGTTTG
gc19	1296	TAAATTTGGCATCTCTGCTAGTGCCTACTGGTCCCCCTTGTGGCAAAAAGGTTTG
R18 cDNA	357	TAAATTTGGCATCTCTGCTAGTGCCTACTGGTCCCCCTTGTGGCAAAAAGGTTTG
gc3A	1327	TTGCAGGC CGTATCATCAAGGC AAGCTTTGGAGCAGCC AAGCAACAACA
gc19	1346	TTGCAGGC CGTATCATCAAGGC AAGCTTTGGAGCAGCC AAGCCACAACAACA
R18 cDNA	407	TTGCAGGC CGTATCATCAAGGC AAGCTTTGGAGCAGCC AAGCCACAACAACA
gc3A	1376	TACATTTTACG GGTGAGATGAGACGTTAAACCACATGCTCAGATTGACCTTTCAAA
gc19	1396	TACATTTTACG GGTGAGATGAGACGTTAAACCACATGCTCAGATTGACCTTTCAAA
R18 cDNA	456	TACATTTTACG GGTGAGATGAGACGTTAAACCACATGCTCAGATTGACCTTTCAAA
gc3A	1426	CATGAAT AA TGAACATCAAATTAATCGAGA AAAAGCC CAGTTTCTATAAAA
gc19	1446	CATGAAT AA TGAACATCAAATTAATCGAGA AAAAGCC CAGTTTCTATAAAA
R18 cDNA	466	...TGAACATCAAATTAATCGAGA AAAAGCC CAGTTTCTATAAAA
gc3A	1475	GTAGTCTAACATTTGTTTGA AATGACTTGTGATATGTTTCTATTTATGGG
gc19	1496	GTAGTCTAACATTTGTTTGA AATGACTTGTGATATGTTTCTATTTATGGG
R18 cDNA	466	...GATATGTTTCTATTTATGGG
gc3A	1525	CTTGTTGTCTCATGCAGATTGAAAGTCTATGGAGCAAAGGTTGAGAAAGCCA
gc19	1546	CTTGTTGTCTCATGCAGATTGAAAGTCTATGGAGCAAAGGTTGAGAAAGCCA
R18 cDNA	466	...ATGAAAGTCTATGGAGCAAAGGTTGAGAAAGCCA
gc3A	1575	TTGCCCTCCGCTTTCACCCCTTTGCTTATTTAAAGGCAGGAATCTATACAAGTT
gc19	1596	TTGCCCTCCGCTTTCACCCCTTTGCTTATTTAAAGGCAGGAATCTATACAAGTT
R18 cDNA	499	TTGCCCTCCGCTTTCACCCCTTTGCTTATTTAAAGGCAGGAATCTATACAAGTT
gc3A	1625	AAAGACATTTGAGGCAGGTTGTTGCTCTTGTCTGATCTTTCTTCATTTCAACC A
gc19	1646	AAAGACATTTGAGGCAGGTTGTTGCTCTTGTCTGATCTTTCTTCATTTCAACC A
R18 cDNA	549	AAAGACATTTGAGG
gc3A	1675	GCTATATA CTGATATATA ATCTTCTAGTCTTCTTTGCCCAATCTATTCAGAAATG
gc19	1696	GCTATATA CTGATATATA ATCTTCTAGTCTTCTTTGCCCAATCTATTCAGAAATG
R18 cDNA	562	...CTTTGCCCAATCTATTCAGAAATG

Fortsetzung des Vergleichs der Nukleotidsequenzen der genomischen Klone gc3A und gc19 mit dem cDNA-Klon R18

gc 3 A	1 7 2 4	G G A A G A T G A A G G C G A A A G G G A G A A G A T T T T A T T A G A A A A G C A T T C T A G A G
gc 1 9	1 7 4 6	G G A A G A T G A A G G C G A A A G G G A G A A G A T T T T A T T A G A A A A G C A T T C T A G A G
R 1 8 c D N A	5 7 0	G G A A G A T G A A G G C G A A A G G G A G A A G A T T T T A T T A G A A A A G C A T T C T A G A G
gc 3 A	1 7 7 4	G C G A C C T C G C A C G T T G T C A C A G G G A A G C A C G C A T A G A G C G A A G G G A A A T G
gc 1 9	1 7 9 6	G T G A T C T A G C A C G T T G T C A C A G G G A C G C A C G C A T A G A G C G A A G G G A A A T G
R 1 8 c D N A	6 2 0	G T G A C G T A G C A C G T T G T C A C A G G G A C G C A C G C A T A G A G C G A A G G G A A A T G
gc 3 A	1 8 2 4	C G . . . . G A A G G C G A T A A A T G C A G A A G C A A A T A G G T A A A G A A A A G C A A C T C A
gc 1 9	1 8 4 6	C G A A A A A A G G C G A T A A A T G C A G A A G C A A A T A G G T A A A G A A A A G G T A A C T C G
R 1 8 c D N A	6 7 0	C G A A A A A A A G C G A T A A A T G C A G A A G C A A A T . . . . .
gc 3 A	1 8 7 1	C T T C A C A T T C A C A G T T T T C T G C C A A G C T A C A A A G A T A T T T G C T G C T C A A C
gc 1 9	1 8 9 6	C T T C A C A T T C A C A T A T T T T T T G C C A A T C T A C A A A G A T A T T T G C T G C T C A A C
R 1 8 c D N A	7 0 0	. . . . .
gc 3 A	1 9 2 1	A T A T T T C A G G G G A A C T A G G A A A C A A A C A A C G G G C C A T T C A T T C C A C A A
gc 1 9	1 9 4 6	A T A T T T C A G G G G A A C T A G G A A A C A A A C A A C G G G C C A T T C A T T C C A C A A
R 1 8 c D N A	7 0 0	. . . . . A G G G G A A C C A G G A A A C A A A C A A C G G G C C A T T C A T T C C A C A A
gc 3 A	1 9 7 1	A T C A T G A G A A G C G A A T T A G C G G A T C T G T A A A G C A G A A G G A T C T C A T A A C T
gc 1 9	1 9 9 6	A T C A T G A G A A G C G A A T T A G C A G A T C T G T A A A G C A G A A G G A T C T C A T A A C G
R 1 8 c D N A	7 4 3	A T C A T G A G A A G C G A A T T A G C G G A T C T G T A A A G C A G A A G G A T C T C A T A A C G
gc 3 A	2 0 2 1	G A C T T G G A T G A T A C A A A G T T T T C G C C A C G A G A A A C A G A A C T A T C A C G A A G C
gc 1 9	2 0 4 6	G A C T T G G A T G A T A C A A A G T T T T C A C C A C G A G A A A C A G A A C T A T C C C G G A G C
R 1 8 c D N A	7 9 3	G A C T T G G A T G A T A C A A A G T T T T C A C C A C A A G A A A C A G A A C T A T C C C G G A G C
gc 3 A	2 0 7 1	T A G T G G A T C A A C T C G G G A A T C A G G G A A C C A T T A T A G C C G C C A C C C
gc 1 9	2 0 9 6	T A G T G G A T C A A C T C G G G A A T C A G G G A A C C A T T A T A G C C A C C A C C C
R 1 8 c D N A	8 4 3	T A G T G G A T C A A C T C G G G A A T C A G G G A A C C A T T A T A G C C A C C A C C C
gc 3 A	2 1 1 6	A T T G G T A T C T C A A G C A C C A T T T T G C C . . . . . T A G G A T G A A T T A C C G
gc 1 9	2 1 4 1	A T T G G T A T C T C A A A C G C C A T T T T G C C G C C A T T T G T T A G G A T T A A T A G C T G
R 1 8 c D N A	8 8 8	A T T G G T A T C C C A A G C A C C A T T T T G C C G C C A T T T G T T A G G A T T A A T A G C T G
gc 3 A	2 1 5 7	T G G C T T T G A C C G T A G C T T C C A G C C A A C T A G T T T G A G C A A C A T C A A T A T G A
gc 1 9	2 1 9 1	T G G C T T T G A C C G T A G C T T C C A G C C A A C T A G T T T G A G C A A C A T C A A C A T G A
R 1 8 c D N A	9 3 8	T G G C T T T G A C C G T A G C T T C C A G C C A A C T A G T T T G A G C A A C A T C A A C A T G A
gc 3 A	2 2 0 7	G T A G G A C G A A C T T T T T A C A T C A T C G T G T T C A T C C A G A G A T C A G A G A C A A
gc 1 9	2 2 4 1	G T A G G A C G A A C T T T T T A C A T C A T C G T G T T C A T C C A G A G A T C A G A G A C A A
R 1 8 c D N A	9 8 8	G T A G G A C G A A C T T T T T A C A T C A T C T T G T T C A T C C A G A G A T C A G A G A C A A
gc 3 A	2 2 5 7	C A T G T T C A A T C C C G G G A C T A C A T T G C G A A A T C A G A T T T G C A G G T A T T A T G C
gc 1 9	2 2 9 1	C A T G T T C A A T C C C G G G A T T A C G T G C G A A A T C A G A T T T G C A G G T A T T A T G C
R 1 8 c D N A	1 0 3 8	C A T G T T C A A T G C C G G G A T T A C G T G C G A A A T C A G A T T T G C A G G T A T T A T G C
gc 3 A	2 3 0 7	T C G A G G A C G G T G T C A T T T C G G A G A C A G G T G C A A G T A T T T T G C A T G A A C T T C
gc 1 9	2 3 4 1	T C A A G G A C G G T G T C A T T T C G G A G A T A G G T G C A A G T A T T T G C A T G A A C T T C
R 1 8 c D N A	1 0 8 8	T C A A G G C C G G T G T C A T T T C G G A G A T A G G T G C A A G T A T T T G C A T G A A C T T C
gc 3 A	2 3 5 7	C T G T A G A A T A T G A T T A A T C G C A . T C T T A C C C A A T T C C G C T C C T T T A G C A A
gc 1 9	2 3 9 1	C T G T A G A A T A T G A T T A A T C G C A T T A T C A C C A A T A T T G C A A G A T T T T G A T T
R 1 8 c D N A	1 1 3 8	C T G T A G A A T A T G A T T A A T C G C A T T A T C A C C A A T A T T G C A A G A T T T T G A T T
gc 3 A	2 4 0 6	T A C C C G T A T A C T T A C T A C T G . . . . . A A T A T T T A T G T A A T T T G A T A T C T
gc 1 9	2 4 4 1	G A C T T G G T C C C T T C C T T T G G C A A T A C C C A T A T A C T T G C T A C T G A A T A T T T
R 1 8 c D N A	1 1 8 8	G A C T T G G T C C C T T C C T T T G G C A A T A C C C A T A T A C T T G C T A C T G A A T A T T T
gc 3 A	2 4 4 9	G T . . . . . T T T C A A A A T T T T T T T A G C T T G T C T T A C A T C C A T C A C A G C C A T
gc 1 9	2 4 9 1	G T A T A T T T G T T T C A A A T T T T T T T A G C T T G T C A T A C A T C T A T C A T A C C A A T
R 1 8 c D N A	1 2 3 8	G T A T A T T T G T T T C A A A T T T T T T T A G C T T G T C A T A C A T C T A T C A A A A A A A
gc 3 A	2 4 9 2	A A C T A A G G T T A A A T T T . . . C A G A G A G A A A G A G C G A T G A A A G T C T A T G A A C T
gc 1 9	2 5 4 1	A A C T A A G G T T A A A T T T C A G A G A G A G A G A G C G A T G A A A G T C T A T G A A C T
R 1 8 c D N A	1 2 8 8	A A A A A A A . . . . . C A G A G A G A G A G A G C G A T G A A A G T C T A T G A A C T
gc 3 A	2 5 4 0	T T T G A C A A G T A A A A C T T C G A T G G C T T T T C A T T T A A G G C G T G T G T A A A G A
gc 1 9	2 5 9 1	T T T G G G A A G T A A A A C T T . . . . .
R 1 8 c D N A		. . . . .
gc 3 A	2 5 9 0	G T C G A A C G
gc 1 9	2 6 0 8	. . . . . G A T G
R 1 8 c D N A		. . . . .

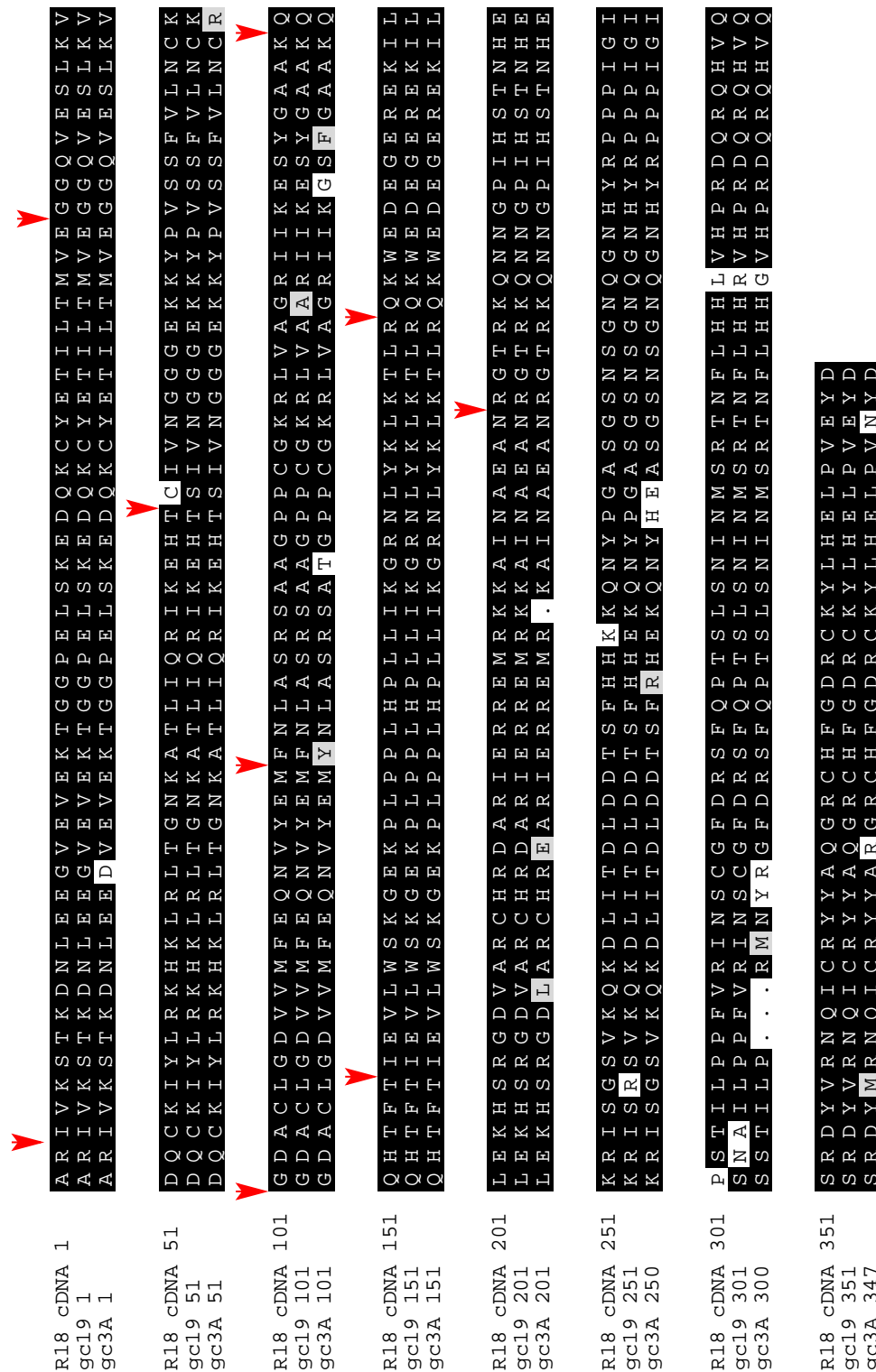


Abbildung 3.13: Vergleich der Aminosäuresequenzen der translatierten Exons der genomischen R18-Klone gc3A und gc19 mit der translatierten R18-cDNA. Die Exongrenzen sind durch rote Pfeilspitzen hervorgehoben.

Konstrukt/Behandlung	% GUS-Aktivität	s.d. (n = 4)
pRT-R18	203	57
pRT + ABA	170	52
pRT-R18 + ABA	482	260
pRT-antiR18 + ABA	364	150

Tabelle 3.4: GUS-Aktivitäten mit pRT, pRT-R18 oder pRT-antiR18 transfizierter Tabakprotoplasten, ausgedrückt in Prozent gegenüber der als 100 gesetzten Aktivität bei transienter Expression von pRT-antiR18 ohne ABA.

### 3.3.6 Untersuchung der Interaktion eines GUS-Reportergenkonstruktes mit cDNA-Klon R18 durch transiente Expression in Tabak-Protoplasten

Um die Wechselwirkung zwischen cDNA-Klon R18 und dem Promoter des Leagens CDeT27-45 *in planta* zu untersuchen, sollte R18 in Tabak-Protoplasten transient exprimiert werden und die Aktivierung eines Reportergenkonstrukts aus dem CDeT27-45 Promoter und dem  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) Gen gemessen werden. Dazu wurde das bereits beschriebene NcoI-Fragment der R18-cDNA (siehe Abschnitt 3.3.3 und Abbildung 3.7 Teil E) in die NcoI-Schnittstelle des Vektors pRT104 [114] kloniert. Hieraus entstanden die beiden Plasmide pRT-R18 (5'  $\rightarrow$  3' R18-cDNA gleichorientiert wie 5' pRT-Promoter  $\rightarrow$  3' pRT-Terminationssequenz) und pRT-antiR18 (5'  $\rightarrow$  3' R18-cDNA nicht gleichorientiert wie 5' pRT-Promoter  $\rightarrow$  3' pRT-Terminationssequenz). pRT-antiR18 wurde im folgenden Experiment als Kontrolle verwendet. Als Reporterkonstrukt diente das Plasmid p27-45GUS, welches den Promoter des CDeT27-45 Gens fusioniert an das  $\beta$ -Glucuronidase Gen enthält [81].

Tabakprotoplasten wurden wie unter 2.4.2 beschrieben hergestellt und mit dem Plasmid p27-45GUS sowie entweder pRT-R18, pRT-antiR18 oder pRT ohne Insert transfiziert. Die Inkubation der Protoplasten erfolgte mit und ohne ABA. Anschließend wurden die Protoplasten geerntet und die GUS-Aktivitäten gemessen (siehe Abschnitt 2.6.11). Die Ergebnisse der Messungen von vier unabhängigen Experimenten sind in Tabelle 3.4 zusammengefaßt. Die Tabelle zeigt, daß die transiente Expression von pRT-R18 zu einer signifikant höheren GUS-Aktivität verglichen mit pRT-antiR18 führt. Die ABA-Inkubation von Protoplasten, die mit dem Vektor pRT transfiziert worden sind, zieht eine Erhöhung der GUS-Aktivität



nach sich, die unter Berücksichtigung der Standardabweichung in der Größenordnung der Erhöhung durch pRT-R18 liegt. Demgegenüber ist die zusätzliche Erhöhung des GUS-Spiegels bei Transfektion mit pRT-R18 und pRT-antiR18 in Gegenwart von ABA verglichen mit der Erhöhung bei Transfektion mit pRT in Gegenwart von ABA aufgrund der hohen Standardabweichungen statistisch nicht signifikant.

Somit führte die Kotransfektion von R18 mit einem Konstrukt aus dem CDeT27-45-Promotor fusioniert an das GUS-Reportergen in Tabakprotoplasten zu einer signifikanten Erhöhung der Expression des GUS-Reportergens, die in der Größenordnung der Erhöhung des GUS-Spiegels durch Inkubation mit ABA lag.

---

## 4. Diskussion

---

### 4.1 Isolierung des R18-Gens mit Hilfe des Hefe One-Hybrid Systems

Zur Identifizierung von Proteinen, die mit einer bestimmten DNA-Sequenz spezifisch interagieren, stehen Methoden wie South-Western Screening [25][55][95] oder Affinitätschromatographie [61][87] zur Verfügung, doch war der durch Wang und Reed [120] erstmals beschriebene One-Hybrid Versuch besonders erfolgreich. Dies belegt die Auswahl der in Tabelle 4.1 aufgelisteten veröffentlichten One-Hybrid Versuche. Oft wurden Befunde, die durch One Hybrid Versuche in Hefe gewonnen worden sind, durch andere Methoden bestätigt. So stellte sich etwa im Falle von *abi5* (ABA insensitive 5) nach Genisolierung durch *positional cloning* [37] heraus, daß das durch *knock out* Mutation in *Arabidopsis* bekannte Gen ein Homologes des durch einen One-Hybrid Versuch identifizierten *bzip*-Transkriptionsfaktors DPBP-1 [64] ist, der an den Promotor des LEA-Gens Dc3 bindet.

Vorteil des Hefe One Hybrid Ansatzes gegenüber Methoden wie South-Western Screening oder Affinitätschromatographie ist der Ablauf der Interaktion *in vivo* unter den Bedingungen, die in der lebenden Zelle herrschen. Begrenzt werden die Möglichkeiten des One-Hybrid Versuches systembedingt durch die Tatsache, daß sich nur Transelemente isolieren lassen, die für ihre Bindungsaktivität keiner andersartigen Partner bedürfen, seien es Proteine, Hormone oder andere Kofaktoren.

Zur Isolierung der von Nelson et al. 1994 [85] identifizierten Bindungsaktivität an das durch zwei AGCCC-Elemente charakterisierte Promoterfragment 3.5 des CDeT27-45 Gens bot sich daher vor dem Hintergrund der nicht erfolgreichen Identifizierungsversuche über South-Western Screening und Affinitätschromatographie [38] ein One-Hybrid Versuch an. Dieser wurde mit dem bereits mehrfach verwendeten Hefestamm YM954 und ausschließlich über die Aktivierung eines His3-Reporters durchgeführt. Dabei zeigte es sich, daß wie auch bei anderen One-Hybrid Screens nach der ersten Selektionsrunde eine in die hunderte gehende Anzahl von Hefekolonien entsteht. Auf der Basis der Sequenzhomologien zufällig ausgewählter Vertreter dieser Überlebenden nach der ersten Selektionsrunde (siehe Tabelle 3.2) scheint das Wachstum vieler Kolonien nicht auf einer *cis*-Element-spezifischen Aktivierung des Reportergenes durch das cDNA-Inserts des One-Hybrid Plasmids zu beruhen. Daher ist in den meisten Fällen eine Nachselektion notwendig; weil auf der einen Seite die zusätzliche Verwendung eines LacZ-Reporters die Anzahl der Klone in manchen Fällen nicht drastisch genug reduzieren konnte (z. B. bei Ulmasov et al. 1997 [115] 500 → 212 LacZ-Positive Klone) und andererseits die Nachselektion durch Retransformation der One-Hybrid Plasmide erfolgreich war (z. B. Inouye et al. 1994 [58]), wurden wiederholte Retransformationen gewählt, um echte Interaktionen von scheinbaren zu trennen. Im Hinblick auf die arbeitsintensive Trennung der One-Hybrid Plasmide von den Reporterplasmiden durch Selektion im auxotrophen *Escherichia coli* Stamm KC8 (siehe Abschnitte 2.1.1 und 3.2.3) kann die Verwendung von Reportern, die in das Hefegenom integriert werden (z. B. His3 oder LacZ in YM4271 Liu et al. 1998 [76] oder Rose et al. 1999 [94]) vorteilhaft sein, da in letzterem Fall nur ein einziges Plasmid in der Hefezelle vorhanden ist. Nach einer zweiten Selektionsrunde waren nur noch 18 One-Hybrid Plasmidpräparationen in der Lage, Wachstum von Reporterhefen auf selektivem Medium hervorzurufen (Klone R1 - R18, siehe Tabelle 3.3), und in einer dritten Runde nur noch das One-Hybrid Plasmid des Retransformanten R18.

Die Interaktion des vom cDNA-Insert des Klonen R18 kodierten Proteins mit dem eingesetzten *cis*-Element bestätigte sich in weiteren Experimenten. Zur Ausprägung des histidinautrophen Hefe-Phänotyps war das als DNA-Zielelement verwendete Pentamer A19 notwendig. Dies zeigte der Vergleich des Wachstums auf selektivem Medium von Hefen, die das His3-Reporterplasmid pSK1 mit und ohne das Pentamer A19 enthielten: nur die Kombination pPC86-R18 zusammen mit pSK1-A19 war in der Lage, einen histidinautrophen Phänotyp hervorzurufen (siehe Abschnitt 3.2.4). Diesem Befund entsprechend führte das als GST-Fusion in *Escherichia coli* exprimierte cDNA-Insert R18 zu einem Gelverzöge-

Autoren	Stamm	Reporter	cDNAs	tr. Zellen	Kolonien	beschrieben
Gstaiger et al. 1995 [47]	RH611E	His3/LacZ	?	?	10	1
Inouye et al. 1994 [58]	YM954	His3	$8 \times 10^5$	$2 \times 10^6$	140	1
Kim et al. 1997 [64]	YM954	His3/LacZ	$1.1 \times 10^6$	$25 \times 10^6$	247	ein Klon $2 \times$ , ein Klon $5 \times$
Lehming et al. 1994 [70]	NLY2	Ura3/LacZ	$2 \times 2 \times 10^6$	$2 \times 10^6$	?	1
Li und Herskowitz 1993 [73]	GGY2	LacZ	$1.2 \times 10^6$	?	49	9
Liu et al. 1998 [76]	YM4271	His3/LacZ	$3.5 \times 10^6$	?	203	7 Klone je $1 \times$ , $1$ Klon $35 \times$
Mak et al. 1996 [78]	YWAM2	His3	?	$1.9 \times 10^6$	3	1
Rose et al. 1999 [94]	YM4271	His3/LacZ	$1.5 \times 10^6$	?	115	1
Stockinger et al. 1997 [110]	GGY1	LacZ	?	$2 \times 10^6$	?	3
Strubin et al. 1995 [112]	KY320	His3	$2 \times 10^6$	$10^7$	55	3
Ulmasov et al. 1997 [115]	YM4271	His3/LacZ	?	$1.2 \times 10^8$	500	5
Wang und Reed 1993 [120]	YWAM2	His3	$3.6 \times 10^6$	$2 \times 10^6$	30	1
diese Arbeit	YM954	His3	$1.5 \times 10^6$	$27.5 \times 10^6$	309	1

Tabelle 4.1: Veröffentlichte One-Hybrid Versuche. Aufgeführt sind neben dem verwendeten Hefestamm und Reportergen der Umfang der eingesetzten cDNA-Bibliotheken im Hinblick auf primäre Klone (cDNAs) und die Anzahl der transformierten Hefezellen (tr. Zellen). Die Spalte «Kolonien» bezieht sich auf die Anzahl isolierter Klone nach der ersten Selektionsrunde, unter «beschrieben» sind die letztlich charakterisierten Klone aufgezählt. Fragezeichen sind zu den Punkten eingetragen, zu denen in der entsprechenden Arbeit keine Angaben gemacht wurden

rungssignal des als Sonde eingesetzten Pentamers und zeigte so, daß sich die Bindungsaktivität von R18 an das Pentamer A19 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in der Hefezelle nachweisen läßt (siehe Abschnitt 3.3.2). Ebenso bewirkte das als GST-Fusion in *Escherichia coli* exprimierte cDNA-Insert R18 *in vitro* ein Gelverzögerungssignal des nativen Promotorfragmentes 3.5 (vergleiche Abschnitte 3.1 und 3.3.2). Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß die Proteinexpression von R18 als GST-Fusion nur zu einer kleinen Menge vollständigen Fusionsproteins neben einer größeren Menge von Fusionsproteinteilstücken führte, ist das Gelverzögerungssignal durch das Fragment 3.5 als EMSA-Sonde auch als spezifisch anzusehen, denn ein 160facher Überschuß nicht markierten Fragmentes 3.5 führte dazu, daß der obere Teil des Gelverzögerungssignal verschwand (siehe Abschnitt 3.3.2). Somit wurde durch den beschriebenen One-Hybrid Versuch in Hefe ein Protein isoliert, das an das DNA-Fragment 3.5 aus dem Promotor des LEA-Gens CDeT27-45 bindet.

## 4.2 R18 kodiert für einen bisher nicht beschriebenen Transkriptionsfaktor

Datenbankvergleiche mit dem Insert des cDNA-Klones R18 ergeben eine Reihe von Sequenzen, die ausgedehnte homologe Bereiche aufweisen und von denen einige Vertreter in Abbildung 3.7 dargestellt sind. In den meisten Fällen handelt es sich um ESTs, die aus verschiedenen Arten (Tomate, *Pinus taeda*, Reis und andere) sowie aus verschiedenen Geweben (Blütenknospe, Ovar, Frucht, Rispe, Sproßspitze und andere) isoliert wurden. Die Homologie eines aus einer genomischen *Arabidopsis*-Sequenz abgeleiteten hypothetischen Proteins erstreckt sich über 221 Aminosäuren im 5'-Bereich. Wie in den Teilen A und C der Abbildung 3.7 dargestellt, ist die Ähnlichkeit der homologen Sequenzen zu R18 hoch in den Bereichen der Positionen 37-111 und 139-220 der translatierten cDNA mit Aminosäureidentitäten von bis zu 80 % . Da die homologen Sequenzen alle pflanzlichen Ursprungs sind, scheint es sich bei den konservierten Bereichen um pflanzentypische Motive zu handeln.

Um Aufschluß über Funktionselemente innerhalb der R18-Sequenz zu erlangen, wurde eine Strukturanalyse mit Hilfe der in Abschnitt 2.6.8 und 3.2.5 genannten Programme und Datenbanken durchgeführt. Sie ergibt für die R18-cDNA-

Sequenz eine N-terminale SAP-Domäne, eine nicht charakterisierte Helix-Loop-Helix-Struktur im mittleren Bereich und einen C<sub>3</sub>H-Zinkfinger am Carboxyterminus.

Zinkfinger sind aufgrund der chemischen Eigenschaften des Zn<sup>2+</sup>-Ions häufige Strukturen, die nach datenbankbasierten Schätzungen in 1 % aller offenen Leseraster eukaryotischer Genome vorkommen [8][22]. Selten unter den in bisher mehr als 10 Grundmotiven beschriebenen Formen der Zinkfinger ist darunter der C<sub>3</sub>H-Zinkfinger [8][77]. Er ist in 20 von 16626 offenen Leserastern in *Caenorhabditis elegans* sowie in 3 von 6215 offenen Leserastern in *Saccharomyces cerevisiae* vertreten [22], und die Suche in der smart-Datenbank ([http://smart.embl\\_heidelberg.de/smart](http://smart.embl_heidelberg.de/smart)) ergab für Pflanzen 43 Proteine mit einem oder mehreren C<sub>3</sub>H-Zinkfingern, darunter 37 aus *Arabidopsis thaliana*. Der C<sub>3</sub>H-Zinkfinger läßt sich durch die allgemeine Struktur C-X<sub>2-8</sub>-C-X<sub>2-16</sub>-C-X<sub>2-6</sub>-H (mit C = Cystein, H = Histidin und X = nicht konservierte Aminosäure) darstellen und koordiniert zwischen den Cysteinen und dem Histidin in noch nicht genau gekläarter Weise ein Zn<sup>2+</sup>-Ion als Liganden [100][124]. Vermutlich dienen die C<sub>3</sub>H-Zinkfinger-Strukturen der Protein-Protein-Wechselwirkung und der Dimerisierung [62][77].

C<sub>3</sub>H-Zinkfinger Domänen wurden als Bestandteile von Proteinen identifiziert, die als Transkriptionsfaktoren sowie Zellzyklus- und Entwicklungssignalgeber wirken. So werden die Nukleinsäuren-antigenen Proteine Nup475 und Tris-Tetraprolin11 aus *Homo sapiens* als Transkriptionsfaktoren diskutiert, die nach Induktion durch Wachstumsfaktoren oder Cycloheximid von der Zellzyklusphase G<sub>0</sub> nach G<sub>1</sub> umschalten können [51][117]. Aus *Arabidopsis* wurde PE11 isoliert, dessen Expression für die Embryoentwicklung notwendig ist und vermutlich als Transkriptionsfaktor wirkt [74]. So scheinen nach der gegenwärtigen Befundlage C<sub>3</sub>H-Zinkfinger nicht selbst an der DNA-Bindung beteiligt zu sein, sondern eher als Dimerisierungsdomänen Bestandteile von Transkriptionsfaktoren zu sein.

Während der C<sub>3</sub>H-Zinkfinger in R18 eine bekannten Motiven entsprechende Aminosäureabfolge besitzt, ist die in der Mitte der translatierten cDNA gelegene Helix-Loop-Helix Struktur im Hinblick auf veröffentlichte HLH-Domänen nicht charakterisiert. Die R18-Sequenz entspricht nicht der HLH-Konsensus-Sequenz, und es handelt sich bei den Helices nicht, wie sonst üblich um amphipatische Helices. Mit 16 basischen Resten unter 51 Aminosäuren ist der Bereich der HLH-Struktur in R18 reich an positiven Ladungen, die mit negativ geladenen Partnern wie zum Beispiel den Aminosäuren Aspartat und Glutamat oder Nukleinsäuren interagieren könnten. Im Falle charakterisierter Transkriptionsfaktoren mit HLH-Domäne wie dem mit Phytochrom interagierenden Faktor PIF3 [86] liegt meist

ein sehr basischer, DNA bindender Bereich vor dem HLH-Abschnitt, der der Oligomerisierung dient [75].

Im N-terminalen Bereich der R18-Sequenz erstreckt sich von der Aminosäure 44 bis zur Aminosäure 78 eine SAP-Domäne. Dieses erst kürzlich beschriebene Motiv ist nach den Anfangsbuchstaben der drei Proteine SAF-A/B, Acinus und PIAS benannt und stellt möglicherweise eine DNA-Bindungsregion dar [3]. An 10 von 11 konservierten Positionen (in Abbildung 3.7 B durch Pfeile hervorgehoben) stimmt die R18-Sequenz mit 7 repräsentativen Vertretern der 31 bekannten Sequenzen mit SAP-Domäne sowie deren 90 % Konsensus-Sequenz überein. Für das SAP-Motiv wird im Hinblick auf die bekannten Funktionen einiger Vertreter eine spezifische Rolle bei Transkription, Nukleinsäurereparatur und -verarbeitung sowie apoptotischem Chromatinabbau vermutet. So binden SAF-A und SAF-B (Scaffold Attachment Factor) an definierte chromosomale Regionen, die als SAR (Scaffold Attachment Region) bezeichnet werden [93]. DNA-Bindungsaktivität und Transkriptionsaktivierung durch das STAT3 Protein (Signal Transducer and Activator of Transcription-3) werden aktiviert durch Cytokine und EGFs (Epidermal Growth Factors) und inhibiert durch ein anderes SAP-Protein, PIAS3 (Protein Inhibitor of Activation of STAT3) [21]. Für ARIP3 (Androgen Receptor Interacting Partner 3), ein anderes SAP-Protein, ist ebenfalls gezeigt worden, daß es als transkriptioneller Koregulator wirkt [83].

Ihrer Natur entsprechend als im Kern mit DNA interagierenden Proteinen enthalten Transkriptionsfaktorsequenzen Kernlokalisierungssignale (NLS), die den Transport des im Cytosol synthetisierten Polypeptids in den Nukleus bewirken [75]. In R18 sind zwei putative Kernlokalisierungssignale vorhanden (siehe Abbildung 3.7 E), und die transiente Expression einer Fusion von R18 mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) hat gezeigt, daß die R18-Sequenz einen Transport des Fusionsproteins in den Kern bewirkt (siehe Abschnitt 3.3.3). Somit ist R18 wie auch alle anderen bisher genauer charakterisierten C<sub>3</sub>H-Zinkfinger-Proteine kernlokalisiert ([http://smart.embl\\_heidelberg.de/smart](http://smart.embl_heidelberg.de/smart)).

Eine vergleichende Expressionsanalyse mit Sonden für die R18-mRNA sowie für die Transkripte der LEA-Gene CDeT11-24 und CDeT27-45 zeigte, daß es sich bei der R18-mRNA um ein schwach exprimiertes Gen handelt (vergleiche Abbildung 3.8 A). Eine schwache Expression wurde für viele Transkriptionsfaktoren beobachtet [15][59], da sie eine oft sehr spezifische Wirkung als Regulatoren der Genexpression in der Zelle haben und ein hoher Transkriptspiegel als molekularer Ein-Aus-Schalter aufwendiger zu steuern ist.

Die DNA-Bindungsaktivität zusammen mit der Basizität und der Proteinstruktur mit einem C<sub>3</sub>H-Zinkfinger sowie einer SAP-Domäne, die Kernlokalisierung

und die schwache Expression sind Hinweise darauf, daß es sich bei R18 um einen Transkriptionsfaktor handelt.

### 4.3 Das R18-Protein bindet an das Fragment 3.5 des CDeT27-45 Promotors

Nelson et al. [85] hatten für Kernproteinextrakte aus Kallus von *Craterostigma plantagineum* schwächere konstitutive Bindungsaktivitäten und stärkere ABA induzierbare an das Fragment 3.5 des CDeT27-45 Promotors beobachtet. Damit im Einklang stehen die Befunde aus den in den Abbildungen 3.1, 3.2 und 3.4 wiedergegebenen Gelverzögerungsexperimenten. Zusätzlich zeigte es sich, daß die Gelverzögerungen auch durch Kernproteine aus Wurzeln hervorgerufen werden. Die Bindungsaktivität in Wurzeln ist konstitutiv und nicht durch Austrocknung induziert. Demgegenüber sind keine Bindungsaktivitäten für Kernproteine aus frischen und getrockneten Blättern nachweisbar.

Das Muster der Bindungsaktivitäten ist in Bezug auf Wurzeln und Blätter mit dem *steady state level* des R18 Transkripts korreliert, wie Abbildung 3.8 (Teil B) zeigt. In Kallus dagegen wird die R18-mRNA auch in unbehandeltem Zustand exprimiert und durch ABA nur geringfügig induziert, während die Gelverzögerungssignale durch Kernproteine aus frischem Kallus viel schwächer sind als die aus ABA behandeltem Kallus. Diese Diskrepanz im Expressionsmuster könnte in Unterschieden zwischen differenzierten Geweben wie Wurzeln und Blättern gegenüber dem undifferenzierten Kallusgewebe begründet liegen [46]. Die Bindungsaktivität an das Fragment 3.5 des CDeT27-45 Promotors und die R18-mRNA zeigen also ein bezüglich ihrer Verbreitung in verschiedenen Geweben gleiches differentielles Vorkommen, unterscheiden sich aber im Hinblick auf die ABA-induzierte Verstärkung der Bindungsaktivität in Kallus-Kernproteinen.

Die AGCCC-Elemente, die das Fragment 3.5 des CDeT27-45 Promotors charakterisieren, sind ebenfalls als Promotorbestandteile von *Glycine max* und *Arabidopsis thaliana* bekannt. Im Promotor der  $\alpha$ -Untereinheit des embryospezifisch gebildeten Samenspeicherproteins  $\beta$ -Conglycinin aus *Glycine max* kommen vier

A

Wiederholungen der Motive A G CCCA in einem Bereich von 98 Basen vor,

C

dessen Gegenwart die Expression der  $\alpha$ -Untereinheit von  $\beta$ -Conglycinin in transgenen Petunien um das 20fache steigerte [18]. Aus *Arabidopsis* ist nur die Präsenz



des AGCCC-Motivs im Promotor des ABA- und Kältestress-induzierten Gens Rab18 [69] bekannt. Die wenigen Beschreibungen von AGCCC-Motiven in Promotoren könnten die Tatsache widerspiegeln, daß es sich um ein Element mit einer sehr spezifischen Verbreitung handelt. Dementsprechend ist für Transfaktoren zu diesem Element ein vereinzelt Vorkommen im Genom zu erwarten und kein Auftreten in einer großen Genfamilie. Eine Durchsuchung der Datenbank nach homologen Sequenzen zu R18 ergibt nur wenige ESTs und ein hypothetisches Protein, so daß R18 und R18-ähnliche Sequenzen über verschiedene Spezies betrachtet eine sehr spezifische Verbreitung zu besitzen scheinen.

In einer Southernanalyse wurden mit einer Sonde für R18, die auch die Bereiche enthielt, die sich im Datenbankvergleich als konserviert in einer Reihe von Sequenzen herausstellten, im *Craterostigma*-Genom nur wenige Banden detektiert (siehe Abschnitt 3.3.4). Im Southernblot mit R18 als Sonde wurden ein 5 kB und ein 6 kB großes EcoRI-Fragment detektiert, die möglicherweise den beiden genomischen Klonen entsprechen, die als 5 bzw 6 kB große EcoRI-Fragmente bei der Durchsuchung einer Bibliothek genomischer *Craterostigma*-DNA isoliert wurden (siehe Abschnitt 3.3.5). Die anhand eines Vergleichs mit der cDNA-Sequenz des Klons R18 identifizierten Exons der beiden genomischen Klone sind auf Nukleotidebene zu 99 % (gc19) bzw. zu 96 % (gc3A) identisch. Auf Aminosäureebene sind die translatierten Sequenzen der Exons und der cDNA zu 98 % (gc19) bzw. 94 % (gc3A) identisch. Bei den beiden genomischen Klonen könnte es sich aufgrund ihrer großen Ähnlichkeit um Allele handeln. Die wenigen mit einer R18-Sonde hybridisierenden Banden deuten darauf hin, daß R18 und R18-ähnliche Gene der spezifischen Verbreitung des AGCCC-Motivs entsprechend nur mit wenigen Vertretern im Genom von *Craterostigma plantagineum* vertreten sind und es sich nicht um eine große Genfamilie handelt.

Während für einige Promotorelemente eine gut charakterisierte Korrelation zur Art bindender Transfaktoren vorliegt, wie etwa im Falle der ABA responsive elements ABRE und bzip-Faktoren [49][60], den AATTATT-Kernmotiven und Homöodomänen-Leucinezipper-Proteinen [102] oder bei den DRE (drought responsive elements) und Proteinen mit Apetala2-Domäne [110], ist nichts über Transfaktoren bekannt, die an das AGCCC-Motiv binden. Dies wurde durch eine Recherche in der Transkriptionsfaktorendatenbank (unter <http://transfac.gbf.de/cgi-bin/matSearch>) mit dem Promotorfragment 3.5 bestätigt. Daher können Proteine mit bisher nicht charakterisierten DNA-Bindungsdomänen als AGCCC-Element bindende Faktoren in Frage kommen.

Die Kotransfektion von R18 mit einem Konstrukt aus dem CDeT27-45-Promotor fusioniert an das GUS-Reportergen führte in Tabakprotoplasten zu einer si-

gnifikanten Erhöhung der Expression des GUS-Reportergens. Die Erhöhung des GUS-Spiegels lag in der Größenordnung des durch Inkubation mit ABA gemessenen Anstiegs der GUS-Aktivität. Dieser Befund unterstützt den aufgrund der Protein-DNA-Interaktionen im One-Hybrid Versuch und bei *in vitro* Reaktionen gezogenen Schluß, daß R18 mit dem CDeT27-45 Promotor interagieren kann.

Aufgrund der Korrelationen im Expressionsmuster von R18 und der Bindungsaktivitäten an das Fragment 3.5 kann es sich bei R18 um einen der aus EMSA- und DNaseI-footprinting-Versuchen bekannten Faktoren handeln, die an das Fragment 3.5 des CDeT27-45 Promotors binden. Weiterhin stehen die Erwartungen an einen AGCCC-Elemente erkennenden Transkriptionsfaktor in Bezug auf die Häufigkeit des Vorkommens in der Datenbank sowie im Genom aufgrund der spezifischen Verbreitung von AGCCC-Elemente in Übereinstimmung mit den für R18 erhaltenen Befunden aus den Datenbankrecherchen, der Southernanalyse und der Isolierung zweier einander sehr ähnlicher genomischer Klone. Zusätzlich stützt die Erhöhung der GUS-Aktivität durch Transfektion und transiente Expression von R18 in Tabakprotoplasten mit einem CDeT27-45-Promotor-GUS-Konstrukt die Annahme, daß es sich bei R18 um einen Transkriptionsfaktor handelt, der mit dem durch AGCCC-Elemente charakterisierten Bereich aus dem CDeT27-45-Promotor interagiert.

#### 4.4 Mögliche Funktion von R18

Die dargestellten Ergebnisse legen nahe, daß R18 an Elemente mit AGCCC-Motiven sowohl *in vitro* (Gelverzögerungsversuche, siehe Abschnitt 3.3.2) als auch *in vivo* (Versuche in Hefe, siehe Abschnitt 3.2.4, sowie Abschnitt 3.3.6, Transfektion von Tabakprotoplasten) binden kann. Daher ist es möglich, daß R18 an AGCCC-Elemente in *Craterostigma plantagineum* bindet und eine Rolle bei der Regulation der Transkription in Reaktion auf Trockenstreß spielt.

R18 wurde in einem One-Hybrid Versuch in Hefe isoliert, so daß für die Bindung an die Ziel-DNA keine weiteren möglichen Protein-Partner aus *Craterostigma* zur Verfügung standen. Weiterhin band auch das in *Escherichia coli* exprimierte R18-Protein nach Aufreinigung an AGCCC-Motive bei *in vitro*-Reaktionen. Die Isolierung in einem Hefe One-Hybrid Versuch und die DNA-Bindungsaktivität *in vitro* unterstützen daher die Annahme, daß R18 für die Bindung an DNA keiner weiteren Protein-Kofaktoren oder zusätzlicher Modifikationen bedarf.

R18 weist am Carboxyterminus einen Zinkfinger vom C<sub>3</sub>H-Typ auf. Für HTLV-I Tax mit Zinkfingern vom C<sub>3</sub>H-Typ ist gezeigt worden, daß dieses Zinkfingermotiv an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sind und über Dimerisierung eine Erhöhung der Transaktivierungsfunktion bewirkt [62][100]. Außer dem Zinkfinger besitzt R18 mit dem uncharakterisierten Helix-Loop-Helix-Motiv eine weitere Struktur, die an Protein-Protein Wechselwirkungen beteiligt sein könnte. Für charakterisierte Helix-Loop-Helix-Motive wird ebenfalls die Rolle einer Dimerisierungsdomäne vermutet [75]. Auch Transkriptionsfaktoren anderer Transkriptionsfaktorklassen, wie etwa Athb-1 und -2 HDzip [101][102] oder WD-Faktoren wie Spa1 [54] interagieren als Homodimere mit DNA. Die Gegenwart von Strukturen, die Protein-Protein-Interaktionen vermitteln können, und der Befund, daß viele Transkriptionsfaktoren verschiedener Klassen als Dimere wirken, geben Anlaß zu der Annahme, daß auch R18 als Homodimer an AGCC-Elemente bindet.

Die Expression des putativen Zielgens von R18, CDeT27-45, ist nicht korreliert mit der Expression von R18 und den Bindungsaktivitäten an das Fragment 3.5 des CDeT27-45 Promotors. Während CDeT27-45 in Wurzeln und Blättern in Reaktion auf Trockenstreß exprimiert wird, ist das Transkript von R18 ebenso wie Bindungsaktivität an das Fragment 3.5 des CDeT27-45 Promotors konstitutiv und nur in Wurzeln zu finden. Der Unterschied in der Induzierbarkeit auf Trockenstreß hin legt die Vermutung nahe, daß in *Craterostigma* weitere Faktoren zusätzlich zu R18 an der Transkriptionsaktivierung von CDeT27-45 beteiligt sind. Damit in Übereinstimmung steht die Beobachtung, daß das Fragment 3.5 des CDeT27-45 Promotors notwendig, aber alleine nicht ausreichend zur ABA induzierten Expression einer Promotor-GUS-Fusion in *Craterostigma*-Protoplasten ist [85]. Weiterhin zeigte eine detaillierte Analyse der Bindungsaktivitäten durch Kernproteine aus Kallus von *Craterostigma plantagineum* an das Promotorelement 3.5, daß es sich um mindestens zwei unterschiedliche Bindungsaktivitäten handelt. Ein Bindungskomplex führt zu einer weniger starken Gelverzögerung und ist nicht manipulierbar durch die Zugabe von Proteinsyntheseinhibitoren in das Medium des zur Gewinnung von Kernproteinen verwendeten Kallus, der andere Komplex verzögert stärker und taucht nicht auf in Kernproteinextrakten aus Kallus, der mit ABA und Proteinsyntheseinhibitor behandelt worden ist ([85], zu den beiden Komplexen siehe auch Abbildung 3.4, Spur mit 20 µg ABA Kallus). Die vorhandenen Befunde bezüglich der Regulation der Expression von CDeT27-45 deuten daraufhin, daß die Regulation komplex ist. Der Komplexität der Bindungsaktivitäten entsprechend ist nicht zu erwarten, daß alle beteiligten Faktoren in der gleichen Weise differentiell exprimiert werden wie ihre Zielgene, auch wenn der Faktor selbst zur differentiellen Expression notwendig ist. Dies wurde

beispielsweise auch gezeigt für den konstitutiv exprimierten Transkriptionsfaktor CBF1 und sein durch Kälte und Trockenheit induziertes Zielgen *Cor15 $\alpha$*  [110]. So schließen die in Bezug auf die Verbreitung in den verschiedenen Geweben sowie im Hinblick auf die Induzierbarkeit nicht korrelierten Expressionmuster des R18-Gens und das von CDeT27-45 (vergleiche Abbildung 3.8 B) nicht aus, daß R18 an der Regulation der Expression von CDeT27-45 beteiligt ist.

Im Promotor von CDeT27-45 liegen benachbart zu den AGCCC-Elementen vier ABRE-Motive [81]. Es wurde gezeigt, daß bzip-Transkriptionsfaktoren an das ABRE-Motiv binden [49]. Im Zusammenhang mit Trockenstreß- und ABA-induzierter Transkriptionsaktivierung bei Pflanzen ist beispielsweise für die differentielle Expression der Gene HVA1 und HVA22 das Zusammenspiel von Faktoren beschrieben worden, die an ABA responsive elements (ABRE) und an coupling elements (CE) binden [103][104]. Für *viviparous-1* aus Mais ist sehr detailliert beschrieben worden, daß sein Genprodukt als Transaktivator wirkt, indem es die DNA-Bindungsaktivität von bzip-Transkriptionsfaktoren wie EmBP-1, aber auch von Opaque-2 und anderen erheblich steigert [52]. Somit ist möglicherweise auch im Falle der Genregulation von CDeT27-45 eine Wechselwirkung zwischen R18 und bzip-Faktoren Bestandteil der differentiellen Expression. Dies leitet zu der Annahme, daß mehrere Faktoren an verschiedenen Stellen des CDeT27-45 Promotors binden.

Mit Blick auf die in R18 identifizierte SAP-Domäne (siehe Abschnitt 3.2.5) sind im Zusammenhang von Transkriptionskomplexen andere durch SAP-Domänen charakterisierte Faktoren interessant, die gemeinsam mit Partnern an der Regulation von Genexpression auf hormonelle Signale hin beteiligt sind. So wird die im Menschen und in mehreren Tierarten untersuchte hormonelle Transkriptionsaktivierung durch STAT3 (Signal Transducers and Activators of Transcription 3) [28] durch einen Vertreter von Proteinen mit einer SAP-Domäne, PIAS3 (Protein Inhibitor of Activation of STAT3), reprimiert [21]. Ebenfalls als transkriptioneller Koregulator wirkt ARIP3 (Androgen Receptor Interacting Partner 3) aus *Rattus norvegicus*, ein anderes Protein mit SAP-Domäne [83]. R18 könnte funktionell analog anderen Proteinen mit SAP-Domäne die Regulation der Genexpression auf hormonelle Signale hin modulieren und als Transkriptionskoregulator wirken.

Die Komplexität der Vorgänge, die ein Ereignis wie Trockenstreß in Pflanzen auslöst (vergleiche Abschnitte 1.5 und 1.6), erfordert Signaltransduktionsketten, die die Reaktionen der Zelle in Raum, Zeit und Intensität integrieren und steuern können. Dazu kann die Spaltung der Ketten in spezifische Wege dienen, wie beispielsweise bei der ABA unabhängigen Trockenstreß-induzierten Signalvermittlung durch DREB1 und DREB2 in einen Kältestreß-spezifischen und einen

Trockenstreß-spezifischen Weg [76]. Der Komplexität der zellulären Genregulationsvorgänge entsprechend machen Gene für Transkriptionsfaktoren einen großen Anteil aller offenen Leseraster im Genom aus (geschätzt werden beispielsweise Anteile von 12 % in Hefe oder mehr als 20 % im Falle von *Arabidopsis thaliana* [35]). Zur Transkription eines einzelnen Gens ist das Zusammenspiel einer Reihe von Faktoren notwendig wie RNA-Polymerasen, allgemeinen Transkriptionsfaktoren, Acetylasen und Deacetylasen, spezifischen Transkriptionsfaktoren sowie ihren Koaktivatoren und Korepressoren [66]. Jeder einzelne dieser Faktoren kann seinerseits ein Komplex aus verschiedenen Untereinheiten sein, wie im Falle der maximalen Transkriptionsaktivierung durch CBF1 in Hefe, für die die Gegenwart der Kofaktoren ADA2, ADA3 und GCN5 notwendig ist [110].

Da andererseits aber die Anzahl bekannter Signaltransduktionsketten-Grundmuster gegenüber der Anzahl der möglichen Zellreaktionen gering ist, muß die Differenzierung in spezifische Signale auch über die Kombination von Signalmolekülen wie Transkriptionsfaktoren und ihrer Signaltransduktionsketten erfolgen [43]. Im Zusammenhang der ABA vermittelten Signaltransduktionsketten sind beispielsweise das Zusammenwirken von ABA und Licht im Falle der Expression des Elip (early light inducible protein)-ähnlichen Proteins dsp-22 aus *Crateostigma plantagineum* [4] oder die notwendigen Wechselwirkungen zwischen den ABA- und den Ethylen-vermittelten Signalwegen beim ABA-inhibierten Wurzelwachstum [7] beschrieben.

Die Isolierung im Hefe One-Hybrid Versuch und die *in vitro* Bindungsaktivität lassen den Schluß zu, daß die Bindung an DNA durch R18 ohne Proteinkofaktoren erfolgen kann. Protein-Protein Wechselwirkungen sind aufgrund von Sekundärstrukturen wie einem uncharakterisierten Helix-Loop-Helix Motiv und einem C<sub>3</sub>H-Zinkfinger möglich und könnten der Homodimerisierung sowie der Interaktion mit andersartigen Protein-Kofaktoren im Hinblick auf die Regulation der Genexpression dienen. Die in Bezug auf die Verbreitung in den verschiedenen Geweben sowie im Hinblick auf die Induzierbarkeit nicht korrelierten Expressionmuster des R18-Gens und das von CDeT27-45 führen zu der Vermutung, daß R18 nicht alleine an der Regulation der Expression von CDeT27-45 beteiligt sein kann.

## 4.5 Ausblick

Die R18-cDNA ist ein guter Ansatzpunkt für die Funktionsanalyse einzelner Sekundärstrukturelemente eines bisher nicht bekannten Transkriptionsfaktors durch DNA-Bindungsstudien *in vivo* und *in vitro* sowie zur Isolation interagierender

Proteine beispielsweise durch einen Two-Hybrid Versuch in Hefe. Die im One-Hybrid Versuch gewonnene 1.3 kB große R18-cDNA ist das Fragment eines ca 1.7 kB großen Transkripts (siehe Abschnitt 3.3.1), so daß möglicherweise nicht alle Strukturelemente der R18-cDNA bekannt sind. Aufgrund der schwachen Expression der R18-mRNA gelang es nicht, einen vollständigen cDNA-Klon aus einer cDNA-Bank zu isolieren, und auch ein 5'-RACE-Ansatz führte nicht zum fehlenden 5'-Ende der R18-cDNA. Um eine vollständige cDNA-Sequenz zu erhalten, könnten anhand der genomischen R18-Klone Oligonukleotide für eine reverse Transkription und Amplifikation (RT-PCR) abgeleitet und verwendet werden.

Da Sequenzen mit Homologien zu R18 auch in anderen Pflanzenarten wie *Arabidopsis*, Reis oder Tomate vorhanden sind, kann das aus *Craterostigma plantagineum* isolierte putative Transkriptionsfaktoren R18 helfen, die Rolle seiner Homologen insbesondere in solchen Spezies zu untersuchen, aus denen bekannt ist, daß das AGCCC-Motiv in ihren Promotoren vertreten ist. Im Fall von Tabak führte die transiente Expression von R18 zu einer signifikanten Steigerung der GUS-Aktivität (siehe Abschnitt 3.3.6). Im Fall von *Craterostigma plantagineum* spricht demgegenüber vieles dafür, daß R18 vermutlich nicht alleine an der Regulation der Expression von CDeT27-45 beteiligt (siehe Abschnitt 4.4). Zur Erklärung muß für Tabakprotoplasten die Gegenwart zusätzlicher Faktoren angenommen werden, die in *Craterostigma* die ABA-Induzierbarkeit von CDeT27-45 bewirken. Die Rolle von R18 als möglichem Transkriptionsaktivator muß daher in detaillierten Transfektionsversuchen im homologen System zusätzlich zum heterologen Ansatz genauer untersucht werden.

Im Hinblick auf die Diskussion um den Ort der Wahrnehmung von Trockenstreß sowie auf die Signalweitergabe über längere Distanzen innerhalb der Pflanze ist die Beobachtung interessant, daß *in planta* R18 und die Bindungsaktivität an die AGCCC-Elemente des CDeT27-45 Promotors nur in den Wurzeln nachweisbar sind, während die CDeT27-45 mRNA in Wurzeln und in Blättern vorhanden ist (vergleiche Abbildung 3.1 und 3.8, Teil B). Somit könnte die Untersuchung der Bindungsaktivitäten an das Promotorelement 3.5 möglicherweise dazu dienen, die von Davies und Zhang [29] diskutierten physiologischen Ansätze zur Klärung der Frage nach Ursprung und Wegen der Trockenstreßsignale molekularbiologisch zu ergänzen.

---

## 5. Zusammenfassung

---

Aus der Wiederauferstehungspflanze *Craterostigma plantagineum* als Modellsystem zur Untersuchung der molekularen Grundlagen der Austrocknungstoleranz bei Pflanzen ist das Gen CDeT27-45 isoliert worden, das für ein LEA-artiges Protein kodiert. Die Untersuchung des Promotors dieses durch Trockenstreß- und ABA induzierbaren Gens führte zur Identifikation eines Bereiches, der für die ABA-stimulierte Expression eines Reportergens in *Craterostigma*-Protoplasten notwendig ist. Dieser Bereich ist durch zwei der aus anderen Promotoren bekannten, kaum charakterisierten AGCCC-*cis*-Elemente gekennzeichnet.

Motivation der vorliegenden Arbeit war die Frage nach Proteinen, die an diesen durch AGCCC-Motive charakterisierten Promotorbereich binden. Die Untersuchung der Bindungsaktivitäten an die AGCCC-Elemente aus dem CDeT27-45 Promotor bezüglich ihrer Verbreitung in verschiedenen Geweben mit Hilfe von Gelverzögerungsversuchen zeigte, daß Kernproteine aus Wurzeln und Kallus an die AGCCC-Motive binden. Da Kernproteinextrakte aus ABA behandeltem Kallus das stärkste Gelverzögerungssignal hervorriefen, wurden sie im Hinblick auf die Durchführung eines One-Hybrid Versuchs in Hefe auf Bindungsaktivitäten an ein DNA-Zielelement mit dem AGCCC-Motiv getestet. Da sich die Bindungsaktivität an das DNA-Zielelement bezüglich ihrer Spezifität nicht von dem nativen Promotorfragment unterschied, wurde es in einem One-Hybrid Versuch zur Isolierung von cDNAs verwendet, die für Proteine kodieren, die an AGCCC-Elemente binden.

Nach Etablierung des Hefe One-Hybrid Systems wurden  $1.5 \times 10^6$  cDNA-Klone, die die mRNA-Population von ABA behandeltem Kallus repräsentierte, nach Klonen durchsucht, die für Proteine kodieren, die mit dem AGCCC-Zielelement interagieren. 309 Klone wurden hierbei isoliert und durch Retransformation

auf die Spezifität ihrer DNA-Interaktion untersucht. Für einen Klon, R18, bestätigte sich die Spezifität der Bindung sowohl in Hefe als auch *in vitro* bei Verwendung des in *Escherichia coli* exprimierten Klons R18 in Gelverzögerungsversuchen.

Die Sequenzierung des Klons R18 ergab, daß es sich um ein basisches Protein mit einem C<sub>3</sub>H-Zinkfinger, einer SAP-Domäne und einer uncharakterisierten Helix-Loop-Helix-Struktur mit Homologien zu ESTs sowie abgeleiteten Proteinsequenzen vor allem aus Pflanzenspezies handelt. Aus einer Northernanalyse mit R18 als Sonde folgte, daß die 1.3 kB große cDNA das Fragment eines ca 1.7 kB großen seltenen Transkriptes ist und in Wurzeln und Kallus exprimiert wird. Die transiente Expression einer R18-GFP-Fusion in Tabakprotoplasten bestätigte die aus Kernlokalisierungssignalen abgeleitete Vermutung, daß R18 in den Nukleus transportiert wird. Die Messung der GUS-Aktivität nach Kotransfektion von Tabakprotoplasten mit R18 und einem Konstrukt aus dem Promotor von CDeT27-45 und einem GUS-Reportergen zeigte, daß R18 *in vivo* als Transkriptionsaktivator wirkt.

Zwei genomische Klone wurden isoliert, bei denen es sich aufgrund ihrer Ähnlichkeit vermutlich um Allele handelt und von denen der eine zu 99 % mit R18 auf Nukleinsäureebene und zu 98 % auf Aminosäureebene übereinstimmt.

Somit gelang es, durch einen Hefe One-Hybrid Versuch das putative Transkriptionsfaktorgen R18 aus der Wiederauferstehungspflanze *Craterostigma plantagineum* zu isolieren.



---

## 6. Anhang

---

### 6.1 Abkürzungen und Akronyme

ABA	Abscisinsäure
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaar
H <sub>2</sub> O bidest.	zweifach destilliertes Wasser
BSA	Rinder-Serumalbumin
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
cpm	counts per minute
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
d	Tag
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat

---

DEAE	Diethylaminoethyl
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMSA	Electromobility shift assay
g	Gravitationskonstante
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GUS	$\beta$ -Glucuronidase
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
IAA	Indolessigsäure
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
M	Mol
mA	Milliampere
mM	Millimol
MOPS	N-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA

---

OD <sub>λ</sub>	optische Dichte bei der Wellenlänge λ
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pdAdT	poly-dAdT
PEG	Polyethylenglycol
pfu	plaque forming units
PIPES	1,4-Piperazin-N,N'-2-ethansulfonsäure
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
rRNA	ribosomale RNA
SDS	Natiumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton-X-100	Octylphenylpolyethylenglycolether
U	Unit
V	Volt
% [v/v]	Volumenprozent
% [w/v]	Gewichtsprozent
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-galactopyranosid

## 6.2 EMSA-Sonden und Oligonukleotidsequenzen

Alle Sequenzen sind in Richtung 5' → 3' aufgeführt:

Probe 3.5	TTTAAACATT TGCCATTGAG TTTTCTGTA GGCTGGCGAA CCATAATAAA TCCATTTGAC TTGTTGCTTA TGAAACTTAT GCAAGCCCAA ATTTACAGC CCGATAACCG ACCCGAGAAG AGTCCATGG
Pentamer A19	AGAAAGCCCA AATTTACAAA CCCGATAACC GATCCGAGAA AGCCCAAATT TCACAACCCG ATAACCGACC CGAGAAAGCC CAAATTTAC AGCCCATAAC CGGACCCGAG AAAGCCCAAA TTTACAGCC CGATAACCGA CCCGCGAAAAG CCCAAATTTT AGAGCCCGAT AACCGACCCG AGAA
R18-I	CTC AGC TCT GGA CCA CCA GTC
R18-II	GCT CTC CAC CTG ACC ACC TTC
R18-III	GGA GCA TGT CCA ACC CAA C
R18-IV	GAT AAG AAT GTA AGG CC
R18-V	AGT TTT GAA CCG GCC AGC
R18-VI	GGA AAT GGG CAC CTG TCG
R18-VII	CCA CCC ATT GGT ATC TCA
R18-NcoI-5'	CCA TTC TGA CCA TGG GTG AAG G
R18-NcoI-3'	CGT CCT ACC CAT GGT GAT GTT G
Yan-I	GCA TGT TTA ATA CCA CT
Yan-II	TTG ATT GGA GAC TTG ACC
NotI-Adapter	GAC TAG TTC TAG ATC GCG AGC GGC CGC CC (T) <sub>15</sub>

SaII-Adapter	TCG ACC CAC GCG TCC G
universe	GTA AAA CGA CGG CCA GT
reverse	CAG GAA ACA GCT ATG AC

### 6.3 Datenbankzugangscode für die in Abbildung 3.7 aufgeführten Sequenzen

#### Teilabbildung A

Tomate, EST Frucht grün	AW933717
Tomate, EST Blütenknospe	AW622914
<i>Pinus taeda</i> , EST Sproßspitze	AW042570
<i>Arabidopsis</i> , hyp. Protein	BAB08626.1

#### Teilabbildung B

PIAS1 <i>Homo sapiens</i>	O75925
ARP <i>Arabidopsis</i>	P45951
SAF-A <i>Homo sapiens</i>	AF068847
NLFI1p <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Q12216
SAF-B <i>Homo sapiens</i>	L43631
Tho1p <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1077664

#### Teilabbildung C

Tomate, EST Ovar	AI487326
Tomate, EST Frucht rot	AW222568
Reis, EST Rispe	C72520
<i>Arabidopsis</i> , hyp. Protein	BAB08626.1

**Teilabbildung D**

Mensch, ZNF127	U41315
<i>Arabidopsis</i> , RNA bindendes Protein	AC004561
<i>Caenorhabditis elegans</i> , Pie1	Q94131
<i>Arabidopsis</i> , ZNF3	AF138872

---

## Literaturverzeichnis

---

- [1] AESCHBACHER, R., MÜLLER, J., BOLLER, T., AND WIEMKEN, A. Purification of the Trehalase GMTRE1 from Soybean Nodules and Cloning of Its cDNA. GMTRE1 Is Expressed at a Low Level in Multiple Tissues. *Plant Physiology* 119 (1999), 489–495.
- [2] ALTSCHUL, S., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E., AND LIPMAN, D. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215 (1990), 403–410.
- [3] ARAVIND, L., AND KOONIN, E. SAP - a putative DNA-binding motif involved in chromosomal organization. *Trends in Biochemical Sciences* 25 (2000), 112–114.
- [4] BARTELS, D., HANKE, C., SCHNEIDER, K., MICHEL, D., AND SALAMINI, F. A desiccation related Elip-gene from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* is regulated by light and ABA. *EMBO* 11, 8 (1992), 2771–2778.
- [5] BARTELS, D., SCHNEIDER, K., TERSTAPPEN, G., PIATKOWSKI, D., AND SALAMINI, F. Molecular cloning of abscisic acid modulated genes which are induced during desiccation of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Planta* 181 (1990), 27–34.
- [6] BARTELS, D., AND THOMPSON, R. The characterization of cDNA clones coding for wheat storage proteins. *Nucleic Acid Research* 11 (1983), 2961–2968.

- [7] BEAUDOIN, N., SERIZET, C., GOSTI, F., AND GIRAUDAT, J. Interactions between Abscisic Acid and Ethylene Signaling Cascades. *The Plant Cell* 12 (2000), 1103–1115.
- [8] BERG, J., AND SHI, Y. The Galvanization of Biology: A Growing Appreciation of the Roles of Zinc. *Science* 271 (1996), 1081–1085.
- [9] BEWLEY, I., AND KROCHKO, J. Desiccation Tolerance. In *Encyclopedia of Plant Physiology*, vol. 12B. Springer Verlag, Berlin and Heidelberg and New York, 1982, ch. 10.
- [10] BIRNBOIM, H., AND DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Research* 4 (1979), 1465–1482.
- [11] BOCKEL, C., SALAMINI, F., AND BARTELS, D. Isolation and Characterization of Genes Expressed during Early Events of the Dehydration Process in the Resurrection Plant *Craterostigma plantagineum*. *Journal of Plant Physiology* 152 (1998), 158–166.
- [12] BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72 (1976), 248–254.
- [13] BRAY, A. Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science* 2, 2 (1997), 48–54.
- [14] BROWN, J., COLLING, D., PARK, D., PHILLIPS, J., ROTHERY, D., AND WRIGHT, J. *Seawater: Its Composition, Properties and Behaviour*, 1 ed. Pergamon Press, Oxford, 1989.
- [15] CHANDLER, J., AND BARTELS, D. Structure and function of the vp1 gene homologue from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Mol. Gen. Genetics* 256 (1997), 539–546.
- [16] CHANDLER, J., AND BARTELS, D. Plant Desiccation. In *Plant Responses to Environmental Stresses*, H. Lerner, Ed. Marcel Dekker, New York and Basel, 1999, ch. 25.
- [17] CHANDLER, P., AND ROBERTSON, M. Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45 (1994), 113–141.



- [18] CHEN, Z., SCHULER, M., AND BEACHY, R. Functional analysis of regulatory elements in a plant embryo specific gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83 (1986), 8560–8564.
- [19] CHEVRAY, P., AND NATHANS, D. Protein interaction cloning in yeast: Identification of mammalian proteins that react with the leucine zipper of Jun. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89 (1992), 5789–5793.
- [20] CHRISTEN, H. *Grundlagen der allgemeinen und anorganischen Chemie*, 9 ed. Salle + Sauerländer, Frankfurt am Main (Salle), Aarau, Frankfurt am Main und Salzburg (Sauerländer), 1988.
- [21] CHUNG, C., LIAO, J., LIU, B., RAO, X., JAY, P., BERTA, P., AND SHUAI, K. Specific Inhibition of Stat3 Signal Transduction by PIAS3. *Science* 278 (1997), 1803–1805.
- [22] CLARKE, N., AND BERG, J. Zinc Fingers in *Ceanorhabditis elegans*: Finding Families and Probing Pathways. *Science* 282 (1998), 2018–2021.
- [23] CLONTECH. Matchmaker One-Hybrid System Protocol. *Clontech Laboratories, Inc.* (Clontech Laboratories, 4030 Fabian Way, Palo Alto, CA 94303, USA).
- [24] CLOSE, T. Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiologia Plantarum* 97 (1996), 785–803.
- [25] COWELL, I., AND HURST, H. Cloning transcription factors from a cDNA expression library. In *Transcription Factors*, D. Latchman, Ed. Oxford University Press, 1999.
- [26] CROWE, J., CROWE, L., AND CHAPMAN, D. Preservation of Membranes in Anhydrobiotic Organisms: The Role of Trehalose. *Science* 223 (1984), 701–703.
- [27] CUTLER, A., AND KROCHKO, J. Formation and breakdown of ABA. *Trends in Plant Science* 4, 12 (1999), 472–478.
- [28] DARNELL, J. STATs and Gene Regulation. *Science* 277 (1997), 1630–1635.

- [29] DAVIES, W., AND ZHANG, J. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42 (1991), 55–76.
- [30] DAVIS, L., DIBNER, M., AND BATTEY, J. *Basic Methods in Molecular Biology*, 1 ed. Elsevier, New York, 1986.
- [31] DUNN, L. Marine chemistry overheads. Some Physical Chemistry Aspects of Oceanography - Lectures in SCY255 Marine Chemistry of the Chemistry Department of the University of Tasmania, Hobart, Australia, 1992.
- [32] DURFEE, T., BECHERER, K., CHEN, P., YEH, S., YANG, Y., KILBURN, A., LEE, W., AND ELLEDGE, S. The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes and Development* 7 (1993), 555–569.
- [33] EGGESTEIN, B. Molekularbiologische Untersuchungen zum Trockenstreß: Charakterisierung von spezifischen Genprodukten. Master's thesis, Technische Universität Berlin, Berlin, 1993.
- [34] EHRENDORFER, F. *Geobotanik*, 33 ed. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart and Jena and New York, 1991, ch. 4.
- [35] EULGEM, T., RUSHTON, P., ROBATZEK, S., AND SOMSSICH, I. The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Sciences* 5, 5 (2000), 199–206.
- [36] FEINBERG, A., AND VOGELSTEIN, B. A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry* 132 (1983), 6–13.
- [37] FINKELSTEIN, R., AND LYNCH, T. The *Arabidopsis* Abscisic Acid Response Gene ABI5 Encodes a Basic Leucine Zipper Transcription Factor. *The Plant Cell* 12 (2000), 599–609.
- [38] FRANK, W. *Isolierung und Charakterisierung von Trockenstreß-induzierten Genen mit potentiell regulatorischer Funktion aus der Wiederaufstehungspflanze Craterostigma plantagineum*. PhD thesis, Universität zu Köln, 1997.

- [39] FRANK, W., MUNNIK, T., KERKMANN, K., SALAMINI, F., AND BARTELS, D. Water Deficit Triggers Phospholipase D Activity in the Resurrection Plant *Craterostigma plantagineum*. *The Plant Cell* 12 (2000), 111–123.
- [40] FRANK, W., PHILLIPS, J., SALAMINI, F., AND BARTELS, D. Two dehydration inducible transcripts from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* encode interacting homeodomain-leucine zipper proteins. *The Plant Journal* 15, 3 (1998), 413–421.
- [41] FURINI, A., KONCZ, C., SALAMINI, F., AND BARTELS, D. Agrobacterium-mediated transformation of the desiccation tolerant plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Cell Reports* 14 (1994), 102–106.
- [42] GAFF, D. Desiccation Tolerant Flowering Plants in Southern Africa. *Science* 174 (1971), 1033–1034.
- [43] GHAZI, A., AND RAGHAVAN, K. Control by combinatorial codes. *Nature* 408 (2000), 419–420.
- [44] GIBCO, D. Gibco BRL Life Technologies. *Postfach 1212, 76339 Eggenstein* (Deutschland).
- [45] GIETZ, R., AND SCHIESTL, R. Transforming Yeast with DNA. *Methods in Molecular Cell Biology* 5 (1995), 255–269.
- [46] GORST, J. Plant Cell Biology and Tissue Culture. Lectures in course SBT332, University of Tasmania, Hobart, Australien, 1992.
- [47] GSTAIGER, M., KNOEPFEL, L., GEORGIEV, O., SCHAFFNER, W., AND HOVENS, C. A B-cell coactivator of octamer-binding transcription factors. *Nature* 373 (1995), 360–362.
- [48] GUBLER, U., AND HOFFMANN, B. A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* 25 (1983), 263–269.
- [49] GUILTINAN, M., MARCOTTE, W., AND QUATRANO, R. A Plant Leucine Zipper Protein That Recognizes an Abscisic Acid Response Element. *Science* 250 (1990), 267–271.

- [50] HARTUNG, W., SCHILLER, P., AND DIETZ, K. Physiology of Poikilohydric Plants. *Progress in Botany* 59 (1998), 301–327.
- [51] HEXIMER, S., AND FORSYKE, D. A Human Putative Lymphocyte Go/G1 Switch Gene Homologous to a Rodent Gene Encoding a Zinc-Binding Potential Transcription Factor. *DNA and Cell Biology* 12, 1 (1993), 73–88.
- [52] HILL, A., NANTEL, A., ROCK, C., AND QUATRANO, R. A Conserved Domain of the *viviparous* Gene Product Enhances the DNA Binding Activity of the bZIP Protein EmBP-1 and Other Transcription Factors. *Journal of Biological Chemistry* 271, 7 (1996), 3366–3374.
- [53] HOB0, T., ASADA, M., KOWYAMA, Y., AND HATTORI, T. ACGT-containing abscisic acid response element (ABRE) and coupling element 3 (CE3) are functionally equivalent. *The Plant Journal* 19, 6 (1999), 679–689.
- [54] HOECKER, U., TEPPERMAN, J., AND QUAIL, P. Spal, a WD-Repeat Protein Specific to Phytochrome A Signal Transduction. *Science* 284 (1999), 496–499.
- [55] HOFMANN, W. *Untersuchungen zur Isolierung von Regulator-Genen des floralen Meristem-Identitäts-Gens FLORICAULA aus Antirrhinum majus*. PhD thesis, Universität zu Köln, 1999.
- [56] INGRAM, J., AND BARTELS, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47 (1996), 377–403.
- [57] INGRAM, J., CHANDLER, J., GALLAGHER, L., SALAMINI, F., AND BARTELS, D. Analysis of cDNA Clones Encoding Sucrose-Phosphate Synthase in Relation to Sugar Interconversions Associated with Dehydration in the Resurrection Plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Physiology* 115 (1997), 113–121.
- [58] INOUE, C., REMONDELLI, P., KARIN, M., AND ELLEDGE, S. Isolation of a cDNA Encoding a Metal Response Element Binding Protein Using a Novel Expression Cloning Procedure: The One-Hybrid System. *DNA and Cell Biology* 13, 7 (1994), 731–742.

- [59] ITURRIAGA, G., LEYNS, L., VILLEGAS, A., GHARAIBEH, R., SALAMINI, F., AND BARTELS, D. A family of novel myb-related genes from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* are specifically expressed in callus and roots in response to ABA or desiccation. *Plant Molecular Biology* 32 (1996), 707–716.
- [60] IZAWA, T., FORSTER, R., AND CHUA, N. Plant bZIP Protein DNA Binding Specificity. *Journal of Molecular Biology* 230 (1993), 1131–1144.
- [61] JACKSON, S. Identification and characterization of eukaryotic transcription factors. In *Gene Transcription*, B. Haines and S. Higgins, Eds. Oxford University Press, 1993.
- [62] JIN, D., AND JEANG, K. HTLV-I Tax self-association in optimal transactivation function. *Nucleic Acids Research* 25, 2 (1997), 379–387.
- [63] KAPLAN, R. *Der Ursprung des Lebens*, 1 ed. dtv-Thieme, Stuttgart, 1978.
- [64] KIM, S., CHUNG, H., AND THOMAS, T. 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 (1997), 1237–1251.
- [65] KLEINES, M., ELSTER, R., RODRIGO, M., BLERVACQ, A., SALAMINI, F., AND BARTELS, D. Isolation and expression analysis of two stress-responsive sucrose-synthase genes from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* Hochst. *Planta* 209 (1999), 13–24.
- [66] KORNBERG, R. Eukaryotic transcriptional control. *Trends in Biochemical Sciences* 24, 12 (1999), M46–M49.
- [67] KRAMER, P. Changing concepts regarding plant water relations. *Plant Cell Environment* 11 (1988), 565–568.
- [68] LAEMMLI, U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970), 681–685.
- [69] LANG, V., AND PALVA, E. The expression of a rab-related gene, rab18, is induced by abscisic acid during the cold acclimation process of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 20 (1992), 951–962.

- [70] LEHMING, N., THANOS, D., BRICKMAN, J., MA, J., MANIATIS, T., AND PTASHNE, M. A HMG-like protein that can switch a transcriptional activator to a repressor. *Nature* 371 (1994), 175–179.
- [71] LERCH, G. *Pflanzenökologie*, 1 ed. Akademie Verlag, Berlin, 1991.
- [72] LEVITT, J. *Responses of plants to environmental stresses*, vol. I-II. Academic Press, London, 1980.
- [73] LI, J., AND HERSKOWITZ, I. Isolation of ORC6, a Component of the Yeast Origin Recognition Complex by a One-Hybrid System. *Science* 262 (1993), 1870–1874.
- [74] LI, Z., AND THOMAS, T. PEI1, an Embryo Specific Zinc Finger Protein Gene Required for Heart-Stage Embryo Formation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 10 (1998), 383–392.
- [75] LIU, L., WHITE, M., AND MACRAE, T. Transcription factors and their genes in plants. *European Journal of Biochemistry* 262 (1999), 247–256.
- [76] LIU, Q., KASUGA, M., SAKUMA, Y., ABE, H., MIURA, S., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., AND SHINOZAKI, K. 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 (1998), 1391–1406.
- [77] MACKAY, J., AND CROSSLEY, M. Zinc fingers are sticking together. *Trends in Biochemical Sciences* 23 (1998), 1–4.
- [78] MAK, K., LONGCOR, L., JOHNSON, S., LEMERCIER, C., TO, R., AND KONIECZNY, S. Examination of Mammalian Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factors Using a Yeast One-Hybrid System. *DNA and Cell Biology* 15, 1 (1996), 1–8.
- [79] MARIAUX, J., BOCKEL, C., SALAMINI, F., AND BARTELS, D. Desiccation- and abscisic acid-responsive genes encoding major intrinsic proteins (MIPs) from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Molecular Biology* 38 (1998), 1089–1099.

- [80] MCCARTY, D. Genetic control and integration of maturation and germination pathways in seed development. *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 46 (1995), 71–93.
- [81] MICHEL, D., SALAMINI, F., BARTELS, D., DALE, P., BAGA, M., AND SZALAY, A. Analysis of a desiccation and ABA responsive promoter isolated from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *The Plant Journal* 4, 1 (1993), 29–40.
- [82] MOHR, H., AND SCHOPFER, P. *Pflanzenphysiologie*, 4 ed. Springer, Berlin and Heidelberg and New York, 1992.
- [83] MOILANEN, A., KARVONEN, U., POUKKA, H., YAN, W., TORPPA, J., JÄNNE, O., AND PALVIMO, J. A Testis-specific Androgen Receptor Coregulator That Belongs to a Novel Family of Nuclear Proteins. *Journal of Biological Chemistry* 274, 6 (1999), 3700–3704.
- [84] MURASHIGE, T., AND SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologiae Plantarum* 15 (1962), 473–497.
- [85] NELSON, D., SALAMINI, F., AND BARTELS, D. Abscisic acids promotes a novel DNA-binding activity to a desiccation related promoter of *Craterostigma plantagineum*. *The Plant Journal* 5, 4 (1994), 451–458.
- [86] NI, M., TEPPERMAN, J., AND QUAIL, P. PIF3, a Phytochrome-Interacting Factor Necessary for Normal Photoinduced Signal Transduction, Is a Novel Basic Helix-Loop-Helix Protein. *Cell* 95 (1998), 657–667.
- [87] NICOLAS, R., HEYNES, G., AND GOODWIN, G. Purification and cloning of dna binding transcription factors. In *Transcription Factors*, D. Latchman, Ed. Oxford University Press, 1999.
- [88] NOBEL, P. Achievable productivities of certain CAM plants: Basis for high values compared with C and C plants. *New Phytologist* 119 (1991), 183–205.
- [89] PHARMACIA, D. Amersham Pharmacia Biotech GmbH. *Munzinger Str. 11, 79111 Freiburg (Deutschland)*.

- [90] PIATKOWSKI, D., SCHNEIDER, K., SALAMINI, F., AND BARTELS, D. 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 (1990), 1682–1688.
- [91] POSAS, F., AND SAITO, H. Osmotic Activation of the HOG MAPK Pathway via Ste11p MAPKKK: Scaffold Role of Pbs2p MAPKK. *Science* 276 (1997), 1702–1705.
- [92] REICHEL, C., MATHUR, J., ECKES, P., LANGENKEMPER, K., KONCZ, C., SCHELL, J., REISS, B., AND MAAS, C. Enhanced green fluorescence by the expression of an *Aequoria victoria* green fluorescent protein mutant in mono- and dicotyledonous plant cells. *Proceedings of the National Academy of Science* 93 (1996), 5888–5893.
- [93] ROMIG, H., FACKELMAYER, F., RENZ, A., RAMSBERGER, U., AND RICHTER, A. Characterization of SAF-A, a novel nuclear DNA binding protein from HeLa cells with high affinity for nuclear scaffold/matrix attachment DNA elements. *EMBO* 11, 9 (1992), 3431–3440.
- [94] ROSE, A., MEIER, I., AND WIENAND, U. The tomato I-box binding factor LeMYBI is a member of a novel class of Myb-like proteins. *The Plant Journal* 20, 6 (1999), 641–652.
- [95] RUSHTON, P., MACDONALD, H., HUTTLY, A., LAZARUS, C., AND HOOLEY, R. Members of a new family of DNA-binding proteins bind to a conserved cis-element in the promoter of alpha-Amy2 genes. *Plant Molecular Biology* 29 (1995), 691–702.
- [96] SALINOVICH, O., AND MONTELARO, R. Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 156 (1986), 341–347.
- [97] SALISBURY, F., AND ROSS, C. *Plant Physiology*, 4 ed. Wadsworth, Belmont, California, USA, 1992.
- [98] SAMBROOK, J., MANIATIS, T., AND FRITSCH, E. *Molecular cloning. A Laboratory manual*, 2 ed. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, 1989.



- [99] SCOTT, P. Resurrection Plants and the Secrets of the Eternal Leaf. *Annals of Botany* 85 (2000), 159–166.
- [100] SEMMES, O., AND JEANG, K. HTLV-I Tax Is a Zinc-Binding Protein: Role of Zinc in Tax Structure and Function. *Virology* 188 (1992), 754–764.
- [101] SESSA, G., MORELLI, G., AND RUBERTI, I. The Athb-1 and -2 HD-Zip domains homodimerize forming complexes of different DNA binding specificities. *EMBO* 12, 9 (1993), 3507–3517.
- [102] SESSA, G., MORELLI, G., AND RUBERTI, I. DNA-binding Specificity of the Homeodomain-leucine Zipper Domain. *Journal of Molecular Biology* 274 (1997), 303–309.
- [103] SHEN, Q., AND HO, T.-H. Functional dissection of an abscisic acid (ABA)-inducible gene reveals two independent ABA-responsive complexes each containing a G-Box and a novel *cis*-acting element. *Plant Cell* 7 (1995), 295–307.
- [104] SHEN, Q., ZHANG, P., AND HO, T.-H. Modular nature of abscisic acid (ABA) response complexes: composite promoter units that are necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in barley. *Plant Cell* 8 (1996), 1107–1119.
- [105] SHINOZAKI, K., AND YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene Expression and Signal Transduction in Water-Stress Response. *Plant Physiology* 115 (1997), 327–334.
- [106] SINCLAIR, R. Water potential and stomatal conductance of three *Eucalyptus* species in the Mount Lofty Ranges, South Australia. *Australian Journal of Botany* 28 (1980), 499–510.
- [107] SITTE, P., ZIEGLER, H., EHRENDORFER, F., AND BRESINSKY, A. *Strasburger - Lehrbuch der Botanik*, 33 ed. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart and Jena and New York, 1991.
- [108] SKRIVER, K., OLSEN, P., ROGERS, J., AND MUNDY, J. *Cis*-acting DNA elements responsive to gibberellin and its antagonist abscisic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88 (1991), 7266–7270.

- [109] SOUTHERN, E. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 98 (1975), 503–517.
- [110] STOCKINGER, E., GILMOUR, S., AND THOMASHOW, M. *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (1997), 1035–1040.
- [111] STRATAGENE, D. Stratagene Cloning Systems GmbH. *Postfach 105466, 69044 Heidelberg* (Deutschland).
- [112] STRUBIN, M., NEWELL, J., AND MATTHIAS, P. OBF-1, a Novel B Cell Specific Coactivator That Stimulates Immunoglobulin Promoter Activity through Association with Octamer-Binding Proteins. *Cell* 80 (1995), 497–506.
- [113] STUDIER, F., ROSENBERG, A., DUNN, J., AND DUBENDORF, J. Use of T7 RNA Polymerase to Direct Expression of Cloned Genes. *Methods in Enzymology* 185 (1990), 60–89.
- [114] TÖPFER, R., MATZEIT, V., GRONENBORN, B., SCHELL, J., AND STEINBISS, H. A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. *Nucleic Acids Research* 15, 14 (1987), 5890.
- [115] ULMASOV, T., HAGEN, G., AND GUILFOYLE, T. ARF1, a Transcription Factor That Binds to Auxin Response Elements. *Science* 276 (1997), 1865–1868.
- [116] URAO, T., YAKUBOV, B., SATOH, R., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., SEKI, M., HIRAYAMA, T., AND SHINOZAKI, K. A Transmembrane Hybrid-Type Histidine Kinase in *Arabidopsis* Functions as an Osmosensor. *The Plant Cell* 11 (1999), 1743–1754.
- [117] VARNUM, B., MA, Q., CHI, T., FLETCHER, B., AND HERSCHMAN, H. The Tis11 Primary Response Gene Is a Member of a Gene Family That Encodes Proteins with a Highly Conserved Sequence Containing an Unusual Cys-His- Repeat. *Molecular Cell Biology* 11, 3 (1991), 1754–1758.

- [118] VELASCO, R., SALAMINI, F., AND BARTELS, D. Gene structure and expression analysis of the drought and abscisic acid responsive CDeT11-24 gene family from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Planta* 204 (1998), 459–471.
- [119] VOGELLEHNER, D. Vorlesungen in Paläobotanik (Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg). Über die Holzbildung bei Progymnospermen, Gymnospermen und Angiospermen, 1994.
- [120] WANG, M., AND REED, R. Molecular cloning of the olfactory neuronal transcription factor Olf-1 by genetic selection in yeast. *Nature* 364 (1993), 121–126.
- [121] WILMANN, O. *Ökologische Pflanzensoziologie*, 5 ed. Quelle und Meyer, Heidelberg, 1993.
- [122] WILSON, T., FAHRNER, T., JOHNSTON, M., AND MILBRAND, J. Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. *Science* 252 (1991), 1296–1300.
- [123] WITHERS, J. Studies in the status of unburnt *Eucalyptus* woodland at Ocean Grove, Victoria. III. Comparative water relations of the major tree species. *Australian Journal of Botany* 26 (1978), 819–835.
- [124] WORTHINGTON, M., AMANN, B., NATHANS, D., AND BERG, J. Metal binding properties and secondary structure of the zinc finger domain of Nup475. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (1996), 13754–13759.
- [125] YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., AND SHINOZAKI, K. A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low temperature, or high salt stress. *The Plant Cell* 6 (1994), 251–264.
- [126] YANISCH-PERRON, C., VIEIRA, J., AND MESSING, J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M14mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33 (1985), 103–119.

## Danksagung

So vielen ist zu danken, daß ich diese Arbeit anfertigen konnte, und ich möchte diejenigen nicht vergessen, die an allem was gut ist an dieser Arbeit wesentlichen Anteil haben.

Leben und leben lassen für die Wissenschaft — unter Prof. Dr. Francesco Salamini präsidialer Art der Abteilungsleitung ist Platz für die vielen Menschen, die mir die Mitarbeit zu einer sehr angenehmen Erfahrung werden ließen. Hier hat die Untersuchung der Trockentoleranz, die mich zurück ins Rheinland lockte, als Forschungsgegenstand Schutz und Schirm gefunden, und ich bin froh, daß ich die Gelegenheit wahrgenommen habe, hier meine Dissertation anzufertigen.

Prof. Dr. Dorothea Bartels, die das faszinierende Projekt der Erforschung der Trockentoleranz anhand der Wiederauferstehungspflanze *Craterostigma plantagineum* unermüdlich vorwärtstreibt, hat meine Kraft und mein Schaffen für diese Arbeit auf wissenschaftlich geordnete, sinnvolle Bahnen gelenkt und dafür gesorgt, daß Gedanken und Tun eine Form fanden, die sich zwischen diesen beiden Einbanddeckeln niederlassen konnte. Dafür möchte ich ihr besonderen Dank sagen.

Das Graduiertenkolleg “Molekulare Analyse pflanzlicher Entwicklungsprozesse”, das mich über ein DFG-Stipendium lehrte und nährte, gewann durch Prof. Dr. Ulf-Ingo Flügges engagierte, über das notwendige herausgehende Leitung und die teilnehmenden Dozenten und Graduierten das Format einer hochkarätigen wissenschaftlichen Einrichtung mit Seminaren, Tagungen und Treffen. Davon habe ich sehr profitiert, und ich möchte mich dafür bedanken.

Durch ihren reichen Erfahrungsschatz und Methodenfundus hat Barbara Eilts wesentlichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit, denn wenn etwas irgendwo fehlte oder klemmte war sie Zuflucht und Rettung.

Mit Wolfgang Frank und Christine Bockel hatte ich zwei Ansprechpartner, die mir den Start am MPIZ sehr erleichterten und mir bei den vielen Neulingsfragen nach dem wer wie wo was wozu warum stets kompetente Hilfe leisten konnten.

In Maria Jesus Rodrigo, Claudia Smith-Espinoza, Rosa Castillo, Jonathan Phillips und Wim Deleu von der Paella-Connection sowie in Joao Marques, Jean-Baptiste Mariaux, Elisabetta Schiliro, Xin Deng, Steve Slocombe, Yan Wei, Monika Maitz, Luca Santi, Antonio Serna und vielen anderen lernte ich Mitarbeiter kennen, mit denen mich außer dem wissenschaftlichen Interesse gemeinsame private Unternehmungen — keineswegs nur, aber doch insbesondere essen und trinken — freundschaftlich verbinden und die wesentlichen Anteil daran hatten, daß ich mich in meiner Arbeitsumgebung sehr wohl gefühlt habe.

---

Gleich werde ich noch einen Lebenslauf aufs Papier bringen und diese Arbeit abschließen, wissenschaftliche Tätigkeit und Privates mischen sich, eine gute Gelegenheit, um denen zu danken, die von anderer Seite die Voraussetzungen geschaffen haben, die zum Gelingen unerlässlich waren: meiner Mutter und meiner Großmutter, die vor der Zeit gegangen sind, meinem Vater, meinen Geschwistern mit ihren jungen, hoffnungsvollen Athleten, *my lady* Steffi und meinem Freund, Gönner und Mentor, dem Earl of Fortescue, der mich weitere Jahre gewähren ließ.

## **Erklärung**

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Francesco Salamini betreut worden.

Tobias Hilbricht

## Lebenslauf

von Tobias Hilbricht, geboren am 24. Januar 1967 in Düsseldorf, wohnhaft Wall St. 78 in 51063 Köln

1973–1977	Gemeinschaftsgrundschule Gieslenberg in Langenfeld/Rheinland
1977–1986	Konrad-Adenauer-Gymnasium, Langenfeld/Rheinland
Mai 1986	Abitur mit den Prüfungsfächern Biologie, Mathematik, Geschichte und Griechisch
1986–1988	Zivildienst in der Landesgeschäftsstelle NRW des Bundes für Umwelt- und Naturschutz e. V. in Ratingen
1988	6 Monate in Australien
1988–1991	Grundstudium Biologie (Diplom) an der Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg im Breisgau
1992–1993	Studium an der University of Tasmania, Hobart, Australien, in den Fächern Plant Science (3 <sup>rd</sup> year) und Chemie (2 <sup>nd</sup> year)
1993–1995	Hauptstudium Biologie (Diplom) an der Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg im Breisgau mit den Fächern Pflanzenphysiologie, Biochemie der Pflanzen, Paläobotanik und Organische Chemie
1995	mündliche Diplomprüfungen
1995–1996	Diplomarbeit bei Prof. Eberhard Schäfer über “Proteinexpression in der methylo-trophen Hefe <i>Pichia pastoris</i> ” unter Betreuung von Dr. Tim Kunkel
August 1996	Biologie-Diplom
1997–1999	DFG-Stipendium im Rahmen des Graduiertenkollegs “Molekulare Analyse pflanzlicher Entwicklungsvorgänge” unter der Leitung von Prof. Ulf-Ingo Flügge
27.2.1997	Beginn der Promotionsarbeit in der Abteilung Pflanzenzüchtung und Ertragsphysiologie des Max-Planck-Institutes für Züchtungsforschung in Köln unter Betreuung von Prof. Francesco Salamini in der Arbeitsgruppe von Prof. Dorothea Bartels

## Abstract

The gene CDeT27-45, which encodes a late embryogenesis abundant (LEA) protein, has been cloned from *Craterostigma plantagineum*, a resurrection plant used to study the molecular basis of desiccation tolerance in plants. Characterization of the promoter of this dehydration and ABA inducible gene led to the identification of a fragment which is necessary for the ABA stimulated expression of a reporter gene in *Craterostigma* protoplasts. This fragment contains two of the scarcely investigated AGCCC-*cis*-elements, which are also present in other plant gene promoters.

This prompted the question for the proteins which bind to the promoter fragment containing the two AGCCC-motifs. Analysis of the binding activities with the AGCCC-elements of the CDeT27-45 promoter with regard to the distribution in various tissues by means of gel retardation assays showed that binding activities are present in nuclear proteins from roots and callus. Since nuclear protein extracts from ABA treated callus caused the strongest gel retardation signals the binding of these extracts was analyzed for binding to a pentamer of the AGCCC-*cis*-element which should be used in a yeast one-hybrid screen. Because the binding activities to the pentamer and the native promoter fragment did not differ the pentamer was used to screen a cDNA library in a yeast one-hybrid screen for sequences which code for proteins binding to AGCCC-elements.

After establishing a one-hybrid system  $1.5 \times 10^6$  cDNA clones were screened for sequences which code for proteins interacting with AGCCC-elements. 309 clones were isolated and analyzed for the specificity of their interaction by retransformations into yeast. One clone, R18, showed binding specificity in yeast as well as *in vitro* using protein expressed in *Escherichia coli* in gel retardation assays.

Sequencing clone R18 revealed a basic protein with a C<sub>3</sub>H-zincfinger, an uncharacterized helix-loop-helix element and a SAP-domain with homologies to ESTs and derived protein sequences mainly from plant species. A northern analysis with R18 as a probe showed that the cDNA of 1.3 kb is a fragment of a 1.7 kb rare transcript expressed in roots and callus. Fusion of R18 to the green fluorescent protein and transient expression in tobacco protoplasts indicated that R18 is transported into the nucleus as suggested by the presence of putative nuclear localization signals in the R18 sequence. GUS activities in tobacco protoplasts cotransfected with R18 and a construct of the CDeT27-45 promoter with GUS showed that R18 can act *in vivo* as a transcriptional activator.

Two genomic R18-clones have been isolated which are very similar and possibly allelic to each other; one of these genomic clones is 99 % identical to R18 on nucleotide level and 98 % on amino acid level.

Thus the putative transcription factor gene R18 has been isolated from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* using a yeast one-hybrid screen.